

---

# RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPECIES DE *Psidium* (MYRTACEAE) PRESENTES EN EL OCCIDENTE DE VENEZUELA A PARTIR DE SECUENCIAS DE ADN NUCLEAR (ITS) Y PLASTIDIAL (*trnH-psbA*)

---

Gisela Rivero, Gerardo Salazar, Darisol Pacheco, Adriana Sánchez, Magally Quirós y Guillermo Sthormes

## RESUMEN

El occidente de Venezuela representa una región con diversidad de especies de *Psidium*, por lo cual se planteó el objetivo de estimar las relaciones filogenéticas entre representantes de dicho género a partir de secuencias moleculares. Se recolectaron hojas de *P. guineense*, *P. guajava*, *P. friedrichsthalianum* y *Calycolpus moritzianus* en los estados venezolanos de Mérida, Táchira, Trujillo y Zulia, así como de ejemplares herborizados de *P. acutangulum*. Se amplificó la región ITS del genoma nuclear (espaciadores ITS-4 e ITS-5) y la región *trnH-psbA* del genoma plastidial. Adicionalmente, se incorporaron al análisis *P. cattleianum* y *P. cinereum*. Como grupo externo se incluyó a

*Blepharocalix salicifolius*, *Calyptanthus lanceolata*, *Campomanesia pubescens*, *Eugenia sulcata*, *Luma chequen*, *Marlierea eugeniopoides*, *Myrceugenia planipes* y *Pimenta dioica*. Se aplicó un análisis de parsimonia con PAUP, analizando las secuencias individualmente y combinándolas, obteniéndose con éste último modo árboles con mayor índice de consistencia (IC). Los resultados apoyan la monofilia reportada para el género, lo cual responde a consideraciones morfoanatómicas y de distribución geográfica. Estos hallazgos pueden ser aplicables en programas de mejoramiento genético, considerando el potencial frutícola de algunas especies de *Psidium* en Venezuela.

## Introducción

La familia Myrtaceae incluye ~133 géneros y entre 3800-5800 especies; sin embargo, aún existen discrepancias entre los trabajos realizados en cuanto a su circunscripción. El centro de diversidad se encuentra en Australia, el sureste asiático y las regiones tropicales y subtropicales del continente Americano, teniendo una pequeña representación en África (Wilson *et al.*, 2001).

Lucas *et al.* (2005) han señalado que a pesar que Myrtaceae es considerada una familia monofilética y bien delimitada, el hecho de presentarse diversos criterios entre autores, en cuanto a la circuns-

cripción genérica, ha impulsado estudios filogenéticos recientes; no obstante, éstos han sido realizados principalmente en géneros del Paleotrópico, mientras que sólo algunos de los grupos americanos han sido revisados a través de deficientes análisis sistemáticos (*Myrceugenia*, *Campomanesia*, *Myrcianthes*). Así mismo, Gomes *et al.* (2009), al destacar la importancia de los caracteres anatómicos para estudios taxonómicos y evolutivos de esta familia, refieren que pocos representantes de la tribu Myrteae han sido revisados.

En Venezuela las mirtáceas ocupan el lugar número diecisiete en la lista de la flora vascular de Venezuela; exis-

ten 19 géneros, 209 especies nativas o naturalizadas, incluyendo 34 especies (más dos variedades) endémicas. Cerca del 90% de las especies conocidas en el país corresponden a los géneros *Eugenia*, *Myrcia*, *Marlierea* y *Psidium* (Bruce, 2008).

*Psidium* (Myrteae) tiene un hábitat natural que va desde México al norte de Argentina en el continente americano, extendiéndose a algunas islas de noreste Pacífico. Algunas especies de este género han sido ampliamente dispersadas a través de su cultivo. La guayaba (*P. guajava*) es una de las plantas cultivadas más conocidas en muchas regiones secas del mundo y ha sido naturalizada mucho más allá

de su distribución original, que fue presumiblemente en América tropical. La especie más dispersada y taxonómicamente más compleja del género es *P. guineense* (Mc Vaugh, 1968).

En Venezuela se reportan 13 especies de *Psidium* ampliamente distribuidas, las cuales se desarrollan preferentemente en las zonas cálidas y soleadas del norte del país, desde el nivel del mar hasta ~1800m de altitud, siendo *P. guineense* Sw y *P. guajava* L. las que se encuentran presentes en un mayor número de estados (en 19 y 13, respectivamente). En la región occidental los estados Zulia y Mérida, con 6 y 3 especies, se encuentran entre los más diversos (Bruce, 2008).

---

## PALABRAS CLAVE / ADN / Filogenia / Marcadores Moleculares / *Psidium* / Venezuela /

Recibido: 23/11/2011. Modificado: 29/09/2012. Aceptado: 01/11/2012

**Gisela Rivero-Maldonado.** Ingeniera Agrónoma y M.Sc. en Fruticultura, Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Docente Investigadora, LUZ, Venezuela. Dirección: Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, LUZ. Apartado: 15205, Maracaibo 4005, Zulia, Venezuela. e-mail: grivero@fa.luz.edu.ve.

**Gerardo Salazar.** Ph.D. en Botánica, University of London, Londres, RU. Investigador, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). e-mail: gasc@ibunam2.ibiologia.unam.mx.

**Darisol Pacheco.** Ingeniera Agrónoma, LUZ, Venezuela. Doctora en Ciencias en Biología Vegetal, UNAM, México. Docente Investigadora, LUZ,

Venezuela. e-mail: dpacheco@fa.luz.edu.ve.

**Adriana Sánchez-Urdaneta.** Ingeniera Agrónoma, LUZ, Venezuela. Doctora en Ciencias-Botánicas, Colegio de Postgraduados, México. Docente-Investigadora, LUZ, Venezuela. e-mail: usanchez@fa.luz.edu.

**Magally Quirós de G.** Ingeniera Agrónoma, LUZ, Venezuela.

M.Sc. y Ph.D en Entomología, University of de Maryland, EEUU. Docente-Investigadora, LUZ, Venezuela. e-mail: magallyq@gmail.com.

**Guillermo Sthormes.** Licenciado en Educación-Biología, LUZ, Venezuela. Docente-Investigador LUZ, Venezuela. e-mail: gsthormes@fa.luz.edu

## PHYLOGENETIC RELATIONS BETWEEN WESTERN VENEZUELA *Psidium* (MYRTACEAE) SPECIES FROM SEQUENCES IN NUCLEAR (ITS) AND PLASTIDIAL (*trnH-psbA*) DNA REGIONS

Gisela Rivero, Gerardo Salazar, Darisol Pacheco, Adriana Sánchez, Magally Quirós and Guillermo Sthormes

### SUMMARY

Western Venezuela is a region with high diversity of *Psidium* species and, thus, the goal was established to estimate from the molecular sequences the phylogenetic relations between representatives of said genus. In the Venezuelan states of Mérida, Táchira, Trujillo and Zulia, leaves of *P. guineense*, *P. guajava*, *P. friedrichsthalianum* and *Calycolpus moritzianus*, as well as herbarium samples of *P. acutangulum*, were collected. The ITS region (ITS-4 and ITS-5 spacers) of the nuclear genome and the *trnH-psbA* region of the plastidial genome were amplified. Additionally, *P. cattleianum* and *P. cinereum* were also analyzed. As an external group were included *Blepharocalix*

*salicifolius*, *Calyptanthus lanceolata*, *Campomanesia pubescens*, *Eugenia sulcata*, *Luma chequen*, *Marlierea eugeniopoides*, *Myrceugenia planipes* and *Pimenta dioica*. A parsimony analysis using PAUP was applied, analyzing sequences individually and combining them in order to obtain trees with a higher consistency index (CI). Results support the monophyly nature of the genus, which corresponds to morpho-anatomical and geographical distribution considerations. These findings can be applied in genetic improvement programs, considering the fruit production potential of some *Psidium* species in Venezuela.

## RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES DE *Psidium* (MYRTACEAE) PRESENTES NO OCIDENTE DA VENEZUELA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE ADN NUCLEAR (ITS) E PLASTIDIAL (*trnH-psbA*)

Gisela Rivero, Gerardo Salazar, Darisol Pacheco, Adriana Sánchez, Magally Quirós e Guillermo Sthormes

### RESUMO

O ocidente da Venezuela representa uma região com diversidade de espécies de *Psidium*, pelo qual foi colocado o objetivo de estimar as relações filogenéticas entre representantes de dito gênero a partir de sequências moleculares. Coletaram-se folhas de *P. guineense*, *P. guajava*, *P. friedrichsthalianum* e *Calycolpus moritzianus* nos estados venezuelanos de Mérida, Táchira, Trujillo e Zulia, assim como de exemplares herborizados de *P. acutangulum*. Amplificou-se a região ITS do genoma nuclear (espaçadores ITS-4 e ITS-5) e a região *trnH-psbA* do genoma plastidial. Adicionalmente, se incorporaram a análise *P. cattleianum* e *P. cinereum*. Como grupo externo foram incluídas

*Blepharocalix salicifolius*, *Calyptanthus lanceolata*, *Campomanesia pubescens*, *Eugenia sulcata*, *Luma chequen*, *Marlierea eugeniopoides*, *Myrceugenia planipes* e *Pimenta dioica*. Aplicou-se uma análise de parcimônia com PAUP, analisando as sequências individualmente e em combinações, obtendo-se com este último modo árvores com maior índice de consistência (IC). Os resultados apoiam a monofilia reportada para o gênero, o qual responde a considerações morfoanatômicas e de distribuição geográfica. Estes achados podem ser aplicáveis em programas de melhoramento genético, considerando o potencial frutícola de algumas espécies de *Psidium* na Venezuela.

Dentro de esta gran diversidad existen tipos morfológicos muy semejantes entre sí, generándose con ello confusiones a nivel taxonómico. Las grandes variaciones en el estimado del número de especies de *Psidium* es producto de la existencia de complejos de entidades que pueden por sí mismas ser consideradas especies sencillas o grupos de especies (Bruce, Landrum y Grifo, 2003). Una de las vías más certeras para discriminar entre morfotipos muy semejantes entre sí es el análisis molecular. Al respecto, Sunnucks (2000) refiere que los organismos difieren entre sí por sus secuencias de ADN, y esas variaciones pueden ser consideradas a nivel de genes indi-

viduales o genotipos. Los procesos que afectan a los individuos afectan también a la población, y por lo tanto tienen influencia sobre las especies e interfieren en la clasificación taxonómica. La gran aplicación de las técnicas moleculares es la posibilidad de detectar pequeñas diferencias con un alto nivel de resolución.

Gadek *et al.* (1996) presentaron el primer análisis molecular en Myrtaceae usando la región *matK* del genoma plastidial; el estudio estuvo dirigido a dilucidar la posición de *Heteropyxis* y *Psiloxylon*, considerados géneros monotípicos dentro de la familia. Se determinó que *Syzygium* formó un grupo con el género asiático *Acmena*, y se separó del grupo

de frutos carnosos de Suramérica, contribuyendo a la hipótesis que éstos han surgido más de una vez en las mirtáceas. Otra de las principales implicaciones taxonómicas a las que llegaron en sus análisis fue la determinación de que existe un fuerte soporte para la monofilia del grupo Myrtoideo, excluyendo a *Syzygium*.

Wilson *et al.* (2001) se plantearon el objetivo de integrar los caracteres morfológicos para definir las relaciones entre géneros y tribus de Mirtáceas con una matriz de taxones complementarios que incluía secuencias moleculares de *matK*, realizando un estudio crítico de los caracteres comúnmente utilizados para determinar afinidades en la

familia. Los resultados determinaron que los datos de caracteres morfológicos sólo produjeron resoluciones limitadas en las interrelaciones. El análisis de los datos combinados resultó fuertemente soportado en base a datos moleculares. Los estimados de la filogenia revelaron una amplia homoplasia dentro de la familia en el espectro de caracteres no moleculares, incluyendo madera, frutos y caracteres florales.

Udovic y Ladiges (2000) consideran las regiones ITS de ADN nuclear y *trnH-psbA* de ADN plastidial como algunas de las más variables para análisis filogenéticos en mirtáceas. Así Lucas *et al.* (2005), en un estudio filogenético con representantes de Myrteae, em-

pleando secuencias de éstas regiones para evaluar la monofilia de la tribu y subtribus, y las relaciones de los géneros que las conforman, determinaron entre otros hallazgos que las especies de *Psidium* se agrupan en un clado con un soporte alto (bootstrap= 90), y que éste en conjunto con los conformados por *Campomanesia guazumifolia* y *Pimenta dioica* se hermanaron a un clado no resuelto que comprendía al resto de los taxa analizados.

Los nrITS (*internal transcribed spacers*) del ADN ribosómico nuclear son ampliamente utilizados para inferencias filogenéticas. Entre sus ventajas se encuentran: alto número de copias, universalidad de la secuencia del primer, el relativamente pequeño tamaño de los espaciadores y la facilidad para obtener los datos de estas regiones (Biffin *et al.*, 2007). Estos marcadores son usados especialmente para análisis de relaciones dentro de géneros o entre géneros estrechamente relacionados (Kovarik *et al.*, 2005). Así mismo, el ADN de cloroplastos se ha utilizado exitosamente en Myrtaceae para elucidar relaciones taxonómicas en categorías superiores (Gadek *et al.*, 1996).

En los análisis filogenéticos se incorporan taxa como grupos externos, con el fin de determinar cuál de dos o más estados homólogos de un carácter puede ser considerado como apomórfico y cuál como plesiomórfico (Villaseñor y Dávila, 1992). Cuando no se dispone de información de secuencias moleculares de estos grupos referenciales (tal es el caso general de los géneros americanos de mirtáceas) existen bases de datos en los bancos de secuencias moleculares para organismos vivos, tales como GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), a fin de poder establecer relaciones de los grupos de interés con sus pares taxonómicos.

Considerando que el occidente de Venezuela representa una región con una importante diversidad de especies del género *Psidium*, se realizó el

presente estudio con el objetivo de estimar las relaciones filogenéticas entre representantes de este grupo y entre taxa afines, a partir de secuencias de las regiones ITS de ADN nuclear y *trnH* y *psbA* de ADN plastidial.

## Materiales y Métodos

Se emplearon muestras de *Psidium guajava* L. y *P. guineense* Sw. recolectadas en localidades de los estados Mérida, Táchira, Trujillo y Zulia, siendo los taxa con mayor frecuencia en esta zona. Adicionalmente se incluyó a *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) Burret, especie predominante en los andes venezolanos. Por otro lado, se consideraron muestras de *P. guineense* (MY: 09802 y 09797) y *P. acutangulum* DC. (VEN 256635) tomadas de ejemplares herborizados a fin de establecer comparaciones con especímenes provenientes de otras regiones del país; las muestras de *P. guineense* fueron recolectadas en el estado Aragua y las de *P. acutangulum* en Apure. También, se incluyó en el análisis a *P. friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied., recolectada en el municipio Mara, estado Zulia, que a pesar de ser una especie introducida y no reportada para el país (Bruce, 2008), ha sido difundida en ese estado por su posible uso como portainjerto de *P. guajava*. Como especies hermanas se incorporaron *P. cinereum* DC. (AM489877) y *P. cattleianum* Sabine (AM489878), cuya secuencias moleculares se extrajeron de GenBank, mientras que como grupos externos se integraron otros géneros de mirtáceas a los cuales se les habían realizado estudios filogenéticos previos: *Calyptanthus lanceolata* O. Berg (AM489818), *Campomanesia pubescens* (Cambess.) O. Berg (AM489822), *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. (AM489829), *Luma chequen* (Molina) A. Gray. (AM489844), *Marlierea eugeniopsoides* (D. Legrand & Kausel) D. Legrand (AM489845), *Myrceuge-*

*nia planipes* Hooker et Arnott (AM489851) y *Pimenta dioica* (L.) Merr. (AM489874). En total se incorporaron al análisis 14 especies, destinando para los individuos de recién recolecta y para los herborizados tres réplicas de cada uno, para el caso de requerirse una nueva extracción de ADN.

El número de individuos que se consideró inicialmente fue mayor, estando incluidas otras especies de *Psidium* reportadas para el occidente de Venezuela, y cuyas muestras se extrajeron de ejemplares herborizados depositados en herbarios nacionales (VEN, MY, MER, HERZU) y en el herbario nacional de México (MEXU). No obstante, no pudieron ser incluidas en el análisis debido a la degeneración del ADN, lo cual se comprobó al practicar pruebas electroforéticas.

El ADN genómico fue extraído de hojas maduras con un buen estado fitosanitario, secadas con sílica gel (Chase y Hills, 1991), y de fragmentos de hojas de especímenes de herbario, colocando pequeñas porciones de las mismas en un mortero con N<sub>2</sub> líquido. De las muestras pulverizadas se extrajo el ADN total utilizando una solución buffer 2X CTAB (Doyle y Doyle, 1987).

Se amplificó la región ITS del genoma nuclear (espaciadores ITS4 e ITS5) y la región *trnH-psbA* del genoma plastidial mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello los kits comerciales PCR Master Mix (Advanced Biotechnologies) y Taq PCR Core Kit (Qiagen), según los protocolos del fabricante. A cada tubo con reacción de PCR se le agregó 1% de cada primer (100ng·µl<sup>-1</sup>) y 2-4% de una solución acuosa de suero de albúmina de bovino (BSA) para neutralizar los compuestos fenólicos y otros inhibidores potenciales (Kreider, 1996). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: primera desnaturalización a 94°C por 2min, segunda desnaturalización a 94°C por 1min, *annealing* (hibridación o emparejamiento) a 52°C por 1min,

primera extensión a 72°C, 1min, extensión final a 72°C, 7min; el número de ciclos fue de 30. El producto final de PCR se inyectó en un gel de agarosa y colocado en una cámara de electroforesis para confirmar su amplificación.

Las secuencias y referencias de los iniciadores fueron

Primer ITS4: 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3' (White *et al.*, 1990)

Primer ITS5: 5'GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G3' (White *et al.*, 1990)

Primer *trnH*: 5'CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC3' (Tate y Simpson, 2003)

Primer *psbA*: 5'GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C3' (Sang *et al.*, 1997)

La secuenciación del ADN se llevó a cabo según procedimiento de Salazar *et al.* (2003).

En todas las regiones del ADN analizado, ambas bandas fueron secuenciadas, editadas y ensambladas con Sequencher versión 3.1 a 4.6 (GeneCodes Corp.). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo por inspección visual, comparando con secuencias obtenidas por Salazar *et al.* (2003), procurando la máxima similaridad de la secuencia (Simmons, 2004). No se incluyeron los datos que presentaron ambigüedades en la alineación y los espacios sin información en las secuencias fueron tratados como datos perdidos.

La filogenia se realizó mediante un análisis de parsimonia con el programa PAUP (*phylogenetic analysis using parsimony*), versión 4.02b para Macintosh (Swofford, 2002), que consistió de una prueba heurística con 1000 secuencias aleatorizadas de los taxa para calcular los arboles iniciales, buscando árboles más cortos mediante rearrreglo de ramas con la opción TBR (*tree bisection-reconnection*) y salvando hasta 20 árboles más cortos por cada réplica. Todos los caracteres se trataron como no ordenados y se les asignó el mismo peso. El apoyo interno para los

clados (robustez) fue evaluado mediante 300 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985), cada una consistente en 20 réplicas de búsqueda heurística con TBR y guardando hasta 20 árboles más cortos por repetición heurística. Varias resoluciones alternativas fueron examinadas por medio de la opción *constraints* de PAUP, para forzar la monofilia de grupos específicos que permitieran examinar los efectos sobre la longitud de los árboles y los índices de consistencia y de retención.

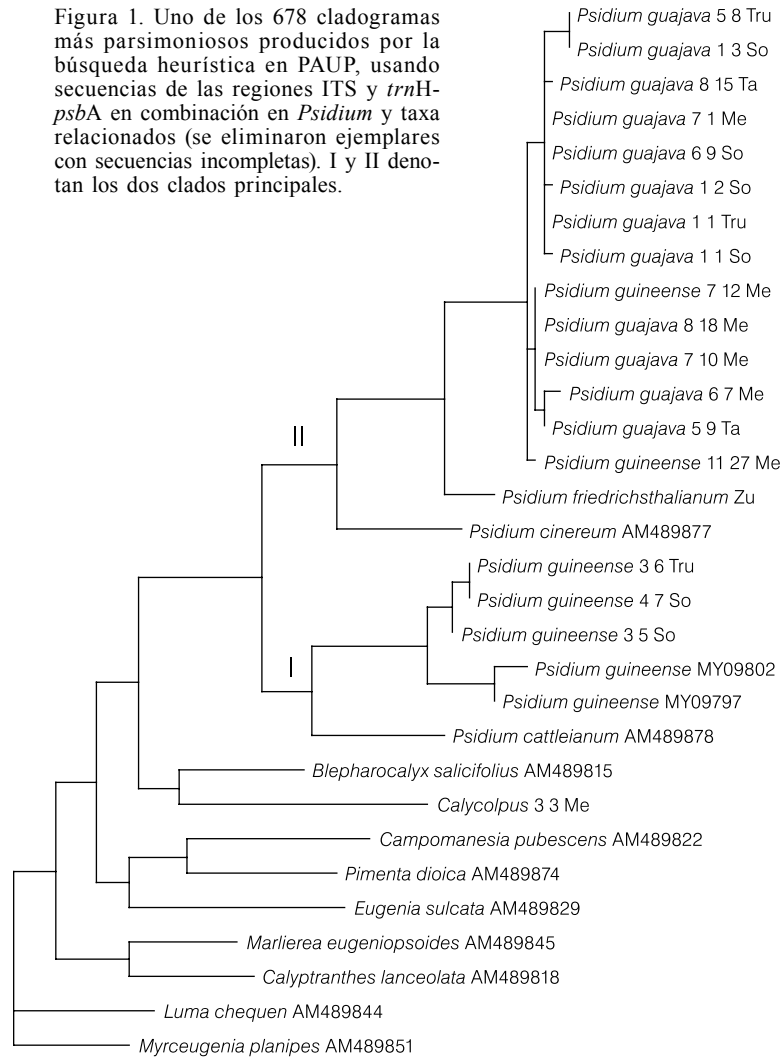
## Resultado

Se analizaron todas las secuencias resultantes de ITS y de *trnH-psbA* de forma individual y de modo combinado, este último bajo dos modalidades: en primer lugar, eliminando las secuencias de ITS y *trnH-psbA* que no correspondieran al mismo ejemplar, colocando signos de interrogación en la porción faltante respectiva, ya sea ITS o *trnH-psbA*, y en segundo lugar, excluyendo todos los ejemplares con secuencias incompletas, ya sea ITS o de *trnH-psbA*. El análisis donde se eliminaron las secuencias incompletas fue donde se obtuvieron los árboles con mayor consistencia, por lo cual se seleccionó uno de los 678 cladogramas y el de consenso estricto para la interpretación de los resultados (Figuras 1 y 2, respectivamente).

De un total de 1282 caracteres (pares de bases), 1077 resultaron constantes, 100 resultaron no informativos o variables, y 105 surgieron como filogenéticamente informativos. La búsqueda heurística retuvo 678 árboles igualmente parsimoniosos, con una longitud (L) de 344 pasos, índice de consistencia IC=0,6919, índice de retención IR= 0,8416 e índice de homoplasia IH= 0,3081. Uno de estos cladogramas se presenta en la Figura 1. En el árbol de consenso estricto (Figura 2) se muestran los resultados obtenidos por encima del 50% en el bootstrap (bs).

Tanto en el cladograma como en el árbol de consenso estricto se evidencia que todas

Figura 1. Uno de los 678 cladogramas más parsimoniosos producidos por la búsqueda heurística en PAUP, usando secuencias de las regiones ITS y *trnH-psbA* en combinación en *Psidium* y taxa relacionados (se eliminaron ejemplares con secuencias incompletas). I y II denotan los dos clados principales.



las especies analizadas y consideradas como del género *Psidium* formaron un clado natural sustentado por un bs de 100%, a su vez separadas en dos clados principales indicados como I y II en ambas figuras.

El clado I, constituido por *P. guineense* y *P. cattleianum*, está apoyado por un bs de 69%, con las ramas internas del clado conformado por cinco accesiones de *P. guineense* fuertemente apoyado (bs= 99%).

El clado II, con bs de 95%, está integrado por dos grupos, el primero conformado por ocho accesiones de *P. guajava* y bs de 62%; el segundo representado por cuatro accesiones de *P. guajava* y dos de *P. guineense* con bs de 100%. A estos grupos se unieron *P. friedrichsthalianum* y *P. cinereum* como taxa relacionados con apoyo bootstrap de 95 y 100% (Figura 2).

En la base del árbol se situó el clado constituido por las especies integradas al análisis como grupo externo (*Blepharocalyx salicifolius*, *Calycolpus moritzianus*, *Campomanesia pubescens*, *Pimenta dioica*, *Eugenia sulcata*, *Marlierea eugeniopsoides*, *Calyptanthes lanceolata*, *Luma chequen* y *Myrceugenia planipes*), obteniéndose una mejor resolución de este grupo en el árbol de la Figura 1, con un porcentaje de bootstrap de 100%, en comparación con el árbol de consenso estricto.

## Discusión

La evidencia de la conformación en un solo clado de todas las especies consideradas dentro del género *Psidium* y analizadas en este estudio se apoya en investigaciones previas como la de Lucas *et al.*

(2005), en la cual se determinó la monofilia del género *Psidium* a través de un análisis de secuencias combinadas de ITS y *trnH-psbA* aplicado a mirtáceas de frutos carnosos; estos autores obtuvieron un clado monofilético con 90% de bootstrap, conformado por especies de *Psidium*. En dicho estudio, realizado a nivel de género, se originó el primer reporte molecular que comprueba la monofilia de algunos de los géneros de Myrteae, tales como *Psidium* y *Luma*; así mismo, se determinó que los integrantes de las subtribus Eugeniinae y Myrtinae, donde se encuentran algunos de los géneros incorporados en el presente análisis como grupos externos, son polifiléticos, razón que explica en parte la alta politomia observada en el cladograma de la Figura 1 para este grupo.

Así mismo, en las Figuras 1 y 2 se puede observar que todas las accesiones de la especie *P. guajava* se concentraron en un clado, lo que

permite inferir que a pesar de ser una especie cultivada no es susceptible de hibridación. No obstante, Mc Vaugh (1963) no descartó el hecho de que *P. guajava* y *P. guineense* puedan hibridizarse de forma natural con la consecuente producción de individuos intermedios; es muy probable que *Psidium* × *hypoglaucum* haya resultado de la hibridación entre estas dos especies, considerando la afinidad morfológica y su común ocurrencia en hábitats disturbados donde ambos de los supuestos progenitores crecen. Muchos de los individuos de ésta llamada especie muestran una fuerte semejanza aparente a *P. guineense*, pero usualmente exhiben también algunas características de *P. guajava*, especialmente la pubescencia gris de

las hojas y ramas cuadranguladas.

Tomando en cuenta los datos de distribución geográfica para explicar el agrupamiento de *P. guajava* se puede observar en las Figuras 1 y 2 que no existe un patrón definido de acuerdo a éste aspecto; así vemos como en el grupo II se reunieron todas las muestras provenientes de diversas localidades de los estados Trujillo, Mérida, Táchira y Zulia, con alturas que variaron de 110msnm en la vía a Socopo, estado Zulia (10°24'32"N; 71°07'49"O), hasta los 1880msnm, correspondiente a una localidad del estado Mérida (8°35'50"N; 71°13'20"O). Esto permite inferir que la especie posee un amplio margen de adaptación a diversos ambientes, ya que se encontró asociada a vegetaciones sabaneras, así como también a zonas montañosas de los andes venezolanos.

Otro aspecto importante a considerar fue la posición terminal que presentó *P. guajava* tanto en el cladograma como en el árbol de consenso estricto, lo cual denota el grado de evolución que posee la especie en comparación con los otros taxa analizados. Mc Vaugh (1968) relacionó ciertos patrones de floración con mecanismos de especialización a través de la evolución de Myrtinae y refiere que en todas las Myrteae americanas la flor solitaria es subtendida por un par de bractéolas, es decir la ramificación axilar en su primer nudo termina en una flor. Las bractéolas representan las hojas en este nudo. En muchas especies esta habilidad parece haberse perdido, en otras es facultati-

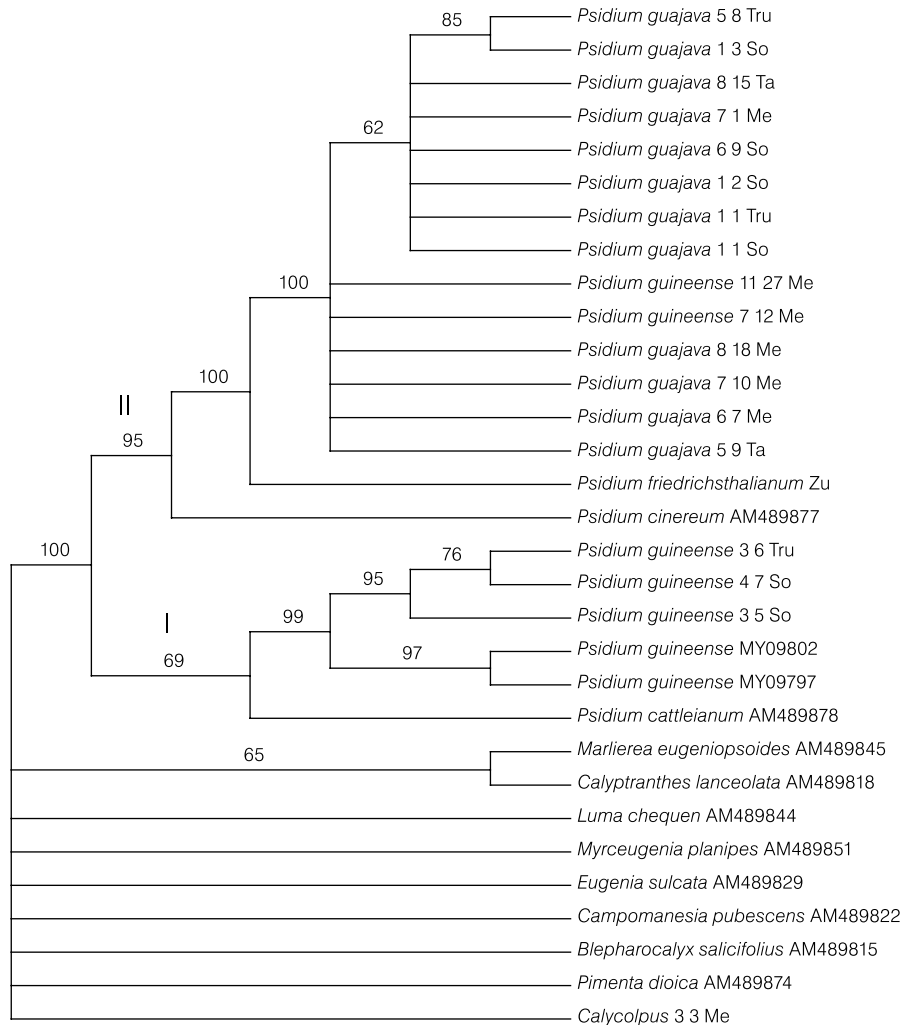


Figura 2. Árbol de consenso estricto de los 678 cladogramas más parsimoniosos producidos por la búsqueda heurística en PAUP, usando secuencias de las regiones ITS y *trnH-psbA* en combinación en *Psidium* y taxa relacionados (se eliminaron ejemplares con secuencias incompletas). Los porcentajes sobre las ramas indican el porcentaje bootstrap para los clados correspondientes. I y II denotan los dos clados principales.

vo. Partiendo de que el patrón básico de un pedicelo floral subtendido por dos bractéolas es común en todas las especies, puede asumirse que aquellas plantas que presentan una flor solitaria es característico de las Myrteae primitivas, y que los otros tipos de inflorescencias han sido producto de la evolución a través de cambios en el arreglo de las flores sobre las ramas. Es probable incluso encontrar flores solitarias y dicasios de tres flores en diferentes axilas de una misma planta; éste último aspecto se pudo constatar cuando se comparó morfológicamente a *P. guajava* y *P. guineense*, determinándose que estas especies se diferenciaron entre otros caracteres por el tipo de inflo-

rescencia; *P. guajava* presentó flores solitarias, cimas bíparas o ambas, mientras que *P. guineense* flores solitarias o cimas bíparas, pero en ningún caso ambas (Rivero *et al.*, 2012).

De acuerdo a los estudios filogenéticos en mirtáceas realizados por Conti *et al.* (1997) y Lucas *et al.* (2005), los clados más basales fueron ocupados por especies de *Leptospermum* y *Eucalyptus*, y secuencialmente los demás clados de acuerdo a las circunscripciones de las tribus Myrtinae, Eugeniinae y Myrciinae. Gomes *et al.* (2009) al comparar los caracteres anatómicos con las filogenias existentes, identificaron algunos rasgos que reflejan la evolución de géneros como *Psidium*, entre los que desta-

can células epidérmicas comunes con paredes anticlinales sinuosas y de mayor grosor en la superficie adaxial con respecto a las de la superficie abaxial, mesófilo dorsiventral, presencia de idioblastos secretores, haz vascular semi-arqueado en la nervadura media, entre otros que constituyen estados apomórficos, en comparación con caracteres tales como células epidérmicas con paredes anticlinales rectas y de menor tamaño o iguales a las de la superficie abaxial, mesófilo isolateral u homogéneo, ausencia de idioblastos secretores y haz vascular casi plano, considerados como plesiomórficos y presentes en géneros como *Leptospermum* y *Eucalyptus*.

Tantawy (2004) evaluó aspectos morfoanatómicos para comparar entre sí algunos géneros de mirtáceas; considerando 54 caracteres a través de un análisis cluster determinó que la especie *Psidium guajava* conformó una serie separada del resto de

los taxa estudiados (*Callistemon*, *Malaleuca*, *Eucalyptus* y *Eugenia*); en el fenograma las especies estudiadas presentaron un alto promedio de distancia taxonómica.

Tanto en el árbol de la Figura 1 como en el del consenso estricto la especie *P. guineense* se agrupó en los dos clados principales. Esto puede tener diversas interpretaciones si se consideran ciertos aspectos. En primer lugar, es probable que este patrón de agrupamiento se deba a una incorrecta identificación de las muestras recolectadas en campo, considerando que *P. guajava* y *P. guineense* son especies muy cercanas entre sí, compartiendo diversas características en común y hábitats similares. En el estudio

de Rivero *et al.* (2012) que comparó características morfológicas entre especies de *Psidium*, a través un análisis de conglomerado se determinó que *P. guajava* y *P. guineense* se reunieron en un grupo, debido a que compartían características en común tales como hojas erectas, relación largo/ancho de la hoja media o baja, curvatura del nervio medio ausente y 4 o 5 sépalos; mientras que las diferencias morfológicas surgieron al comparar caracteres como el grado de pubescencia de las hojas, siendo densa en el envés y media en el haz para *P. guajava* y media o densa en el envés y esparcida en el haz para *P. guineense*. Otra diferencia fue la relacionada con el número de pares de nervaduras, donde en *P. guineense* fue menor a 10 pares o entre 10 a 16 pares en algunos casos, y *P. guajava* presentó más de 16 pares de nervaduras; igualmente difirieron en cuanto la presencia de estípulas que fueron persistente en *P. guineense* y caedizas en *P. guajava*.

De acuerdo a Mc Vaugh (1963), *P. guajava* y *P. guineense* causan a menudo confusión en la identificación a nivel de herbario. Ordinariamente las dos pueden ser diferenciadas por el número promedio de venas en las hojas, por el grado de inclinación de las venas laterales y por la prominencia de las venas pequeñas en las hojas de especímenes secos. Adicionalmente, según el autor, una característica útil puede ser el número de flores, el cual es sólo una en *P. guajava* y siempre tres en *P. guineense*. Otros caracteres distinguibles son los brotes grandes y cerrados de *P. guajava* y el largo pedúnculo de *P. guineense*.

Por otro lado, no se debe dejar de considerar que la especie *P. guineense* comparta un ancestro común; al respecto Salywon *et al.* (2002), quienes realizaron un estudio molecular en taxa de Myrtinae tropicales americanas, indicaron que *Psidium* puede ser parafilético; no obstante, estos autores reportaron problemas con ramas de corta longitud en árboles filoge-

néticos, así como bajos porcentajes de bootstrap.

Según Bruce, Landrum y Grifo (2003), existen discrepancias en cuanto al número de especies de *Psidium* y su circunscripción, lo cual puede deberse a la existencia de complejos de entidades que pueden por sí mismas ser consideradas especies sencillas o grupos de especies, tal como es el caso de los complejos conformados por *P. guineense* y *P. salutare*. Mc Vaugh, (1968) señaló que *P. guineense* es el grupo más disperso y taxonómicamente más complejo del género *Psidium*. A él se han asociado las especies *P. molle*, *P. costaricense*, *P. schiedeana*, *P. laurifolium*, *P. monticola*, *P. rotundifolium*, *P. schippii* y *Guajava mollis*.

En las Figuras 1 y 2 se puede observar que *P. guineense*, a excepción de dos muestras del estado Mérida agrupadas con *P. guajava*, las cuales pueden estar mal identificadas, formó dos subgrupos en el grupo I, el primero con muestras provenientes de Trujillo y de la localidad de Socopo en el estado Zulia, y el otro con las identificadas como MY 09802 y MY 09797, ambas de especímenes herborizados recolectados en Villa de Cura, estado Aragua. En el primer agrupamiento la amplitud altitudinal no fue tan grande, el lugar de recolección en Socopo (vía El Pensado-Churugarita; 10°28'21"N y 71°02'36"O) se halla a 140msnm, mientras que en Trujillo (sector Agua Santa; 09°31'37"N y 70°40'06"O) la altura es de 110msnm. Estas observaciones permiten apoyar preliminarmente lo reportado en la literatura, donde se ha expuesto que *P. guineense* crece en áreas disturbadas, sabanas y bosques de galerías, sobre todo en elevaciones medias (Bruce, Landrum y Grifo, 2003).

En cuanto a las otras especies de *Psidium* en las Figuras 1 y 2, se puede observar a *P. friedrichsthalianum* y *P. cinereum* en posición intermedia a los dos clados principales conformados por *P. guajava* y *P. guineense*, y a

la especie *P. cattleianum* compartiendo el clado I con *P. guineense*.

*P. friedrichsthalianum* se puede encontrar en los márgenes de ríos, en pastizales y tierras bajas en general (Mc Vaugh, 1963). Actualmente se evalúa su potencial como portainjerto de *P. guajava* por su tolerancia a nemátodos del género *Meloidogyne* (Molero *et al.*, 2006), específicamente en la región nor-occidental del estado Zulia, Venezuela; sin embargo, se trata de precisar algunos aspectos relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta y con la calidad del fruto derivado de la combinación de éstas dos especies, así como la comprobación de una completa compatibilidad. Es importante destacar que las muestras de *P. friedrichsthalianum* que se incorporaron al análisis fueron recolectadas en un campo experimental ubicado en el municipio Mara, estado Zulia, con una altitud muy cercana al nivel del mar.

Con respecto a *P. cinereum*, Bruce, Landrum y Grifo (2003) destacan que es una especie muy variable y generalizada, cuya amplitud de dispersión va desde Venezuela al sureste de Brasil, pero igualmente predomina en sabanas, entre 50 a 500msnm.

En relación a *P. cattleianum*, según Mc Vaugh (1963) es nativa de las tierras bajas del este de Brasil, cerca de la costa de Paraná a Sao Paulo; son plantas usualmente glabras, pero cuando cultivadas son siempre pubescentes y las hojas algunas veces sugieren por su tamaño y forma una posible mezcla de genes con *P. sartorianum*. *P. cattleianum* se ubicó en un clado con *P. guineense*, muy probablemente por compartir hábitats similares y, al igual que *P. cinereum*, es una especie muy dispersada y frecuente en diversos ambientes.

Todo lo expuesto permite inferir que uno de los principales aspectos que determinan las diferentes asociaciones entre las especies mencionadas es su origen tropical y la consecuente adaptación a los diversos hábitats propios de estas latitudes,

lo cual se traduce en caracteres moleculares.

En el árbol de la Figura 1 *Myrceugenia* se ubicó al pie del árbol, porque probablemente es la más primitiva de las mirtáceas analizadas. Según Landrum (1981), la historia hipotética de ese género indica que fue ya algo diversificado en el Oligoceno-Mioceno, 20-30 millones de años atrás. Este período tan largo es consistente con la posición filogenética anómala del género dentro de la familia Myrtaceae. Mc Vaugh (1968) interpreta a *Myrceugenia* como una rama precoz dentro del grupo de las protomirtáceas y permite presumir que el género es un miembro primitivo de las Myrceinae.

Así mismo, en los estudios filogenéticos basados en datos moleculares conducidos por Lucas *et al.* (2005) y Wilson *et al.* (2001), los clados más basales también fueron ocupados por *Calypttranthes*, *Marlierea* y *Luma*, coincidiendo con la posición que ocuparon en el presente trabajo (Figura 1). Por otro lado, los géneros *Campomanesia* y *Pimenta* no obtuvieron resolución en el árbol de consenso estricto, así como *Campomanesia* y *Blepharocalyx* que emergieron separadamente (Figura 2), lo cual coincide con los resultados de Lucas *et al.* (2005).

Dentro del grupo externo, *Blepharocalyx* y *Calycolpus moritzianus* fueron las especies que más se aproximaron a *Psidium* (Figura 1). Según Landrum y Sharp (1989) *Calycolpus* está estrechamente relacionado con *Psidium*, acordando que es el que mejor 'dibuja' la línea de separación entre *Psidium* y *Myrtus*. Este género se puede distinguir de otros como *Campomanesia*, *Myrtus* y *Psidium* por sus sépalos, los cuales son visibles en la yema floral, mientras que en *Psidium* forman un cáliz cerrado (Mc Vaugh, 1968). De acuerdo a Pérez-Cortéz (2007) la amplitud altitudinal en *Calycolpus* oscila entre 70 y 2350msnm; en Venezuela existen seis especies, presentes principalmente en los estados Amazonas y

Bolívar, estando *C. moritzianus* reportado únicamente para los Andes venezolanos. Algunas especies de *Psidium* han pasado a formar parte de géneros como *Mosiera* y *Calycolpus*, a éste último se integraron cuatro especies de *Eugenia* y una de *Psidium*: *P. caudatum*.

## Conclusiones

Las especies de *Psidium* seleccionadas para este estudio conformaron un clado natural, apoyando parcialmente estudios previos donde se reporta monofilia para éste género, agrupación que se explicó basándose en algunos caracteres morfoanatómicos y de distribución geográfica. Resta precisar la posición de algunas especies como *P. guineense*, a fin de aplicar estos hallazgos en futuros programas de selección y mejoramiento genético con fines agronómicos. Para ello es necesario el estudio de otras regiones del ADN, relacionándolas con fuentes de información que pudieran ayudar a la interpretación de los resultados. Finalmente, se recomienda incorporar otras especies de *Psidium* que se distribuyen en Venezuela para completar el análisis del género para el país, dada la diversidad de especies silvestres existentes.

## REFERENCIAS

- Biffin E, Harrington M, Crisp M, Craven L, Gadek P (2007) Structural partitioning, paired-sites models and evolution of the ITS transcript in *Syzygium* and Myrtaceae. *Mol. Phylog. Evol.* 43: 124-139.
- Bruce H, Landrum L, Grifo F (2003) Myrtaceae-Plumbaginaceae. En Berry P, Holst B, Yatskievych K (Eds.) *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 7. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, MO, EEUU. pp. 1-99.
- Bruce H (2008) Myrtaceae. En Hokeche O, Berry P, Hubber O (Eds.) *Nuevo Catálogo de la Flora Vasculare de Venezuela*. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela. 859 pp.
- Conti E, Litt A, Wilson P, Graham S, Briggs B, Johnson L, Systma K (1997) Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systemat. Bot.* 22: 629-647.
- Chase M, Hills H (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution: Int. J. Org. Evol.* 39: 783-791.
- Gadek P, Wilson A, Quinn C (1996) Phylogenetic reconstruction in Myrtaceae using matK, with particular reference to the position of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*. *Austr. Systemat. Bot.* 9: 283-290.
- Gomes S, Somavilla N, Gomes-Bezerra k, Do Couto S, De-Carvalho P, Graciano-Ribeiro D (2009) Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Bot. Bras.* 23: 223-238.
- Kreader C (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 1102-1106.
- Kovarik A, Pires J, Leithch A, Lim K, Sherwood A, Matyasek R, Rocca J, Soltis D, Soltis P (2005) Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics* 169: 931-944.
- Landrum L (1981) *A Monograph of the Genus Myrceugenia* (Myrtaceae). Monografía N° 29. Flora Neotropical. 137 pp.
- Landrum L, Sharp W (1989) Seed coat characters of some American Myrtinae (Myrtaceae): *Psidium* y related genera. *Systemat. Bot.* 14: 370-376.
- Lucas E, Belsham S, Nic Lughadha E, Orlovich D, Sakuragui C, Chase M, Wilson P (2005) Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae- preliminary molecular evidence. *Plant Systemat. Evol.* 251: 35-51.
- Mc Vaugh R (1963) Tropical American Myrtaceae, II, Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. *Fieldiana* 29: 393-532.
- Mc Vaugh R (1968) The genera of American Myrtaceae. An Interim report. *Taxon* 17: 354-415.
- Molero T, Molina J, Casassa-Padrón A (2006) Cariotipo de selecciones de *Psidium* tolerantes y resistentes a *Meloidogyne incognita*. *Bol. Centro Inv. Biol.* 40: 149-166.
- Pérez-Cortéz S (2007) Géneros *Calycolpus*, *Calycorectes* y *Myrciaria* (Myrtaceae) en el Herbario Nacional de Venezuela (VEN). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 24, Supl. 1: 196-201.
- Rivero G, Pacheco D, Fuenmayor J, Sánchez A, Quirós M, Ortega J, Bracho B, Taborda J (2012) Análisis morfológico de especies de *Psidium* (Myrtaceae) presentes en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. LUZ* 29: 72-103.
- Salazar G, Chase M, Soto M, Ingrouille M (2003). Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *Am. J. Bot.* 90: 777-795.
- Salywon A, Snow N, Landrum L (2002) Phylogenetic relationships of the berry fruited Myrtaceae as inferred from ITS sequences. Abstract. *Botany 2002 Conference*. University of Wisconsin. Madison, WI, EEUU.
- Sang T, Crawford D, Stuessy F (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84: 1120-1136.
- Simmons M (2004) Independence of alignment and tree search. *Mol. Phylog. Evol.* 31: 874-879.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15: 199-203.
- Swofford DL (2002) *PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)*. Vers. 4. Sinauer. Sunderland, MA, EEUU.
- Tantawy M (2004) Morpho-anatomical study on certain taxa of Myrtaceae. *As. J. Plant Sci.* 3: 274-285.
- Tate J, Simpson B (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *System. Bot.* 28: 723-737.
- Udovic F, Ladiges P (2000) Informativeness of nuclear and chloroplast DNA regions and the phylogeny of the eucalypts and related genera (Myrtaceae). *Kew Bull.* 55: 663-645.
- Villaseñor J, Dávila P (1992) *Breve Introducción a la Metodología Cladística*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 48 pp.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. Nueva York, EEUU. pp. 315-322
- Wilson P, O'Brien M, Gadek P, Quinn C (2001). Myrtaceae revisited: A reassessment of infra-familial groups. *Am. J. Bot.* 88: 2013-2025.