

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

## CARÁTULA

Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Caracterización y diversidad genética de pimienta gorda (*Pimenta dioica*, Myrtaceae) como base para planes de manejo y explotación

nombre del proyecto de investigación

B4CU-2021

código del proyecto de investigación

Centro Universitario de Zacapa

unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez

José Alejandro Ruiz Chután

Jonatan Mario Josué Ortega España

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala 28 de febrero de 2022

lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año

## **Autoridades**

Dr. Hugo Pérez Noriega  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Pérez  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Pérez  
Coordinador(a) del Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

## **Autores**

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez<sup>1</sup>  
Coordinador del proyecto

José Alejandro Ruiz Chután<sup>1,2,3</sup>  
Investigador

Jonatan Mario Josué Ortega España<sup>3</sup>  
Nombre del auxiliar de investigación II

Julio Ernesto Berdúo Sandoval<sup>1</sup>  
Sara Bethsabé Barrios de León  
Carmen Lucía Yurrita Obiols<sup>3</sup>  
Colaboradores

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales<sup>1</sup>  
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences Prague<sup>2</sup>  
Instituto de Investigaciones, Centro Universitario de Zacapa<sup>3</sup>

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de del código B4CU-2021 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



## 1. Índice General

2.	Resumen y palabras clave.....	4
3.	Introducción.....	6
4.	Planteamiento del problema.....	7
5	Delimitación en tiempo y espacio.....	8
5.1	Delimitación en tiempo.....	8
5.2	Delimitación espacial.....	8
6.	Marco teórico.....	8
7.	Estado del arte.....	12
8.	Objetivos (generales y específicos) .....	14
9.	Hipótesis.....	14
10	Materiales y métodos.....	14
10.1	Enfoque de la investigación.....	14
10.3	Recolección de la información.....	14
10.4	Técnicas e instrumentos .....	16
10.5	Procesamiento y análisis de la información.....	16
11	Resultados.....	20
12	Discusión.....	30
11.	Referencias.....	35

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

12.	Vinculación.....	41
13.	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual.....	41
14.	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS.....	41
15.	Orden de pago final.....	42
16.	Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación.....	42
17.	Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario.....	42
18.	Visado de la Dirección General de Investigación.....	43

## 2. Resumen y palabras clave:

El fruto de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) es un producto no maderable del bosque, que ha sido comercializado nacional e internacionalmente debido a su sabor, aceites y metabolitos secundarios que la caracterizan. Debido a los métodos tradicionales de colecta, la especie ha sufrido una fuerte presión por selección de árboles “hembra” y reducción de la dispersión natural de sus semillas. Este es el primer estudio para determinar la diversidad y estructura genética de poblaciones silvestres y cultivadas de *P. dioica*, utilizando marcadores moleculares. Con 15 cebadores RAPD, se obtuvieron 126 fragmentos amplificados con un 71.77% de polimorfismo. La diversidad genética de Nei y el índice de Shannon fueron ligeramente superiores en las poblaciones naturales ( $H_e = 0.24 - 0.28$ ;  $H = 0.35 - 0.40$ ) que en las cultivadas ( $H_e = 0.17 - 0.22$ ;  $H = 0.23 - 0.31$ ). Los diferentes métodos de estructuración poblacional (UPGMA, DAPC y STRUCTURE) confirmaron la separación de San Cristóbal de las restantes poblaciones sin mostrar correspondencia entre la distancia genética y geográfica. Además, hubo diferenciación genética entre las poblaciones ( $\Phi_{CT} = 0.114$ ,  $p < .001$ ). La identificación de cuello de botella (IAM y SMM;  $p < .001$ ) en todas las poblaciones sugiere que los métodos de tradicionales de aprovechamiento tienen un efecto ligero pero significativo en la reducción niveles de diversidad de *P. dioica*. Se recomienda la conservación *in situ*, *circa situ*, *ex situ* y la gestión sostenible de las poblaciones regeneradas de forma natural y cultivadas para mantener los recursos genéticos de *P. dioica*.

**Palabras clave:** Productos forestales no maderables, marcadores moleculares, conservación, reservorio genético, cuello de botella

## Abstract and Keywords

The fruit of allspice (*Pimenta dioica*) is a non-timber forest product, which has been marketed nationally and internationally due to its flavor, oils, and secondary metabolites that characterize it. Due to traditional collection methods, the species has suffered strong pressure due to the selection of “female” trees and the reduction of the natural dispersion of its seeds. This is the first study to determine the diversity and genetic structure of wild and cultivated populations of *P. dioica* using molecular markers. With 15 RAPD primers, we obtained 126 amplified fragments with 71.77% polymorphism. Nei genetic diversity and the Shannon index were slightly higher in natural populations ( $H_e = 0.24 - 0.28$ ;  $H = 0.35 - 0.40$ ) than in cultivated populations ( $H_e = 0.17 - 0.22$ ;  $H = 0.23 - 0.31$ ). The different population structuring methods (UPGMA, DAPC, and STRUCTURE) confirmed the separation of San Cristóbal from the remaining populations without showing correspondence between genetic and geographic distance. In addition, there was genetic differentiation between the populations ( $\Phi_{CT} = 0.114$ ,  $p < .001$ ). Identifying bottlenecks (AMI and SMM;  $p < .001$ ) in all populations suggests that traditional harvesting methods have a slight but significant effect in reducing the diversity levels of *P. dioica*. In situ, circa situ, ex situ conservation, and sustainable management of naturally regenerated and cultivated populations are recommended for *P. dioica* genetic resources.

**Keywords:** Non-timber forest products, molecular markers, conservation, genetic pool, genetic bottleneck

### 3. Introducción:

Para favorecer la explotación y conservación de los recursos genéticos de una especie, es necesario profundizar en el entendimiento de la diversidad genética que existe dentro de la misma, así como de las relaciones presentes dentro de cada uno de los diferentes genotipos que componen sus poblaciones. Guatemala es un país rico en recursos genéticos forestales, los cuales se dividen en productos forestales maderables y no maderables. Los productos forestales no maderables (PFNM) incluyen a las especies forestales cuya madera no es aprovechada, pero si sus frutos, hojas, etc. Estas especies desempeñan un papel primordial en la vida diaria y el bienestar de los habitantes de las comunidades cercanas a zonas boscosas, ya que constituyen una importante fuente de alimento, medicina, especias, forraje para los animales, etc. (Anastacio-Martínez, Franco-Maass, Valtierra-Pacheco, & Nava-Bernal, 2016). A pesar de la gran variedad de productos no maderables que se utilizan localmente en las zonas rurales del país, son muy pocas las especies que se comercializan de manera nacional, y menos aun las que tienen mercado internacional.

En Guatemala los principales PFNM se agrupan en 4 categorías: ornamentales, resinas, especias y medicinales. Todas las categorías tienen usos, métodos de aprovechamiento y valor económico particulares (Robles Valle, Oliveira Barbosa, & Villalobos Soto, 2000). La pimienta gorda, también conocida como pimienta de Jamaica y en inglés como allspice, es uno de los principales PFNM que se comercializan en el país. Esta especia es el fruto del árbol de pimienta (*Pimenta dioica*), especie de la familia Myrtaceae, nativa de los bosques tropicales latifoliados del país. La recolección de la pimienta gorda se realiza durante los meses de julio, agosto y septiembre, generalmente cuando aún está verde. Luego se seca al sol, antes de ser comercializada. Según las cifras del Banco de Guatemala, en el 2018 Guatemala exportó un total de US\$ 4.4 millones en concepto de pimienta gorda.

En el país, los métodos de recolección utilizados para este especie son tradicionales y rústicos, en el Petén, por ejemplo, se cortan las ramas fructificadas completas (Robles Valle et al., 2000), mientras que en la Franja Transversal del Norte (FTN) los recolectores se suben al árbol y sacuden las ramas para cosechar los frutos (Caal, E.; Técnico, Agexport, 2017 comunicación personal). En ambos casos se elimina la posibilidad de dispersión natural de la especie, poniendo de esta manera en riesgo la diversidad genética intra e inter poblacional de la misma. A esto se suma el continuo movimiento

de esquejes y plántulas procedentes de padres que han demostrado alta productividad entre las diferentes zonas de cultivo y/o aprovechamiento de pimienta gorda, así como el establecimiento de algunos viveros y áreas de cultivo manejado, que favorecen los fenotipos más productivos, sin tomar en cuenta la diversidad genética de las plantas.

Los objetivos del presente estudio fueron: (1) Determinar la diversidad genética intra e inter poblacional de poblaciones silvestres y comerciales de *Pimenta dioica* utilizando marcadores moleculares RAPD; (2) Evaluar la efectividad de 15 cebadores RAPDs para determinar la diversidad genética de la pimienta gorda; (3) Evaluar el uso de poblaciones cultivadas de *P. dioica* en la Franja Transversal del Norte como reservorios genéticos de la especie y (4) Generar datos que puedan ser utilizados para la elaboración de planes de manejo y explotación encaminados a preservar los recursos genéticos de la especie. Para lograrlo se realizó la evaluación de la diversidad genética existente en 6 poblaciones en la FTN y 1 población en el Petén, utilizando marcadores moleculares tipo RAPDs. Estos han demostrado ser útiles tanto en estudios aplicados como de tipo evolutivo, incluyendo la construcción de mapas genéticos, la obtención de marcadores ligados a caracteres fenotípicos, estudio de diversidad genética, identificación de clones y variedades cultivadas (Ortíz-Medrano, Moreno-Letelier, & Piñero, 2008; Ramírez Enríquez, Delgado-Valerio, García Magaña, & Molina Sánchez, 2019).

#### 4. Planteamiento del problema:

*P. dioica* es una especie naturalmente distribuida en los bosques latifoliados del norte de Guatemala. En departamentos como el Petén solían encontrarse abundantes poblaciones silvestres dentro del bosque, sin embargo, el hecho de representar una alternativa económica para los comunitarios ha provocado una fuerte presión antrópica sobre sus poblaciones, las cuales han sido fuertemente explotadas a lo largo de su zona de distribución. A esto se suma la ausencia de planes de manejo que aseguren su uso racional, lo cual por ejemplo causó que, en el departamento del Petén, durante la década de los 70, se diera una fuerte depredación de la especie, la cual se vio incluso bajo amenaza de extinción, lo que provocó su inclusión en la Lista de Especies Amenazadas de Guatemala (LEA).

Recientemente la pimienta gorda fue excluida de la LEA, debido en parte a que La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza la categorizó como especie de preocupación menor, lo cual ha llevado a que se busque dinamizar el comercio en sus principales sitios de producción. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre las consecuencias que puede causar su explotación y métodos de colecta sobre la diversidad genética de las poblaciones cultivadas y naturales de la especie. Es por esto por lo que se hace prioritario profundizar sobre el conocimiento del estado actual de la diversidad genética de la especie y generar información que permita crear planes de manejo, uso y mejora fundamentados en el conocimiento del estado actual de este importante recurso fitogenético.

## 5 Delimitación en tiempo y espacio

5.1 Delimitación en tiempo: el proyecto fue ejecutado en un total de 11 meses, de febrero a diciembre del 2021. Posteriormente, se otorgó una prórroga hasta febrero del 2022, según el acuerdo el Acuerdo de Dirección DIGI 188-2021

5.2 Delimitación espacial: se muestrearon poblaciones en: San Cristóbal, Fray Bartolomé de las Casas; Raxruhá; Chisec; Cobán (2 poblaciones) y una población en el departamento del Petén.

## 6. Marco teórico:

*Pimienta gorda* (*Pimenta dioica* (L.) Merrill)

### Descripción botánica

La pimienta gorda (*Pimenta dioica* (L.) Merrill) es un árbol perteneciente a la familia Myrtaceae, subtribu Myrtinae. Los árboles de esta especie pueden llegar a medir 20 metros de altura, alcanzando comúnmente los 6-10, y 40 centímetros de diámetro en el tronco. Su corteza es lisa color café pálido y se desprende en escamas muy delgadas y alargadas. La corteza interna es color crema amarillento, quebradiza, de sabor amargo y olor fragante (Cordero & Boshier, 2004).

Presenta hojas simples, opuestas, oblongas o elípticas (Rao, Navinchandra, & Jayaveera, 2012), pecioladas y penninervias. Se agrupan al final de la rama y presentan peciolos de 15 - 20 mm de largo

y 1.5 - 2.3 mm de ancho. El ápice y la base son cuneados a agudos. La vena central es prominente y elevada. Las venas laterales se presentan en 9 a 12 pares (Parker, 2008). La inflorescencia es una panícula compuesta, flores fragantes de 1 a 2 milímetros de largo, de pétalos blancos, cáliz 4-lobado y numerosos estambres intercalados con vellosidades, también de color blanco. El estigma es del doble de grosor que el estilo y el ovario con dos carpelos, con 1 óvulo por cada uno. Las flores son bisexuales, pero algunos árboles no producen flores fértiles, por lo que se les denomina árboles macho (Cordero & Boshier, 2004; Parker, 2008). El fruto es sub globoso de 6 a 8 milímetros de diámetro, con exterior áspero debido a la presencia de glándulas aceitosas que contienen compuestos secundarios como eugenoles y vanilina. En esta especie se diferencian árboles macho y hembra, siendo los considerados hembra los más apreciados, ya que generan beneficios comerciales a través de la producción de frutos (Cordero & Boshier, 2004; Rao et al., 2012).

En Guatemala, tradicionalmente se reconocen dos variedades de pimienta gorda, una llamada por los comunitarios “pimienta chaparra”, que produce frutos a partir de los cuatro años y llega a medir un promedio de 5 metros. Y otra llamada “pimienta de montaña”, que produce frutos a partir de los siete años y puede crecer hasta 20 metros (Caal, E. y Cuz, A.; Técnicos, Agexport, 2017 comunicación personal). Su principal producto son los frutos, de aroma combinado, los cuales una vez secos se utilizan como condimento. El sabor se asemeja a una mezcla de nuez moscada, clavo y canela, motivo por el cual en el mercado internacional se le conoce como “allspice” (Macia Barco, 1998). Los frutos, semillas y hojas de la pimienta gorda contienen aceite esencial, que es utilizado como agente aromatizante. El aceite extraído de los frutos se utiliza en la elaboración de jabones, productos para el cabello, medicina, fungicidas e insecticidas (Zabka, Pavela, & Slezakova, 2009; Zhang & Lokeshwar, 2012). Además, la infusión de las hojas se recomienda para el tratamiento de molestias estomacales y para la pérdida de peso.

## Distribución.

Este árbol es nativo de las Américas (Chinchilla García, 2004), su distribución incluye el sur de México, Centroamérica y Panamá, Cuba, Jamaica y el norte de Suramérica (Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Sánchez Pérez, & Rodríguez Ferradá, 2000). En Guatemala, la especie puede encontrarse aproximadamente en el 27% del territorio nacional, distribuida en los departamentos de Guatemala,

Santa Rosa, Petén, Alta Verapaz, San Marcos, Izabal, Suchitepéquez y Quetzaltenango (Chinchilla García, 2004; Godoy Liere, 2010; Parker, 2008).

En Petén se distribuye a lo largo de la Reserva de la Biósfera Maya, con algunas poblaciones silvestres, o no cultivadas, en parques nacionales o zonas de poco acceso (Chinchilla García, 2004). En Alta Verapaz, se cultiva en los municipios de Cobán, Chisec, San Pedro Carchá, Panzós, Senahú, Lanquín, San Cristóbal Verapaz, Tamahú, San Miguel Tucurú, San Juan Chamelco y Santa Cruz Verapaz.

## Aspectos económicos

*Producción mundial.* Se estima que, en 2012, la producción de pimienta gorda alcanzó aproximadamente las 461,450 toneladas, con un valor de 962 millones de dólares (PRONAGRO 2014). Siendo los principales productores Viet Nam, Indonesia, Brasil y China continental (80% de la producción mundial). El 20% restante es producido por México, Guatemala, Belice y Honduras.

*Producción en Guatemala.* En Guatemala, la producción de esta especie ocupa el tercer lugar en los ingresos totales provenientes de productos no maderables del bosque. Se le puede considerar especie clave para la obtención de ingresos tanto para las familias de la región que se ven afectadas por el desempleo (Chinchilla García, 2004), como para el país. En 2018, el banco de Guatemala reportó que el país exportó 4.4 millones de dólares por concepto de pimienta gorda. Actualmente Guatemala exporta pimienta gorda a Estados Unidos, Alemania, países de la ex Unión soviética, Bélgica, Jordania, Israel, Holanda, Arabia Saudita y Finlandia (Consejo Nacional de Áreas Protegidas, s.f).

Los departamentos que cosechan pimienta gorda para exportación son: Alta Verapaz, Petén, San Marcos, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Santa Rosa (Chinchilla García, 2004), siendo Alta Verapaz el departamento que registra mayor cantidad de productores, los cuales producen anualmente alrededor de 380 quintales de fruto verde, según encuestas del 2014 (Vásquez, 2015).

## Diversidad genética forestal y marcadores moleculares en la familia Myrtaceae

La diversidad genética de las especies forestales, incluyendo la variación genética intra e interespecífica de las mismas, es uno de los temas menos estudiados. La diversidad genética constituye un componente clave de la biodiversidad ya que determina el potencial adaptativo de las

especies. Para estudiarla, los datos moleculares constituyen una aproximación adecuada ya que además de permitir conocer el estado actual de las especies, proporcionan información para el estudio de las tendencias a largo plazo (Jiménez & Collada, 2000). La aplicación de marcadores moleculares permite analizar qué tan distintos son los individuos y poblaciones de una especie a nivel de ADN, aun cuando no sea posible detectar diferencias fenotípicas, permitiendo estimar su riqueza y variabilidad genética.

La familia Myrtaceae es una de las 8 familias más grandes de plantas con flores, con aproximadamente 5,650 especies reconocidas y alrededor de 150 géneros. Esta familia se distribuye predominantemente en el hemisferio sur, con centros de diversidad en los trópicos húmedos. Muchos de los géneros de esta familia, además de desempeñar un importante papel ecológico en ecosistemas específicos, son conocidos debido a su importancia económica por contener especies con frutos comestibles, i.e. guayaba (*Psidium guajava*), manzana rosa (*Syzygium jambos*), producir aceites esenciales, i.e. eucalipto (*Eucalyptus spp.*) o ser utilizadas como especias, i.e. clavo (*Syzygium aromaticus*) y pimienta gorda (*Pimenta dioica*) (Grattapaglia et al., 2012; Valdés-Infante Herrero et al., 2010). El género *Pimenta* consta de dos especies, ambas conocidas por su alto potencial farmacológico y el valor económico de sus frutos (Carías Villela, 2017; Chinchilla García, 2004).

Los RAPDs (del inglés, Random Amplified Polymorphic DNA) son marcadores de ADN que amplifican al azar diferentes regiones del genoma. Los cebadores que se utilizan son pequeños (10 nucleótidos), de secuencias aleatorias no palindrómicas, elegidas de manera arbitraria y que funcionan como cebadores sentido y antisentido durante la amplificación. Los fragmentos obtenidos se visualizan como un patrón de bandeado en el cual cada banda se considera un locus. Debido a que son marcadores selectivamente neutrales, involucran un gran número de loci y cubren ampliamente el genoma, estos marcadores han sido utilizados en el estudio de especies para las que no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados, o para las cuales se quiere obtener información de manera rápida y relativamente económica (Rocha Munibe et al., 2014).

El uso de marcadores de ADN en el estudio de las especies constituye una forma de identificación que puede ayudar a proteger los recursos genéticos de manera eficiente ya que a diferencia de los marcadores morfo fisiológicos no se ve afectada por las condiciones ambientales. Los perfiles genéticos generados por medio del uso de marcadores moleculares tipo RAPDs se han utilizado en la

familia Myrtaceae para la identificación de genotipos, establecer distancias entre genotipos silvestres, mejorados, cruza o poblaciones en guayaba (Valera-Montero et al., 2017), eucalipto (Osman et al., 2012), Jambul (Khan, Vaishali, & Sharma, 2010) y arrayán (Messaoud et al., 2007), entre otras.

## 7. Estado del arte

La pimienta gorda cuenta con diversos usos que pueden ser medicinales, alimenticios, aromáticos, industriales y artesanales, entre otros; destacando su empleo como condimento culinario. Su aprovechamiento comercial a nivel regional se inició en el siglo XVIII, principalmente por medio de empresas inglesas y holandesas. En Guatemala se cita desde mediados de los años 50, cuando los Estados Unidos de Norteamérica empezó a importarla desde este país. Actualmente se comercializan el fruto seco, entero o molido y las hojas. A nivel internacional esta especie tiene importancia en las industrias alimenticia, farmacéutica y de cosméticos (Martínez, Evangelista, Mendoza, Basurto, & Mapes, 2004).

En Guatemala, el fruto de la pimienta gorda es uno de los productos no maderables del bosque económicamente más importantes, ya que es un ingreso clave para las familias de la región que la produce, en la temporada del año en que el empleo es escaso. Los impactos de su recolección parecen ser bajos para los ecosistemas (CECON, 2002), pero no así para la especie, la cual se ha visto afectada por los métodos de recolección de frutos empleados para su explotación i.e. al cortar las ramas completas para cosechar los frutos se elimina la posibilidad de que se produzca la dispersión natural de semillas.

Se reportan algunas poblaciones silvestres de *P. dioica* mayormente en el sur de Petén, aunque la frecuencia de individuos es baja en relación con la diversidad presente en su hábitat. La densidad poblacional de la pimienta gorda oscila entre 9 y 31 individuos/ha, lo que sugiere que se trata de una especie poco abundante en relación con las especies con las que se encuentra asociada. Los sitios de presencia de *P. dioica* dentro de la FTN se encuentran ubicados en áreas categorizadas por el MAGA como *sobre utilizados*, lo que sugiere que su presencia se encuentra limitada a remanentes boscosos o de sucesión vegetal. En Alta Verapaz los pobladores la utilizan para autoconsumo y venta local; lo

cual ha logrado un aumento en la densidad de la especie en el área ya que muchos agricultores han sembrado individuos de *P. dioica* en parcelas familiares, patios traseros y sitios baldíos, llevando semillas desde otros lugares. Adicionalmente en esta región se suelen seleccionar los ejemplares que son considerados hembra y de variedad chaparra. Al hacer esta selección no se toma en cuenta como está afecta la diversidad genética local. Actualmente, se reporta una mayor abundancia de *P. dioica* en sitios menos conservados que en sitios considerados como hábitat natural, debido al uso que se le da a la especie en la región (CECON/USAC, 2009).

Según Chinchilla García (2004), existen algunos estudios previos realizados sobre la especie en Alta Verapaz y el Petén i.e. López 1992; Gould, 1996 y Molina, 1999. Estos estudios proporcionan información sobre la estructura y densidad poblacional en estas áreas. También se han realizado diagnósticos de su presencia y usos en las áreas protegidas administradas por la Universidad de San Carlos, así como algunas tesis de grado orientadas a la obtención de aceites esenciales, como el presentado por Carías Villela (2017). Sin embargo, estos estudios no incluyen ningún aspecto de la diversidad genética o estructura poblacional de la especie. Hasta el momento, el único estudio que utiliza marcadores genéticos en *P. dioica* en Guatemala es el realizado por Centeno Alvarado (2017), quien realizó la caracterización morfométrica de la especie en Alta Verapaz. Este estudio fue el primero en utilizar marcadores genéticos morfométricos para determinar la variabilidad intra e inter poblacional de la pimienta gorda en la FTN, así como para determinar si existen diferencias entre las variedades “chaparra” y “de montaña” que son generalmente reconocidas por los comunitarios.

En enero de este año el Consejo Nacional de Áreas Protegidas modificó el cobro de aprovechamiento del fruto de la pimienta gorda en su actividad de exportación, como parte de una iniciativa para promocionar y fomentar el comercio de este producto. Dentro de esta iniciativa se busca promover la conservación y uso sostenible de la especie, y así propiciar las condiciones para atraer inversión intensiva con un contenido alto de conocimiento, de manera que el uso y aprovechamiento de la especie tenga el menor impacto sobre el ambiente y se fortalezca el mejoramiento de la productividad. Dentro de este marco, se hace imperativa la generación de conocimientos acerca de la diversidad intra e inter poblacional de este recurso, de manera que sea

posible generar planes de uso, manejo y comercialización que permitan conservar e incluso enriquecer el reservorio genético de la especie en el país.

## 8. **Objetivos (generales y específicos):**

### **General**

1. Determinar la diversidad genética de poblaciones silvestres y comerciales de *Pimenta dioica* en Guatemala.

### **Específicos**

1. Evaluar la efectividad de 15 cebadores RAPDs para determinar la diversidad genética de la *Pimenta dioica*.
2. Determinar la diversidad genética intra e inter poblacional de poblaciones silvestres y comerciales de *Pimenta dioica* utilizando marcadores moleculares RAPDs.
3. Evaluar el uso de poblaciones cultivadas de pimienta gorda en la Franja Transversal Norte como reservorios genéticos de la especie.
4. Generar datos que puedan ser utilizados para la elaboración de planes de manejo y explotación encaminados a preservar los recursos genéticos de *P. dioica*.

## 9. **Hipótesis:**

Los métodos tradicionales de aprovechamiento de pimienta gorda no han causado la reducción de la diversidad genética de las poblaciones cultivadas en la Franja Transversal del Norte.

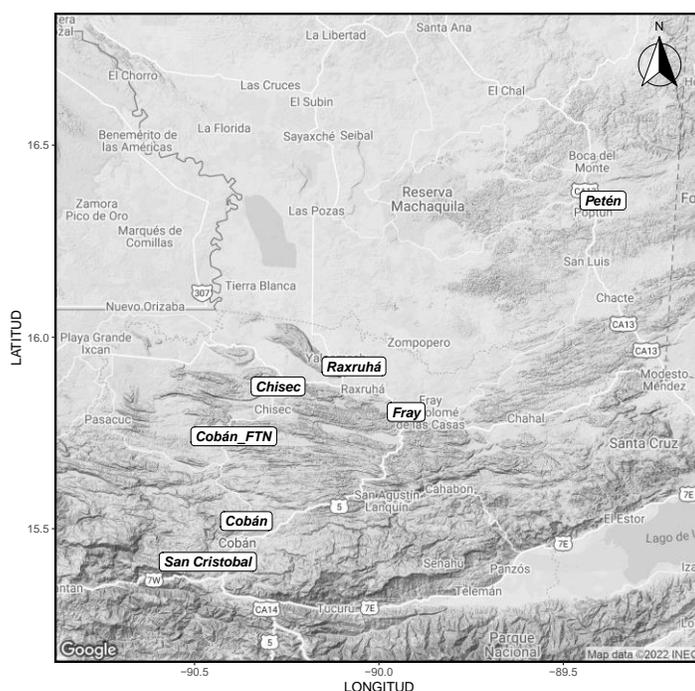
## 10. **Materiales y métodos**

### 10.1 **Enfoque de la investigación**

La investigación es cuantitativa ya que se determinarán los niveles de diversidad genética inter e intra poblacional de *Pimenta dioica*

## 10.3 Recolección de la información

En cada una de las siete localidades previamente seleccionadas se tomaron muestras de hojas jóvenes de pimienta, de al menos 10 árboles distintos. Debido a que son en su mayoría las plantas están sujetas a algún tipo de manejo y/o selección antropogénica, no se manejó una distancia mínima entre los árboles muestreados. Cada una de las muestras (alrededor de 5 g, debido a que las hojas son grandes y bastante gruesas) se colocó en una bolsa de cierre hermético etiquetada con los datos de colecta e identificación de la especie, a la que se agregó una pequeña cantidad de sílica gel, para evitar su pudrición durante el traslado al laboratorio. Las muestras fueron posteriormente colocadas en un congelador (-20°C), en las instalaciones del laboratorio de fitopatología la Universidad del Valle de Guatemala, hasta su extracción. En cada una de las localidades muestreadas se tomaron las coordenadas geográficas y la altura sobre el nivel del mar (Tabla 1). Las muestras fueron tomadas por conveniencia, en cada una de las localidades se realizaron caminatas al azar para la identificación visual de los individuos, luego se procedió a solicitar permiso al dueño de los árboles (y/o plantación)



para realizar el muestreo.

Figura 1. Mapa de poblaciones muestreadas. Un total de 69 arboles de *P. dioica* fueron muestreados en 7 poblaciones geográficas.

## 10.4 Técnicas e instrumentos

### *Extracción y purificación de ADN*

Se pesaron 50-65 mg de material vegetal congelado, el cual se colocó en un mortero al cual se agregó nitrógeno líquido, para proceder a su maceración, utilizando un pistilo. De esta manera se aseguró la ruptura de las paredes celulares y la eliminación de metabolitos secundarios. Para la extracción y purificación de ADN se utilizó el protocolo CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 5M, Tris HCl 1M, EDTA 0.5M, 1% PVP, 0.2%  $\beta$  mercaptoetanol) descrito por Doyle (1987). Para verificar la integridad del ADN obtenido se corrieron geles de agarosa-TAE al 0.5% y se midió su concentración y calidad utilizando un fluorómetro Quantus™ (Promega). El ADN aislado fue eluido en 100  $\mu$ L de tampón de elución (TE 1X) y se depositó en un congelador a  $-20$  °C hasta su uso.

### *Amplificación del ADN*

La amplificación por PCR se realizó en un volumen total de 25  $\mu$ l que (25-30 ng de ADN genómico (1  $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.1  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 0.5  $\mu$ l de cebador y 0.2 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 94°C seguido por 40 ciclos a 94°C por 20 s, 36°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min., utilizando 15 cebadores (OPB-01, OPB-02, OPB-04, OPB-05, OPB-06, OPB-08, OPB-10, OPB-11, OPB-12, OPB-13, OPB-14, OPB-15, OPB-16, OPB-17 y OPB-18) (Operon Technologies Inc., USA) seleccionados a partir de evaluaciones previas de estandarización. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa-TBE 1X al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio (0.1  $\mu$ g/mL) y revelados y fotografiados con luz

ultravioleta. El tamaño de los productos de amplificación se estimó comparando los amplicones con una escalera de 100 pb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.).

## 10.5 Procesamiento y análisis de la información

### *Análisis de la efectividad de los marcadores RAPDs*

Con el perfil de bandas obtenido del gel de agarosa, se generó una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) para cada uno de los loci amplificados con el programa PyElph v1.4 (Pavel & Vasile, 2012). A partir de esta, se calculó la heterocigosidad esperada (H): probabilidad de que un individuo sea heterocigoto para el locus en la población; contenido de información polimórfica (PIC): probabilidad de que el genotipo de una descendencia dada permita deducir, en ausencia de entrecruzamiento, cuál de los dos alelos de los padres recibió; relación múltiple efectiva (E): el número de loci polimórficos en el conjunto de germoplasma de interés analizado por fracción experimental de loci polimórficos; heterocigosidad promedio (Havp): heterocigosidad promedio calculada para todos los loci polimórficos; índice de marcador (MI): producto de la relación múltiple efectiva y la heterocigosidad esperada promedio para los marcadores polimórficos; poder discriminatorio (D): probabilidad de que dos individuos elegidos al azar muestren diferentes patrones de bandas y, por lo tanto, se distingan entre sí; poder de resolución (R): capacidad para distinguir entre dos muestras analizadas. Los índices mencionados fueron calculados utilizando el programa R v4.0.3 (R Core Team, 2020) basado en el código implementado en el programa en línea iMEC (Amiryousefi, Hyvönen, & Poczai, 2018).

### *Diversidad genética*

La matriz binaria con la información de los loci fue almacenada en el formato del programa GenAlEX v6.5 (Peakall & Smouse, 2012) y posteriormente convertida en un objeto de clase genind utilizando el paquete poppr (Kamvar et al., 2014) implementado en el programa R v4.0.3 (R Core Team, 2020). Para determinar la diversidad genética intrapoblacional se calcularon los índices de Shannon, heterocigosidad esperada (diversidad de Nei) con el paquete poppr y el porcentaje de loci

polimórfico, número de alelos diferentes y número de alelos efectivos con el programa GenoDive v3.05 (Meirmans, 2020)

## *Estructura genética de las poblaciones*

Para explorar la estructura genética se implementó un análisis de conglomerados jerárquico, el cual agrupa las muestras de pimienta con características genéticas similares. Utilizando el paquete poppr, se calculó la distancia genética de Nei, se aplicó el método de agrupamiento jerárquico UPGMA utilizando 1,000 réplicas para calcular el valor de soporte estadístico de bootstrap. Seguido, este se transformó en un árbol de clase phylo con el paquete ape (Paradis & Schliep, 2018) y se exportó como formato newick para su visualización con la herramienta en línea Interactive tree of Life (iTOL) v4 (Letunic & Bork, 2019). Este procedimiento se aplicó a nivel de poblaciones e individuos.

Para la inferencia de los grupos genéticos (subpoblaciones) y exploración de la estructura de las poblaciones de los árboles muestreados, se empleó un método de agrupamiento bayesiano utilizando el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000). El programa se ejecutó con 10,000 pasos incorporados, seguidos de 100,000 iteraciones de MCMC para el número de grupos  $K = 1$  a 10, con diez repeticiones para cada  $K$ . El modelo asumió una frecuencia de alelos correlacionada para las poblaciones y ascendencia mixta (mezcla) para los individuos. Debido a que se asumió una estructura débil, se implementó el modelo LOCPRIOR, que utiliza ubicaciones de muestreo como información previa para ayudar a la agrupación (Hubisz et al., 2009). Debido al muestreo desigual entre poblaciones geográficas, los parámetros alfa se establecieron en  $1 / K$ , siguiendo las recomendaciones (Wang, 2017).

Los archivos de salida fueron analizados con el paquete pophelper (Francis, 2017), implementado en R, aplicando el método de Evanno (Evanno et al., 2005). Con el mismo paquete se realizó el alineamiento de las matrices Q resultantes de STRUCTURE y se realizó la visualización con un gráfico de barras indicando el grado de ascendencia de cada grupo genético para cada individuo. La determinación del valor óptimo de  $K$  se comparó con los estimadores de Puechmaille (Puechmaille, 2016) implementado en el programa en línea STRUCTURE SELECTOR. Las proporciones de

ascendencia a nivel de poblaciones fueron visualizadas a través de un gráfico de torta sobre un mapa de ubicación de las poblaciones geográficas utilizando los paquetes maps y plotrix, implementados en R.

La asignación de la población de STRUCTURE se confirmó utilizando un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) (Jombart et al., 2010). El método implicó la identificación del número óptimo de grupos genéticos (K) implementado en el paquete adegenet (Jombart, 2008), y luego empleó el Criterio de Información Bayesiano (BIC) para elegir el número óptimo de grupos genéticos según el método del codo. Los grupos obtenidos se visualizaron con un diagrama de dispersión sobre los dos primeros discriminantes lineales y posterior visualización a través de un gráfico de barras mostrando el grado de mezcla genética. Adicionalmente se desarrolló un DAPC, utilizando la información a priori de los sitios de muestreo, por medio de la función dapc del paquete adegenet y se utilizó una función de validación cruzada (Xval.dapc) para confirmar el número correcto de componentes principales y funciones discriminantes a ser retenidas.

### *Diferenciación poblacional*

La estructura genética de las poblaciones se exploró mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) implementado en el paquete poppr. Se utilizaron los componentes de covarianza para calcular los índices de fijación  $\Phi$  e inferir el flujo de genes y la diferenciación existente entre poblaciones (Grünwald & Hoheisel, 2006). La significancia se evaluó con una prueba de aleatorización utilizando 1,000 permutaciones. El flujo de genes ( $N_m$ ) entre poblaciones se estimó mediante la ecuación  $N_m = 0.5 (1 - \Phi_{ST}) / \Phi_{ST}$ . Para evaluar el aislamiento por distancia, se aplicó una prueba de mantel sobre las matrices de distancias genéticas y geográficas utilizando 10,000 permutaciones con el paquete ade4 (Bougard & Dray, 2018). La diferenciación de poblaciones por pares se examinó con el índice  $G_{ST}$ , con 1,000 permutaciones, en el paquete mmod (Winter, 2012).

### *Cuello de botella genético*

Las disminuciones significativas en el tamaño efectivo de la población se obtuvieron con el programa Bottleneck v1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). El análisis se lleva a cabo a partir de datos de frecuencia de alelos y se basa en el principio de que las poblaciones que han sufrido un cuello de

botella genético presentan un número reducido de alelos (Nei & Roychoudhury, 1974). El modelo de mutación apropiado para los marcadores dominantes es el intermediario entre el modelo de alelo infinito (IAM) (Kimura & Crow, 1964) y el modelo de mutación paso a paso (SMM) (Kimura & Ohta, 1978). Por lo tanto, se utilizaron los modelos IAM y SMM con el sign test ( $\alpha = 0.05$ ) a partir de las frecuencias alélicas para detectar cuellos de botella genéticos significativos (Cornuet & Luikart, 1996).

## 11. Resultados

### *Análisis de la efectividad de los marcadores RAPDs*

Los índices polimórficos detallados de los cebadores RAPDs evaluados se dan en la Tabla 1. Se obtuvo un total de 126 bandas amplificadas con los 15 cebadores evaluados. Para cada cebador, el PIC es un indicador de la diversidad y frecuencia de los alelos generados entre las muestras. El promedio de PIC fue 0.3319 y el valor más alto se registró para el OPB-02 (PIC = 0.3756) seguido de OPB-08 (0.3533) mientras que el PIC más bajo lo presentó el OPB-13 (0.303). La heterocigosidad (H) varió de 0.2896 (OPB-14) a 0.4786 para el OPB-02 con una media de 0.4106 por cebador. La heterocigosidad media (Havp) osciló entre 0.00045 (OPB-04) y 0.00229 (OPB-17) con una media de Havp = 0.00082 por cebador.

Un factor extremadamente condicional sobre la magnitud del polimorfismo del cebador es la relación multiplex efectiva (EMR) que va desde 1.159 (OPB-17) a 3.869 (OPB-05) con un promedio de 2.362 por cebador. El índice de marcador (MI) se calculó para reconocer la utilidad de cada cebador RAPD en la pimienta, que fue máximo para OPB-02 (MI = 0.0027) seguido de OPB-08 (MI = 0.0026) mientras que el mínimo lo presentó el OPB-06 (MI = 0.00011) con una media de 0.0267 por cebador. Para determinar la precisión de profundidad del cebador, se determinó el poder discriminativo (D) con un índice medio de D = 0.907 y extendido de 0.843 (OPB-06) a 0.969 (OPB-08). El valor más alto del poder de resolución (Rp) fue de 6.927 (OPB-02), mientras que el más bajo fue Rp = 1.563 (OPB-16) con un promedio de 3.976 por cebador.

*Tabla 1. Estadísticas de polimorfismo para los cebadores RAPDs utilizados en pimienta gorda (P. dioica)*

Cebador	BA	BP	H	PIC	EMR	Havp	MI	D	Rp
OPB-01	8	7	0.4176	0.3304	3.724	0.00047	0.0017	0.911	4.753
OPB-02	13	13	0.4786	0.3756	3.173	0.00086	0.0027	0.946	6.927
OPB-04	12	11	0.4116	0.3328	3.768	0.00045	0.0017	0.916	5.304
OPB-05	8	7	0.4369	0.3221	3.869	0.00052	0.0020	0.896	2.811
OPB-06	8	8	0.3562	0.3541	1.855	0.00064	0.0011	0.843	2.811
OPB-08	11	10	0.3638	0.3553	1.405	0.00052	0.0026	0.969	6.376
OPB-10	7	6	0.4037	0.3361	3.086	0.00053	0.0016	0.921	3.072
OPB-11	8	6	0.4185	0.3300	2.086	0.00086	0.0018	0.911	3.246
OPB-12	12	9	0.4205	0.3291	2.405	0.00076	0.0018	0.909	4.579
OPB-13	6	5	0.3821	0.3030	3.086	0.00046	0.0014	0.934	2.144
OPB-14	6	4	0.2896	0.3514	1.434	0.00087	0.0012	0.943	3.681
OPB-15	7	7	0.4696	0.3073	2.260	0.00113	0.0025	0.858	3.130
OPB-16	3	3	0.3584	0.3446	1.637	0.00074	0.0012	0.945	1.536
OPB-17	6	5	0.4742	0.3051	1.159	0.00229	0.0023	0.851	2.985
OPB-18	11	10	0.4774	0.3036	2.362	0.00115	0.0027	0.845	6.289
Media	8.4	7.4	0.4106	0.3319	4.753	0.00082	0.0267	0.907	3.976

BA – bandas amplificadas; BP – bandas polimórficas; H – heterocigosidad esperada; PIC – Contenido de información polimórfica; E – Relación múltiple efectiva; Havp – heterocigosidad promedio de todos los loci; MI – índice de marcador; D – poder discriminatorio; Rp – poder de resolución

### *Diversidad genética*

El porcentaje mínimo, máximo y promedio de loci polimórficos fue de 62.79, 80.16 y 71.77 %, respectivamente. Los índices de diversidad genética, incluyendo medidas de riqueza y abundancia genotípica, mostraron una alta diversidad genética en todas las poblaciones: el número de alelos diferentes se ubicó dentro del rango de 1.31 (Chisec) a 1.61 (San Cristóbal), número de alelos efectivos de 1.17 (Cobán) a 1.44 (San Cristóbal), índice de Shannon de 0.23 (Cobán) a 0.40 (Petén), y la heterocigosidad esperada (diversidad de Nei) entre 0.17 (Chisec) y 0.28 (San Cristóbal) (Tabla 2.).

*Tabla 2. Ubicación geográfica y estadísticas de resumen de la diversidad genética de las poblaciones de P. dioica en Guatemala.*

Población	Manejo	Región	Latitud	Longitud	N	PLP	Na	Ne	H	H <sub>exp</sub>
Petén	Natural	Norte	16.30	-89.40	10	73.81	1.50	1.39	0.40	0.24
San Cristóbal			15.36	-90.48	10	80.16	1.61	1.44	0.35	0.28
Cobán			15.47	-90.37	10	69.84	1.39	1.17	0.23	0.18
Chisec	Cultivada	Sur	15.82	-90.29	10	62.70	1.31	1.37	0.30	0.17
Raxruhá			15.87	-90.08	10	73.81	1.46	1.35	0.26	0.19
Cobán FTN			15.69	-90.41	9	71.43	1.42	1.33	0.29	0.20
Fray			15.75	-89.94	10	70.63	1.47	1.32	0.28	0.20
Promedio						71.77	1.45	1.34	0.30	0.21

N – Número de muestras; PLP – Porcentaje de loci polimórfico; Na – número de alelos diferentes; Ne – número de alelos efectivos; H – índice de diversidad de Shannon-Wiener; H<sub>exp</sub> – diversidad genética de Nei 1978 o heterocigosidad esperada

## *Estructura genética de las poblaciones*

El análisis UPGMA para determinar la relación genética entre poblaciones mostró la formación de dos clados con un valor de soporte de bootstrap de 1,000 iteraciones. El primer clado lo conforman las poblaciones de Chisec, Cobán, Fray Bartolomé de las Casas, Petén, Cobán FTN y Raxruhá; mientras que el segundo clado incluye únicamente a la población de San Cristóbal. El dendrograma mostró una similitud del 65% entre ambos clados (Figura 2A). A nivel de individuos, el análisis de relaciones genéticas mostró la formación de dos clados. El dendrograma mostró que uno de los clados incluye principalmente, a todos los individuos de la población de San Cristóbal; mientras que el segundo clado exhibió una mezcla de los individuos de las restantes 6 poblaciones (Figura 2B).

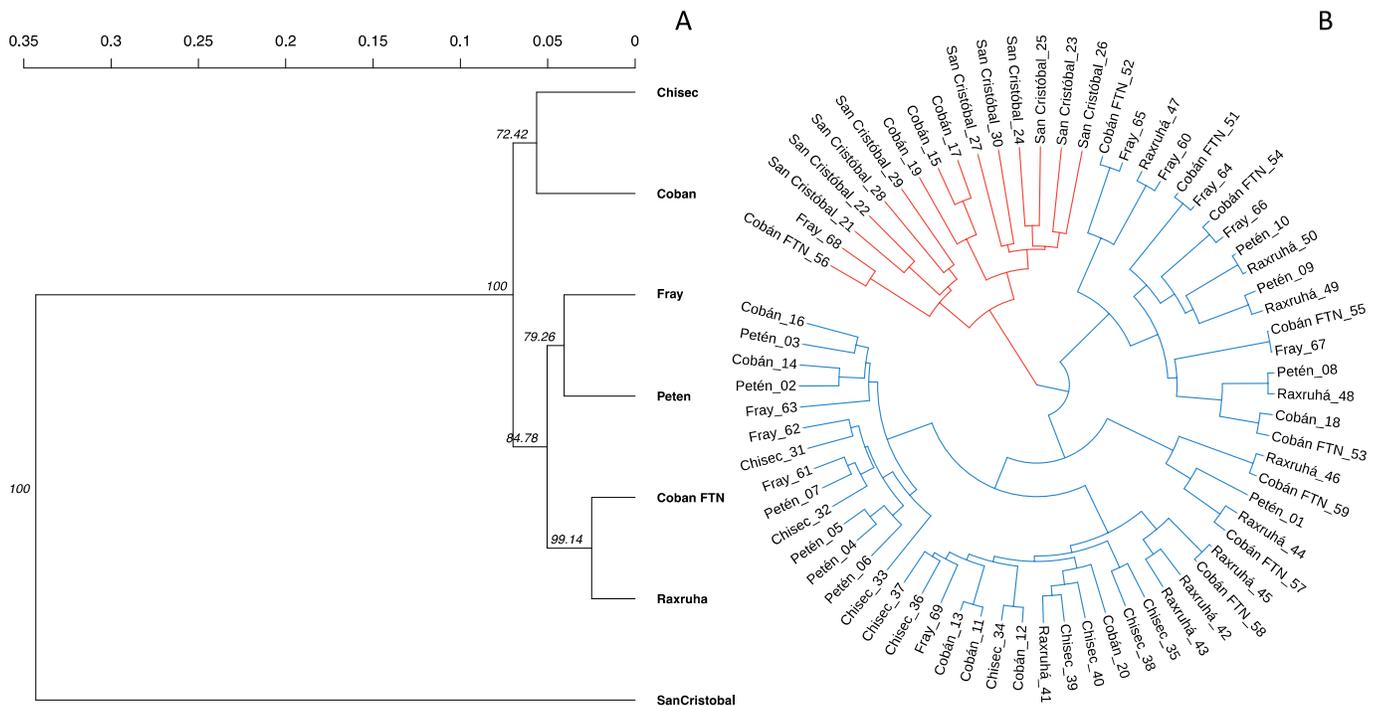


Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei a nivel jerárquico de: A) poblaciones e B) individuos de *P. dioica*. Los valores en los nodos de las ramas representan el soporte estadístico bootstrap de 1,000 iteraciones.

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) identificó una estructura similar, al utilizar información *a priori* del muestreo, indicando la separación de la población de San Cristóbal y una alta conectividad entre las restantes poblaciones (Figura 3).

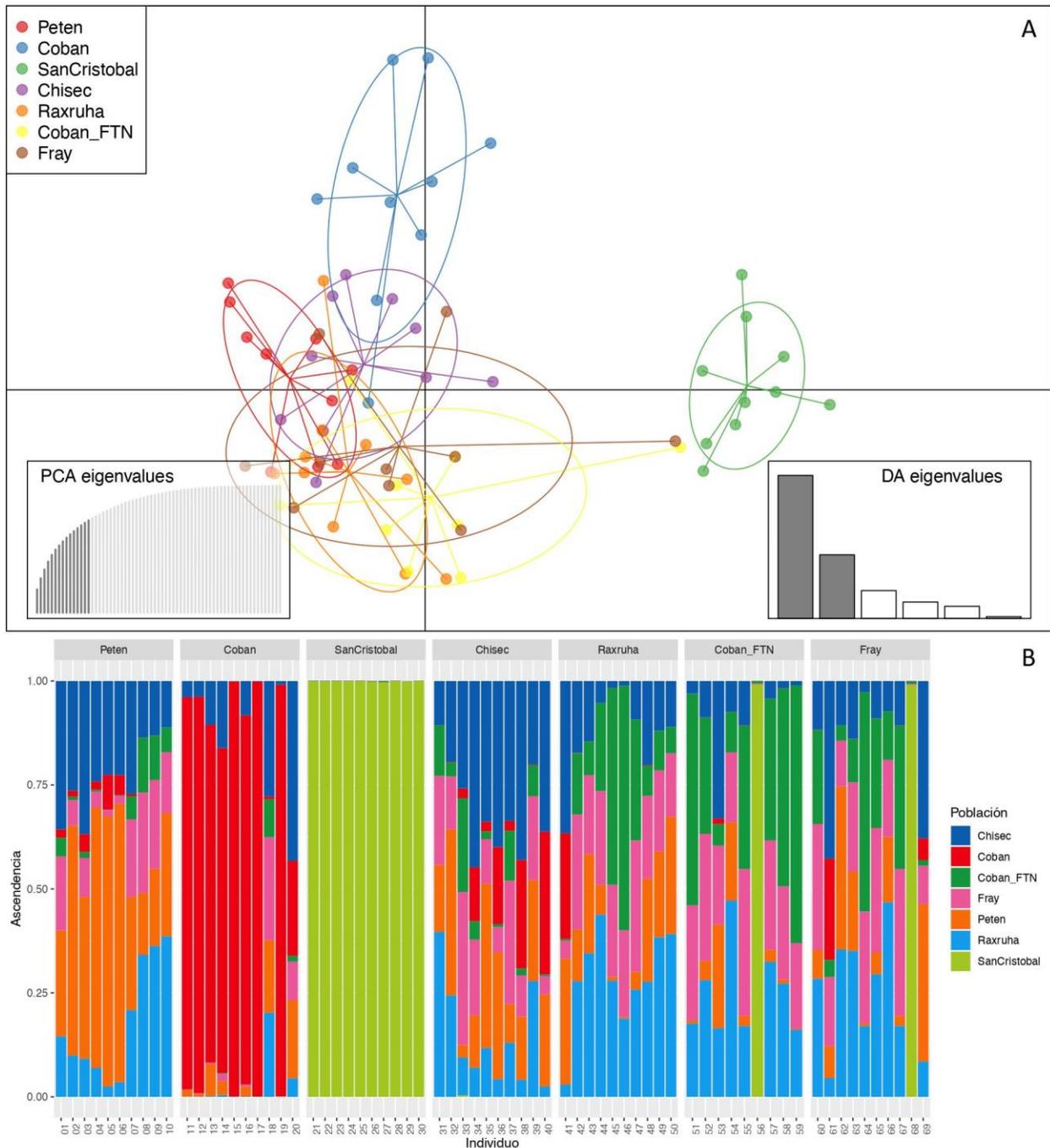


Figura 3. Estructura genética poblacional, obtenida a partir de un análisis DAPC, de 69 individuos de pimienta gorda provenientes de 7 poblaciones distintas. (A) Diagrama de dispersión de las dos primeras funciones discriminantes. Cada color representa una población (IC = 95%) que se muestra como elipses. (B) Gráfico de barras del análisis DAPC en donde cada individuo está representado por una línea vertical de color. El mismo color en diferentes individuos indica que pertenecen al mismo grupo.

La estimación de los valores K, basada en los métodos de Evanno y Puechmaille, reveló que el valor K más probable para el conjunto de datos genéticos era tres. Esto propone que los 69 individuos de pimienta se puedan agrupar en 3 subpoblaciones o conglomerados. Cuando  $K = 3$ , la estructura genética sugiere similitud entre las poblaciones de Petén, Cobán, Chisec, Raxruhá, Cobán FTN y Fray con ascendencia representada en color verde y azul (Figura 4A bloque medio). La población de San Cristóbal mostró una ascendencia representada principalmente por el color rojo. Cuando  $K = 2$  y  $K = 4$  (Fig. 4A, bloques superior e inferior respectivamente) la estructura genética sugiere, una vez más, una alta similitud entre las poblaciones Petén, Cobán, Chisec, Raxruhá, Cobán FTN y Fray con ascendencia representada por los mismos grupos (cluster), mientras que San Cristóbal se mantuvo como una población separa. La asignación de ascendencia a cada grupo genético cuando  $K = 3$  a nivel de poblaciones, confirmó la diferenciación de la población de San Cristóbal, mientras que las restantes poblaciones mostraron un patrón de ascendencia mezclada de los grupos genéticos (Figura 4B).

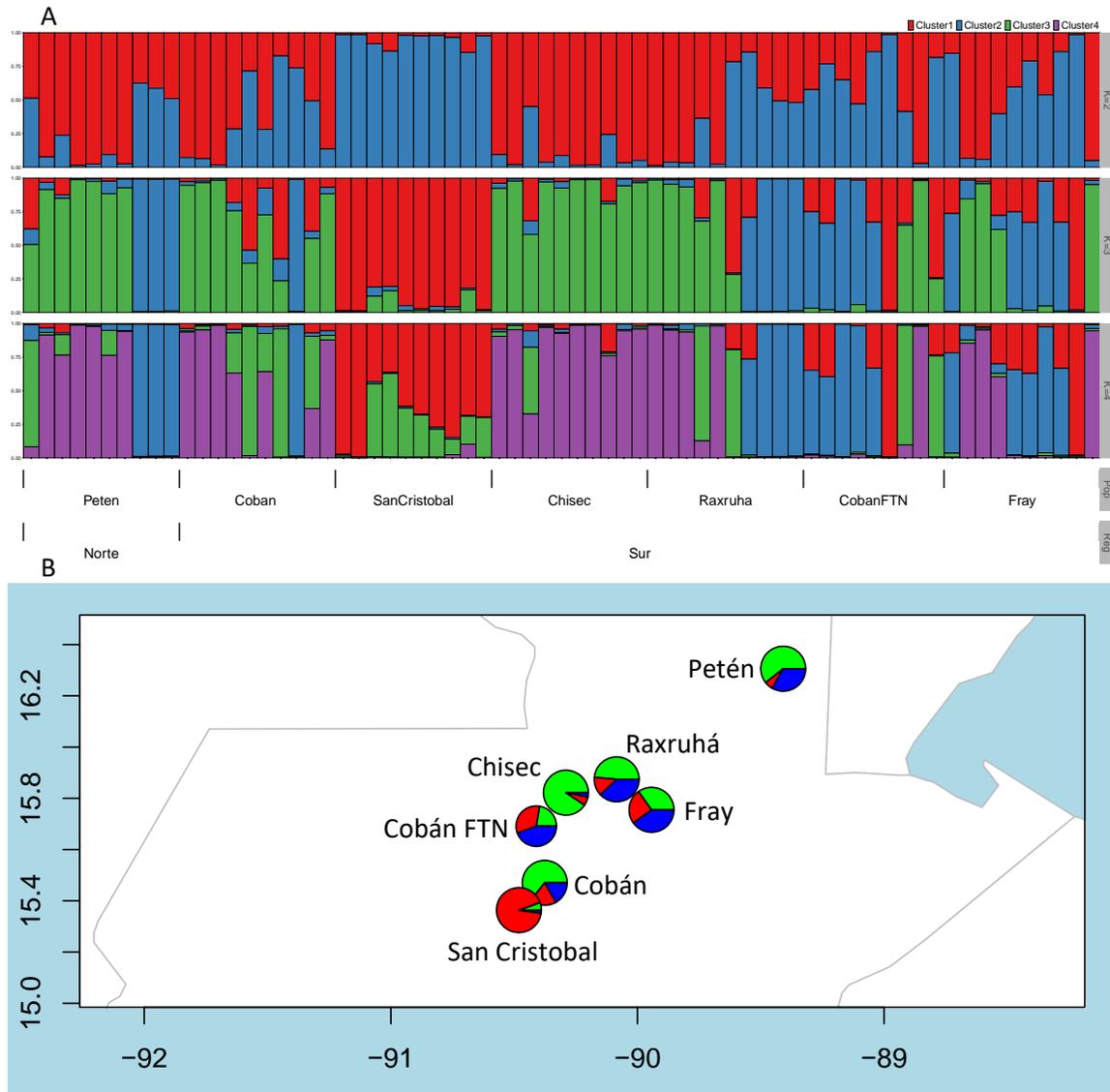


Figura 4. A) Análisis de agrupamiento bayesiano para las poblaciones de *P. dioica* utilizando STRUCTURE. La figura muestra el agrupamiento para  $K = 2$  (bloque superior)  $K = 3$  (bloque medio) y  $K = 4$  (bloque inferior). Cada individuo está representado por una barra vertical dividida en

segmentos de colores distintos que representan las fracciones de ascendencia estimadas del individuo. El mismo color en diferentes individuos indica cercanía genética. B) Gráficos de torta con la proporción de asignación de cada uno de los 3 grupos genéticos (al asumir  $K=3$ ) en cada población.

El análisis DAPC (Figura 5) fue consistente con la asignación poblacional de STRUCTURE, cuando no se utilizó información *a priori* del muestreo. Para describir los datos, se retuvieron 35 componentes principales, que representan el 67,5% de la varianza total, y 2 funciones discriminantes. La función `find.cluster` detectó tres grupos asociados con el valor del criterio de información bayesiano (BIC) según el método del codo (Figura 5A). Estos valores fueron confirmados por un análisis de validación cruzada. El DAPC (Figura 5B) mostró tres grupos, con el discriminante lineal 1 separando los grupos 1 y 3 (a la derecha) del grupo 2 (a la izquierda). El discriminante lineal 2 solo separó el grupo 1 del 3. De los tres conglomerados, el conglomerado 2 fue el más grande con 34 individuos, seguido del conglomerado 1 con 18 individuos y finalmente el conglomerado 3 con 17 muestras individuales (Figura 5B). Al realizar la asignación de ascendencia para  $K = 3$ , se observa una clara separación de la población de San Cristóbal, mientras que la restante poblaciones exhibieron mayor conectividad debido a la mezcla de grupos genéticos (Figura 5C).

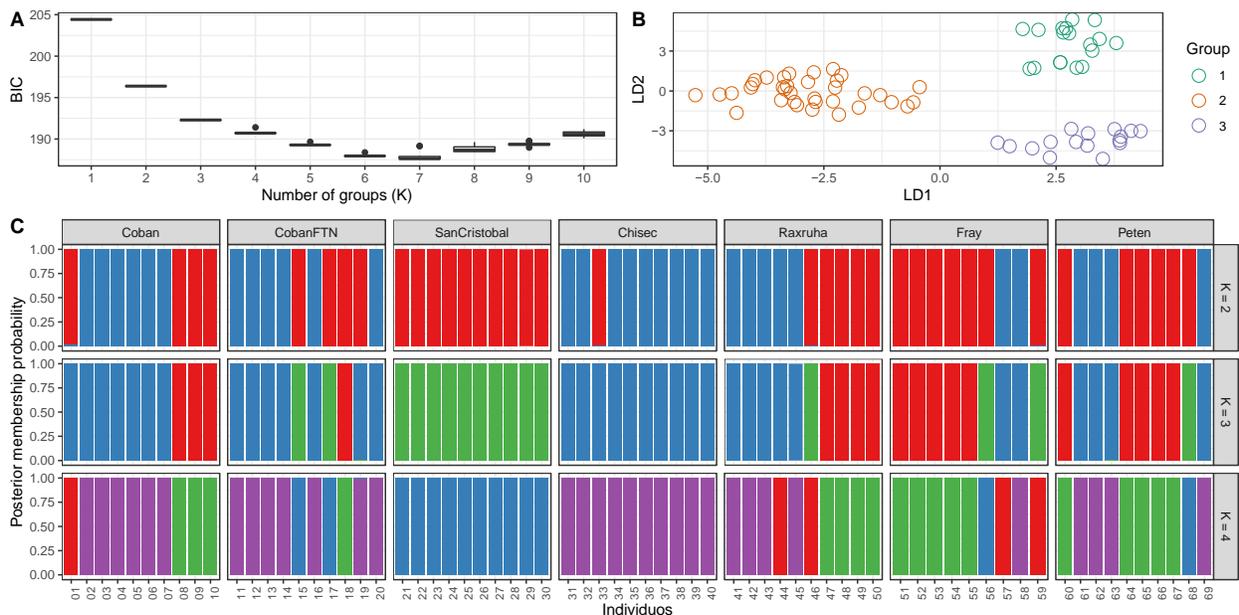


Figura 5. A) BIC para inferir el número más probable de grupos genéticos ( $K = 3$ ). B) Diagrama de dispersión DAPC de los 69 individuos de *P. dioica* agrupados en 3 grupos genéticos. C)

Representación de diagrama de barras de los resultados de DAPC. Las probabilidades de asignación a cada grupo genético se presentan con diferentes colores que representan los grupos genético. Se muestran las probabilidades de asignación a  $K = 2$ ,  $K = 3$  y  $K = 4$ .

### *Diferenciación poblacional*

El análisis molecular de varianza (AMOVA) indicó que la mayor parte de la varianza genética se encuentra entre las poblaciones (83.44 %), seguida por las poblaciones agrupadas por región (16.56%), mientras que solamente un 0.00031% de la varianza se encuentra al comparar entre regiones. Las variaciones de diversidad encontradas fueron estadísticamente significativas ( $p < .01$ ) al comprar entre poblaciones y entre poblaciones dentro de cada región. Para el caso de la comparación entre regiones, no se detectó diferencia significativa ( $p > .05$ ) (Tabla 3).

*Tabla 3. Detalle del análisis molecular de varianza AMOVA*

Nivel jerárquico	Suma de cuadrado	Componente de la varianza	Porcentaje de variación	$\Phi$ Phi	$p$
<b>Poblaciones</b>					
Entre poblaciones	14929.88	91.59	83.44	$\Phi_{CT} = 0.114$	.001
Entre poblaciones dentro regiones	1202.47	6.35	16.56	$\Phi_{CS} = 0.019$	.001
Entre regiones	109.48	0.05	0.0031	$\Phi_{ST} = -0.09$	.711

El flujo genético ( $Nm$ ) entre poblaciones fue de 3.89. Esto supone que existen un intercambio de alelos entre las poblaciones estudiadas, sin embargo, este flujo no se presenta entre todas las poblaciones, sugiriendo la existencia de un patrón en el intercambio genético. El análisis de diferenciación poblacional por pares mostró que 15 de las 21 comparaciones exhibieron valores estadísticamente significativos ( $p < .05$ ). Al analizar el efecto de la distancia sobre el aislamiento genético entre las poblaciones, utilizando la prueba de mantel, no se encontró correlación entre estas ( $p > .05$ ), en consecuencia, se determinó que las poblaciones no exhiben de aislamiento por distancia (IBD).

*Tabla 4. Análisis de diferenciación por comparación pareada de poblaciones.*

Población	Petén	Cobán	San Cristobal	Chisec	Raxruhá	Cobán FTN	Fray
Petén	--	0.024*	0.001*	0.006*	0.111	0.019*	0.076
Cobán	0.242	--	0.001*	0.023*	0.01	0.006*	0.037*
San Cristobal	0.526	0.433	--	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*
Chisec	0.299	0.249	0.555	--	0.02*	0.001*	0.001*
Raxruhá	0.234	0.243	0.477	0.267	--	0.498	0.062
Cobán FTN	0.275	0.26	0.363	0.337	0.19	--	0.854
Fray	0.241	0.232	0.39	0.312	0.231	0.172	--

Los valores por encima de la diagonal indican la magnitud de diferenciación (Gst); los valores por debajo de la diagonal indican el valor de probabilidad. \* Significancia con valor de  $p < .05$

### ***Cuello de botella genético***

Usando el modelo de alelo infinito (IAM) y el modelo de mutación paso a paso (SMM), se identificaron señales de cuello de botella en cada población con una proporción de exceso/deficiencia de heterocigosidad que se desvió significativamente de la proporción esperada (1:1) en el equilibrio mutación-deriva ( $p < .05$ ) (Tabla 5).

*Tabla 5. Análisis de cuello de botella entre mutación y deriva genética para las poblaciones de P. dioica utilizando los modelos IAM y SMM.*

Poblaciones	IAM				SMM			
	n	He	Hd	p	n	He	Hd	p
Petén	51.63	31	58	0.010*	41.56	36	53	0.014*
Coban	58.57	78	23	0.001*	47.15	65	36	0.001*
San Cristóbal	51.08	53	35	0.038*	40.85	63	25	0.001*
Chisec	45.87	58	21	0.001*	36.94	40	39	0.028*
Raxruhá	53.62	67	26	0.002*	43.42	49	44	0.015*
Cobán FTN	50.91	72	18	0.001*	40.36	48	42	0.05*
Fray	54.39	66	27	0.008*	43.46	43	50	0.05*

n – número esperado de loci con exceso de heterocigosidad; He – número de loci con exceso de heterocigosidad; Hd – número de loci con déficit de heterocigosidad; P –probabilidad; IAM – modelo de alelos infinitos y SMM – modelo de mutación por pasos; \* – significativo al 5% de probabilidad

## 12. Discusión

Según Amiryousefi y colaboradores (2018), existen dos dimensiones principales de excelencia e informatividad del polimorfismo en los marcadores moleculares: la heterocigosidad (H) y el contenido de información polimórfica (PIC). Estos índices se midieron a partir de los datos obtenidos de los cebadores RAPDs luego de la caracterización del ADN genómico de cada genotipo de *P. dioca*. El uso de los códigos desarrollados por Amiryousefi y colaboradores (2018) en el entorno de programación R, resultó ser una opción altamente recomendada para la caracterización de los RAPDs. Eso es debido a la facilidad de modificación de las líneas de código en función de requerimientos más específicos por el usuario. Además, los resultados obtenidos fueron congruentes con otros programas bioinformáticos de interfaz gráfica, sin embargo, el uso de los códigos mencionados facilita reproducibilidad de resultados y difusión de métodos de análisis entre investigadores.

El rango de valores de H y PIC para un marcador binario o dominante es máximo de 0 (monomórfico) a 0,5 (altamente sensible, con múltiples alelos en una frecuencia idéntica) debido a que se suponen dos alelos por locus y ambos están influenciados por el número y frecuencia de alelos (Ahmed, Masoud, & Zedan, 2018). La estimación del valor de PIC ofrece una proyección del poder discriminatorio de un locus al considerar no solo los números de alelos sino también las frecuencias relativas de esos alelos (De Riek, Calsyn, Everaert, Van Bockstaele, & De Loose, 2001). El contenido de información polimórfica (PIC) es la probabilidad de exposición del polimorfismo del marcador según el número de alelos detectables y su distribución de frecuencia. Además, el índice PIC indica sobre mejores fuentes de variación que ayudan a evaluar la diversidad genética y las relaciones inter o intra entre genotipos. Desde esta perspectiva, los marcadores OPB-02 y OPB-08 exhibieron los valores de PIC más altos, por lo cual pueden ser recomendados para futuras caracterizaciones moleculares que tenga como objetivo la identificación de genotipos diversos para su aprovechamiento en programas de mejoramiento o conservación de la especie.

El poder de resolución (RP) es un índice de la capacidad de separación de un determinado marcador de alto impacto en la selección de genotipos diversos, por lo que nuevamente los marcadores OPB-02 y OPB-08 deberán ser incluidos en evaluaciones que busquen diferenciar entre accesiones de *P. dioica*. Considerando el rango, los valores altos de PIC y H indican la capacidad discriminatoria avanzada de los marcadores utilizados en este estudio. Por otra parte, el MI destaca el poder distintivo de cada cebador, por lo que, además de recomendar el par de marcadores recién mencionados, también puede incluirse el OPB-15. En cuanto al poder discriminante (D), un valor más cercano a 1 indica una menor posibilidad de confusión al momento de diferenciar la huella genética los genotipos de pimienta gorda. Por tal motivo, los marcadores OPB-08, OPB-02 y OPB-16 son altamente convenientes al momento de discriminar entre futuras accesiones de pimienta que resulten de programas de mejoramiento para la protección del recurso fitogenético.

Basado en la información publicada, este es el primer estudio que emplea marcadores moleculares para estimar la estructura poblacional y la diversidad genética de *P. dioica* en una amplia zona de distribución natural en Guatemala. En este estudio, el uso de marcadores moleculares tipo RAPD reveló un alto nivel de polimorfismo en las poblaciones analizadas (71.77%), siendo Petén y San Cristóbal las localidades que exhiben los valores más altos para los índices de Shannon y Nei. Estos datos son concordantes con poblaciones naturales que han sido poco afectadas por procesos de selección artificial (Saldaña et al., 2021). Al comparar los parámetros de diversidad (PLP, H y  $H_{exp}$ ) Petén y San Cristóbal, al ser poblaciones de regeneración natural con poca presión por extracción de los frutos, exhibieron una diversidad genética ligeramente mayor que las poblaciones cultivadas. Esto sugiere que tanto la selección artificial, con fines de aprovechamiento, como los métodos de extracción tradicionales, han afectado los niveles de diversidad genética de la especie al disminuir la riqueza alélica y homogeneizar las poblaciones, debido a los pocos genotipos que se han seleccionado. Esto es debido, principalmente, a que son genotipos altamente productivos y en muchos casos, presentan menor altura que los árboles silvestres, lo que facilita la colecta de sus frutos (Caal, E. y Cuz, A.; Técnicos, AGEXPORT, 2017 comunicación personal).

Otros estudios realizados en especies forestales, también confirmaron que las poblaciones silvestres suelen mantener niveles más altos de diversidad genética en comparación con las poblaciones cultivadas (Lu, Chen, Wang, Egan, & Fu, 2015; Tuisima-Coral, Cepková, Weber, &

Lojka, 2020) debido a que no se encuentra bajo presión de selección y/o extracción de sus frutos. Es conocido que mantener una alta diversidad genética en las poblaciones naturales es importante, ya que reduce el riesgo de extinción local en condiciones naturales (O’Neill et al., 2001). Sin embargo, mantener esta diversidad en poblaciones cultivadas, o con algún grado de manejo, también es importante ya que éstas pueden ayudar a mantener saludable el reservorio genético de la especie, sobre todo si ésta ha visto severamente reducida su área de distribución natural, como es el caso de la pimienta gorda.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones es informativo para comprender su diversidad genética. En este estudio, los resultados del UPGMA y DAPC, con información a priori acerca de sus sitios de colecta, revelaron que las 69 muestras de *P. dioica* forman dos grupos bien definidos, mostrando una clara separación de la población de San Cristóbal del resto de poblaciones, las cuales se concentraron en un segundo grupo. Los resultados obtenidos por STRUCTURE y el DAPC sin información a priori fueron similares. Esta estructura es concordante con la información recopilada al momento del muestreo, ya que los registros indican que San Cristóbal es una población predominantemente remanente, con poco o ningún manejo, por lo que representa en gran manera el genotipo nativo de la FTN. Por otra parte, en el resto de localidades de la FTN se han hecho introducciones de material proveniente de Petén, el cual muestra características fenotípicas que favorecen la explotación de sus frutos (i.e. los árboles presentan menor altura, árboles “hembra”, altamente productivos,) (propietarios plantaciones 2016, conversación personal). Esto sugiere que la selección e introducción intencional afecta la estructura de las poblaciones (Saldaña et al., 2021) y explica el patrón débil de estructuración poblacional.

El AMOVA demostró que la mayor variación genética se encuentra entre las poblaciones de pimienta (83.44%), resultado que fue confirmado por el análisis de diferenciación poblacional ( $\Phi_{CT} = 0.114$ ,  $p < .001$ ). Esto puede explicarse dado el método de reproducción sexual de la pimienta. En general, este es el caso de los árboles tropicales, y especialmente de aquellos que son polinizados y/o dispersados por el viento, por lo que tienden a presentar niveles significativos de variación genética a escala espacial local (Tuisima-Coral et al., 2020). Por otra parte, la poca variación entre regiones, detectada por el AMOVA, puede ser explicada por el alto valor del flujo genético ( $Nm = 3.89$ ) que genera la ausencia de estructura poblacional (Martin et al., 2020). Esta situación también se observó

con el análisis de comparación pareada entre las poblaciones de la FTN y Petén ( $p < .05$ ), por lo estas pueden ser consideradas como una subpoblación. El impacto de un alto flujo genético, mediado por el intercambio de germoplasma entre agricultores, para generar una baja estructuración poblacional, también fue identificado en el cultivo de aguacate en Guatemala (Ruiz-Chutan et al., 2020). Los factores geográficos y climáticos también pueden afectar la diferenciación genética, y sus efectos deben evaluarse en futuros estudios de *P. dioica* (Tong et al., 2020; Wang, Mao, Zhao, & Wang, 2013).

Por otra parte, el desvío en el equilibrio mutación-deriva (exceso de heterocigotos), como el encontrado en las poblaciones estudiadas, sugiere una reducción reciente del tamaño efectivo de las mismas (Cornuet & Luikart, 1996). Este hallazgo puede explicarse gracias a los reportes de los productores de la FTN, quienes indican sobre una disminución intencional de las poblaciones naturales para introducir fenotipos de menor altura que facilitan la colecta de los frutos verdes, ya que esta se sigue realizando de forma tradicional, es decir, escalando a los árboles para agitar las ramas y así hacer caer los frutos. A pesar de esto, actualmente las poblaciones estudiadas de *P. dioica*, tanto naturales como cultivadas, exhiben niveles moderadamente altos de diversidad (PLP, H,  $H_{exp}$ ) por lo que pueden ser utilizadas como reservorios genéticos. No obstante, el reducido número de alelos raros encontrados (por debajo del número esperado bajo un equilibrio mutación - deriva) indican que a futuro puede darse una fuerte disminución en esta (Luikart & Cornuet, 1998; Cornuet & Luikart, 1996; Maruyama & Fuerst, 1985). Además, se espera que las poblaciones que han sufrido un evento de cuello de botella reciente muestren en la mayoría de loci un exceso de heterocigotos, esto como resultado de la pérdida de alelos raros (Osborne et al., 2016) como lo encontrado en el presente estudio.

Los datos obtenidos son esenciales para apoyar programas de conservación y mejoramiento de *P. dioica* en Guatemala. Estos indican que la determinación de poblaciones prioritarias para la conservación es fundamental para apoyar la viabilidad económica del cultivo de pimienta. Por ejemplo, las poblaciones naturales de Petén y San Cristóbal presentaron valores altos de diversidad y deberían ser priorizada en las estrategias de conservación debido a que muestra disminuciones poblacionales importantes. Adicionalmente, las restantes poblaciones de la FTN presentaron cuellos de botella e índices de diversidad ligeramente más bajos, lo que las convierte en una prioridad para la conservación de los recursos genéticos remanentes, además de poseer genotipos de alto valor productivo por ser selecciones de los productores locales. La información generada en este estudio

puede ser utilizada como base para el diseño de programas conservación y estrategias de manejo informado de la especie, así como la implementación de bancos de germoplasma, sin embargo es necesario ampliar la zona de muestreo, así como el número de muestras trabajadas para tener un panorama más acertado de la situación real del reservorio genético de la especie en el país.

Finalmente, los marcadores RAPD fueron exitosos y efectivos para la evaluación de la diversidad genética y la estructura de las poblaciones de *P. dioica* en diferentes etapas del proceso de domesticación. La diversidad genética parece ser ligeramente mayor en las poblaciones naturales en comparación con las poblaciones cultivadas, mientras que la baja estructuración poblacional refleja la influencia de la movilización de germoplasma por parte de los productores. Los resultados también sugieren la presencia de un significativo cuello de botella genético en todas las poblaciones. Parece existir una diferenciación significativa entre las poblaciones naturales y cultivadas, un resultado presentado con prudencia dado el pequeño tamaño de la muestra empleada. Se recomienda la conservación *in situ*, *circa situ*, *ex situ* (bancos de germoplasma) y la gestión sostenible tanto de las poblaciones regeneradas de forma natural como de las cultivadas, para mantener los recursos genéticos de *P. dioica* a fin de hacer frente a la posible depresión por endogamia y los cambios ambientales. Para aumentar la variación genética en las poblaciones cultivadas, la recolección de semillas de *P. dioica* en un amplio rango geográfico (incluyendo varios rodales naturales) para incrementar el flujo genético y el establecimiento de plántulas y huertos semilleros clonales.

## 11. Referencias

- Ahmed, M. Z. S., Masoud, I. M., & Zedan, S. Z. A. (2018). Genetic diversity and relationship among nine cultivated flax genotypes ( *Linum usitatissimum* L .) based on SCoT markers. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 8(4), 1480–1490.
- Amiryousefi, A., Hyvönen, J., & Poczai, P. (2018). iMEC: Online marker efficiency calculator. *Applications in Plant Sciences*, 6(6), e1159. <https://doi.org/10.1002/aps3.1159>
- Anastacio-Martínez, N. D., Franco-Maass, S., Valtierra-Pacheco, E., & Nava-Bernal, G. (2016). Aprovechamiento de productos forestales no maderables en los bosques de montaña alta, centro de México Utilization of non-timber forest products in the high mountain forests of central Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(737), 21–38.
- Basak, M., Uzun, B., & Yol, E. (2019). Genetic diversity and population structure of the Mediterranean sesame core collection with use of genome-wide SNPs developed by double digest RAD-Seq. *PLoS ONE*, 14(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223757>
- Carías Villela, K. F. (2017). *Evaluación del rendimiento de la extracción y caracterización fisicoquímica del aceite esencial obtenido de las hojas y frutos de la pimienta gorda (Pimenta dioica (L.)Merrill), cultivada en Alta Verapaz y Petén realizado a escala laboratorio*. Tesis de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Castillo, J. (2012). *Manual técnico para productores - Cultivo de la Pimienta Gorda*. Siuna: Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit.
- CECON. (2002). *Plan maestro Biotopo Protegido Cerro Cahú* (p. 90). p. 90. Guatemala.
- CECON, & USAC. (2009). *Diagnóstico de Áreas Protegidas y Lineamientos para Sostenibilidad USAC/CECON*. Guatemala.

- Centeno-Alvarado, D. (2017). *Caracterización morfológica de Pimenta dioica (L.) Merrill (Myrtaceae) en Alta Verapaz, Franja Transversal del Norte, Guatemala*. Tesis de grado. Universidad del Valle de Guatemala.
- Chinchilla-García, J. J. (2004). *Inventario y propuesta de manejo de las poblaciones de pimienta gorda (Pimenta dioica (L.) Merrill) y chicozapote (Manilkara achras (Mill) Fosberg) en la zona de uso especial del Parque Nacional Yaxhá, en la Reserva de la Biósfera Maya*. Tesis de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- CONAP. (n.d.). Se reduce tarifa para exportar pimienta.
- Cordero, J., & Boshier, D. (2004). *Árboles de Centroamérica: un Manual para Extensionistas*. Turrialba, Costa Rica: CATIE/OFI.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001–2014. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.4.2001>
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1254–1265. <https://doi.org/10.1007/s001220100710>
- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin Botanical Society of America*, 19, 11–15.
- Fuentes-Fiallo, V. R., Lemes Hernández, C. M., Sánchez Pérez, P., & Rodríguez Ferradá, C. A. (2000). Sobre la multiplicación de Pimenta dioica (L.) Merrill. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(2), 51–55.
- Gillies, A. C. M., Cornelius, J. P., Newton, A. C., Navarro, C., Hernández, M., & Wilson, J. (1997). Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species Cedrela odorata L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, 6(12), 1133–1145. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00287.x>
- Gillies, A. C. M., Navarro, C., Lowe, A. J., Newton, A. C., Hernández, M., Wilson, J., & Cornelius,

- J. P. (1999). Genetic diversity in mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity*, 83(6), 722–732. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1999.00626.x>
- Gleydes-Morgante, P., Sebastião, I., Duarte Silveira, L. E., Mori, G. M., Conte, M., & Coffani-Nunes, J. V. (2012). Development of microsatellite markers for *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae), a wild South American species. *American Journal of Botany*, 99(11). <https://doi.org/10.3732/ajb.1200167>
- Godoy-Liere, C. E. (2010). *Propuesta para elaborar planes de manejo integrados de recursos forestales no maderables en la reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Grattapaglia, D., Vaillancourt, R. E., Shepherd, M., Thumma, B. R., Foley, W., Külheim, C., ... Myburg, A. A. (2012, June). Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. *Tree Genetics and Genomes*, Vol. 8, pp. 463–508. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0491-x>
- Jiménez, P., & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*, 9(2), 237–248.
- Li, Y. L., & Liu, J. X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), 176–177. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12719>
- Lu, Y.-J., Chen, C., Wang, R.-H., Egan, A. N., & Fu, C.-X. (2015). Effects of domestication on genetic diversity in *Chimonanthus praecox*: Evidence from chloroplast DNA and amplified fragment length polymorphism data. *Journal of Systematics and Evolution*, 53(3), 239–251. <https://doi.org/10.1111/jse.12134>
- Macia-Barco, J. M. (1998). La pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merrill, Myrtaceae) en la Sierra Norte de Puebla (México). *Anales Jard.Bot.Madrid*, 56(2), 337–349.

- Martin, S. L., Benedict, L., Wei, W., Sauder, C. A., Beckie, H. J., & Hall, L. M. (2020). High gene flow maintains genetic diversity following selection for high EPSPS copy number in the weed kochia (Amaranthaceae). *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75345-6>
- Martínez, M. A., Evangelista, V., Mendoza, M., Basurto, F., & Mapes, C. (2004). Estudio de la pimienta gorda *Pimenta dioica* (L.) Merril, un producto forestal no maderable de la Sierra Norte de Puebla, México. In M. N. Alexiades & P. Shanley (Eds.), *Productos Forestales, Medios de Subsistencia y Conservación. Estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables*. (p. 499). Indonesia: Centro de Investigación Forestal Internacional.
- Maruyama, T., & Fuerst, P. A. (1985). Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, *111*(3), 675–689. <https://doi.org/10.1093/genetics/111.3.675>
- O’Neill, G. A., Dawson, I., Sotelo-Montes, C., Guarino, L., Guariguata, M., Current, D., & Weber, J. C. (2001). Strategies for genetic conservation of trees in the Peruvian Amazon. *Biodiversity and Conservation*, *10*(6), 837–850. <https://doi.org/10.1023/A:1016644706237>
- Ortíz-Medrano, A., Moreno-Letelier, A., & Piñero, D. (2008). Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *Ayacahuite*. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, *83*, 25–36. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1786>
- Osborne, A. J., Negro, S. S., Chilvers, B. L., Robertson, B. C., Kennedy, M. A., & Gemmill, N. J. (2016). Genetic evidence of a population bottleneck and inbreeding in the endangered New Zealand sea lion *Phocarctos hookeri*. *Journal of Heredity*, *107*(5), 392–402. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw015>
- Parker, T. (2008). *Trees of Guatemala*. Austin, Texas: The Tree Press.
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest

- RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7, e32253.
- Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 608–627.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez Enríquez, E., Delgado-Valerio, P., García Magaña, J. J., & Molina Sánchez, A. (2019). Diversidad genética y conservación de pinos nativos de la cuenca del río Cupatitzio, en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(52), 4–32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i52.410>
- Rao, P. S., Navinchandra, S., & Jayaveera, K. N. (2012). An important spice, *Pimenta dioica* (Linn.) Merril: A Review. *International Current Pharmaceutical Journal*, 2012(8), 221–225.
- Renau-Morata, B., Nebauer, S. G., Sales, E., Allainguillaume, J., Caligari, P., & Segura, J. (2005). Diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. *American Journal of Botany*, 92(5), 875–884. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.5.875>.
- Robles Valle, G. R., Oliveira Barbosa, K., & Villalobos Soto, R. (2000). Evaluación de los productos forestales no madereros en América Central.
- Ruiz-Chutan, J. A., Berdúo-Sandoval, J. E., Kalousova, M., Lojka, B., Fernández, E., Žiarovská, J., & Sánchez-Pérez, A. (2020). Diversidad genética de materiales nativos de aguacate guatemalteco a través del marcador molecular AFLP. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 7(2), 155–169. <https://doi.org/10.36829/63cts.v7i2.746>
- Saldaña, C. L., Cancan, J. D., Cruz, W., Correa, M. Y., Ramos, M., Cuellar, E., & Arbizu, C. I. (2021). Genetic diversity and population structure of capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth.) from the peruvian amazon revealed by rapid markers. *Forests*, 12(8), 1–12.

<https://doi.org/10.3390/f12081125>

- Sinha, D., Singh, J., Tandon, P. K., & Kakkar, P. (2013). Genetic diversity of *Pinus roxburghii* sarg. collected from different Himalayan regions of India assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Toxicology International*, 20(3), 208–213. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.121667>
- Tijerino, A., Callejas, L., & Cerda-Granados, D. A. (2016). Assessment of genetic diversity in five Nicaraguan populations of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) using RAPD markers. *Encuentro*, 103, 28–39. <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i103.2690>
- Tong, Y. W., Lewis, B. J., Zhou, W. M., Mao, C. R., Wang, Y., Zhou, L., ... Qi, L. (2020). Genetic diversity and population structure of natural *Pinus koraiensis* populations. *Forests*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/f11010039>
- Tuisima-Coral, L. L., Cepková, P. H., Weber, J. C., & Lojka, B. (2020). Preliminary evidence for domestication effects on the genetic diversity of *Guazuma crinita* in the Peruvian Amazon. *Forests*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/F11080795>
- Valdés-Infante Herrero, J., Rodríguez Medina, N. N., Bautista Alor, M., Ortíz García, M. M., Quiroz Moreno, A., Sánchez Teyer, L. F., ... Rohde, W. (2010). Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia myrtaceae. *Rev. Colomb. Biotecnol*, XII(1), 64–76.
- Vásquez, M. (2015). *Estado de la producción y comercialización de Pimenta dioica (L.)Merril en Guatemala*. Guatemala.
- Wang, B., Mao, J. F., Zhao, W., & Wang, X. R. (2013). Impact of geography and climate on the genetic differentiation of the subtropical pine *Pinus yunnanensis*. *PLoS ONE*, 8(6), e67345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067345>
- Zabka, M., Pavela, R., & Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 250–253. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.002>

Zhang, L., & Lokeshwar, B. L. (2012). Medicinal properties of the Jamaican pepper plant *Pimenta dioica* and Allspice. *Current Drug Targets*, 13(14), 1900–1906. <https://doi.org/10.2174/138945012804545641>

## 12. Vinculación

La vinculación se realizará principalmente con las instituciones encargadas del manejo y protección de bosques de Guatemala que son el Instituto Nacional de Bosques y el Consejo Nacional de Áreas Protegidas, también se hará contacto con AGEXPORT, entidad que ha mostrado interés en el manejo y explotación de pimienta gorda con fines de exportación.

## 13. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Los resultados de investigación se difundieron principalmente por medio de un manuscrito científico. Adicionalmente, se difundió información por el portal web del instituto de investigaciones y por las redes sociales de CUNZAC.

## 14. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS

Este estudio es el primero en su área, ya que se diagnostica la situación genética de una especie de interés biológico y comercial. Al trabajar con poblaciones silvestres y comerciales de *Pimenta dioica* en la Franja Transversal Norte y en el Petén, se aportan datos de importancia para la conservación de los ecosistemas naturales guatemaltecos ya que se trata de una especie nativa de gran valor comercial. Adicionalmente, este estudio generará un impacto económico que ayudará al desarrollo del mercado nacional e internacional de pimienta gorda, al servir como base para la elaboración de un plan de manejo, mejora genética y aprovechamiento sostenible de la especie en Guatemala. Esto redundará en un beneficio directo para los pobladores de la Franja Transversal Norte, quienes tienen interés en el manejo y producción de pimienta gorda.

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

## 15. Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	Si	
Jonatan Mario Josué Ortega España	Auxiliar	20200428	Si	

## 16. Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación

El coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez Coordinador del proyecto de investigación	 <b>Firma</b>
Fecha: 28/02/2022	

## 17. Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

mensual de las actividades realizadas en el proyecto Caracterización y diversidad genética de pimienta gorda (*Pimenta dioica*, Myrtaceae) como base para planes de manejo y explotación en mi calidad de Coordinador de investigación del centro Universitario de Zacapa, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

<b>Vo.Bo. Manuel Alejandro Barrios Izás</b> <b>Director del Insituto de Investigaciones, Centro</b> <b>Universitario de Zacapa</b>	<b>Firma</b>
Fecha: 28/02/2022	

## 18. Visado de la Dirección General de Investigación

<b>Vo.Bo. Nombre Coordinador(a) del Programa</b> <b>Universitario de Investigación</b>	<b>Firma</b>
Fecha: dd/mm/año	

<b>Vo.Bo. Nombre Coordinador General de</b> <b>Programas Universitarios de Investigación</b>	<b>Firma</b>
---	--------------

# Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

Fecha: dd/mm/año