



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN
Persea DE UN BANCO DE GERMOPLASMA
MEDIANTE MARCADORES RAPD E ISSR**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

P R E S E N T A:

JUAN CARLOS REYES ALEMÁN



AGOSTO DE 2008

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO



Instituto de Horticultura

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR JUAN CARLOS REYES ALEMÁN BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO Y ASESORADO POR LA DRA ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA, REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ Y JURADO EXAMINADOR QUE A CONTINUACIÓN SE MENCIONA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

ASESOR:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DR. JUAN GUILLERMO CRUZ CASTILLO

ASESOR:



DRA. MARÍA ISABEL REYES SANTAMARÍA

LECTOR EXTERNO:



DRA. MARÍA DE LA CRUZ ESPÍNDOLA BARQUERA

CHAPINGO, MEXICO, AGOSTO DE 2008

DEDICATORIA

A la memoria de mis entrañables padres (†, †)

*Para mi amada esposa Paty y mis queridos niños
(Memo, Cristy, Ferr. †), que son todo . . .*

A mis hermanos.

DATOS BIOGRAFICOS

DATOS PERSONALES:

Nombre: Juan Carlos Reyes Alemán

Fecha de nacimiento: 17 de abril de 1969

Lugar de Nacimiento: Naucalpan de Juárez, México

FORMACIÓN ACADÉMICA:

1987-1992: Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

1997-1998: Maestría en Edafología, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Texcoco, México.

2003-2005: Doctorado en Horticultura, Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo a través de su Instituto de Horticultura por la oportunidad de estos estudios y de la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el apoyo recibido.

A la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. por la oportunidad de la realización de estos estudios.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego por su apoyo moral, académico y conducción en este estudio.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su paciencia y orientación en esta investigación.

Al Ing. Pedro Mijares Oviedo por su apoyo y confianza.

Al Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo por su apoyo en el análisis de la información

A la Dra. María Isabel Reyes Santamaría por su ayuda en la culminación de este estudio.

A la Dra. María de la Cruz Espíndola Barquera su apoyo y comprensión.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, por todo su apoyo durante el proceso de tramitación.

A mis colegas Carlos Núñez Colín y Lily Zelaya Moreno por su colaboración en el análisis y procedimientos estadísticos y de laboratorio respectivamente.

A demás colegas y amigos de la UACH y CICTAMEX que desinteresadamente tuvieron que ver en la realización de esta meta.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN Y ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	
1. Introducción general	1
1.2 Objetivos generales	5
1.3 Hipótesis	5
1.4 Etapas del trabajo	6
1.5. Literatura consultada	9
CAPÍTULO 2.	
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Origen y distribución	11
2.2.Taxonomía y descripción botánica	12
2.2.1. Taxonomía	12
2.2.2. Descripción botánica	13
2.3. Características de algunas especies del género <i>Persea</i> y de un género afín	17
2.3.1. <i>Persea nubigena</i>	17
2.3.2. <i>Persea steyermarkii</i>	18
2.3.3. <i>Persea schiedeana</i>	19
2.3.4. <i>Persea cinerascens</i>	19
2.3.5. <i>Beilshmiedia sp.</i>	20
2.4. Razas de aguacate	21
2.4.1. Ecología de las razas de aguacate	23
2.4.2. Condiciones climáticas para la raza Mexicana	25
2.4.3. Condiciones climáticas para la raza Guatemalteca.	26
2.4.4. Condiciones climáticas para la raza Antillana.	27
2.5. Cronología de estudios taxonómicos en aguacate.	27
2.6. Controversias taxonómicas recientes en aguacate	31
2.7. Caracterización morfológica en aguacate	33
2.7.1. Procedimiento utilizado en la caracterización de un banco de germoplasma de aguacate (Cabrera-Hernández, 2005).	38

2.7.2. Conclusiones del análisis morfológico realizado por Cabrera-Hernández (2005)	42
2.8. Cronología de estudios de marcadores moleculares en aguacate	44
2.9. Técnica de componentes principales utilizada en la caracterización de frutales.	46
2.10. Tipos de marcadores moleculares	47
2.10.1. Descripción de las metodologías RAPD e ISSR para determinar marcadores moleculares.	50
2.11. Literatura citada.	53

CAPÍTULO 3

III. DISTINCIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Persea* CON MARCADORES RAPD E ISSR

RESUMEN	59
ABSTRACT	60
3.1 Introducción	61
3.2. Materiales y métodos	63
3.2.1. Extracción de DNA	63
3.2.2. PCR	66
3.2.3. Elaboración de geles	68
3.2.4. Análisis estadístico	68
3.3. Resultados	69
3.4. Discusión	71
3.5. Agradecimientos	76
3.6. Literatura citada	77

CAPÍTULO 4

IV. SEPARACIÓN DE 79 ACCESIONES DEL GÉNERO *Persea* USANDO POLIMORFISMOS DE DNA OBTENIDOS CON RAPD e ISSR

RESUMEN	87
ABSTRACT	88
4.1. Introducción	89
4.2. Materiales y métodos	94
4.2.1. Extracción de DNA	96
4.2.2. Protocolo de extracción	97
4.2.3. Procedimiento de la PCR	98
4.2.4. Elaboración de geles	100
4.2.5. Análisis estadístico de la información	101
4.3. Resultados	103
4.4. Discusión	110
4.4.1. RAPD	110
4.4.2. ISSR	118

4.5. RAPD <i>versus</i> ISSR	119
4.6. Conclusiones	121
4.7. Literatura citada	124

CAPÍTULO 5
V.- ANEXOS

5.1. Anexo 1. Geles de poliacrilamida obtenidos mediante: RAPD e ISSR	129
5.2. Anexo 2. Matrices de distancias de similitud obtenidas mediante RAPD e ISSR	144

INDICE DE CUADROS

	Página
CAPÍTULO 2	
Cuadro 2.1 Colectas del banco de germoplasma consideradas en el estudio de caracterización morfológica por Cabrera Hernández (2005).	34
Cuadro 2.2 Caracteres Vegetativos considerados por Cabrera-Hernández (2005).	37
Cuadro 2.3 Caracteres de flor considerados por Cabrera-Hernández (2005).	37
Cuadro 2.4 Caracteres de fruto considerados por Cabrera-Hernández (2005).	37
Cuadro 2.5 Ficha pomológica utilizada para la colecta de información de campo en la caracterización de un banco de Germoplasma de Aguacate (Cabrera-Hernández, 2005).	38
Cuadro 2.6 Resumen cronológico sobre estudios utilizando marcadores moleculares y taxonómicos que han sido realizados por diferentes investigadores a través del tiempo.	44
CAPÍTULO 3	
Cuadro 3.1. Genotipos de <i>Persea</i> tipificados mediante RAPD e ISSR en el estudio.	81
Cuadro 3.2. Soluciones para el protocolo adaptado en el laboratorio de biología molecular en la Universidad Autónoma Chapingo.	81
Cuadro 3.3 Soluciones del buffer de extracción para el protocolo adaptado del Laboratorio de Biotecnología de INIFAP en Uruapan, Michoacán.	82
Cuadro 3.4 Iniciadores RAPD utilizados en el estudio de germoplasma de aguacate.	82
Cuadro 3.5 Iniciadores ISSR utilizados en el estudio de germoplasma de aguacate.	82
Cuadro 3.6 Genotipos de <i>Persea</i> y fragmentos exclusivos de DNA	

detectados mediante RAPD e ISSR. 83

CAPÍTULO 4

Cuadro 4.1 Setenta y nueve genotipos de *Persea* analizados con RAPD e ISSR. 95

Cuadro 4.2 Soluciones del amortiguador de extracción utilizado. 98

Cuadro 4.3. Iniciadores utilizados en la amplificación de DNA con RAPD e ISSR. 100

Cuadro 4.4. Genotipos de *Persea* que presentaron bandas exclusivas con RAPD. 103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Figura 2.1 Arbol, hojas y frutos de <i>P. nubigena</i>	18
Figura 2.2 Arbol, hojas y frutos de <i>Persea steyermarkii</i>	18
Figura 2.3 Hojas y frutos de <i>Persea shiedeana</i>	19
Figura 2.4 Arbol, hojas y frutos de <i>Persea cinerascens</i>	20
Figura 2.5 Arbol y frutos de <i>Beilschmiedia anay</i>	21
Figura 2.6 Hojas y flores de <i>Beilschmiedia mierssi</i>	21
Figura 2.7 Fruto de raza mexicana <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	23
Figura 2.8 Fruto de raza guatemalteca <i>P. americana</i> var. <i>Guatemalensis</i>	24
Figura 2.9 Fruto de raza antillana <i>P. americana</i> var. <i>americana</i>	26
Figura 2.10 Formas de hojas, frutos, pedúnculo, pedicelo y extensión de vástagos en aguacate (Barrientos et al., 1991), utilizados en la descripción morfológica del estudio realizado por (Cabrera-Hernández, 2005)	41
Figura 2.11 Dendograma que indica la distribución de agrupamientos basados en caracteres morfológicos de <i>Persea</i>	43
CAPÍTULO 3	
Figura 3.1 Perfiles RAPD obtenidos con el iniciador 16 de la serie E de Roth en diferentes especies del género <i>Persea</i> separados en geles de acrilamida 29:1. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	83
Figura 3.2 Perfiles ISSR obtenidos con el iniciador (GA) ₈ YC en diferentes especies del género <i>Persea</i> separados en geles de acrilamida 29:1. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	84
Figura 3.3 Dendograma de 14 accesiones de aguacate obtenido con RAPD combinado las huellas de DNA obtenidas con 7 iniciadores arbitrarios de Roth (A-15, C-8, C-10, C-13, E-14, E-16 y E-18) utilizando	

el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”) 85

Figura 3.4 Dendograma de 14 accesiones de aguacate obtenido con ISSR considerando un análisis estadístico combinado entre 5 iniciadores [(AC)₈YG, (GA)₈YC, (GACA)₄, (TCC)₅RY y (GATA)₄] utilizando el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”) 86

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Programa de termociclaje utilizado para RAPD 98

Figura 4.2 Programa de termociclaje utilizado para ISSR 99

Figura 4.3 Ejemplo de gel de poliacrilamida correspondiente a RAPD de 88 genotipos de *Persea* 102

Figura 4.4 Ejemplo de gel de poliacrilamida correspondiente a ISSR de 90 genotipos de *Persea* 102

Figura 4.5 Dendrograma que agrupa a 79 accesiones de *Persea* caracterizadas con 8 iniciadores para RAPD. El agrupamiento se realizó con el índice Jaccard y la distancia Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones 106

Figura 4.6 Agrupamientos correspondientes a *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana) 107

Figura 4.7 Dendrograma que agrupa a 72 accesiones de *Persea* caracterizadas con 5 iniciadores para ISSR. El agrupamiento se realizó con el índice Jaccard y la distancia Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones 109

Figura 4.8 Agrupamiento correspondiente al subgénero *Eriodaphne* 110

CAPÍTULO 5

Figura 5.1 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 15 de la serie A en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco 130

Figura 5.2 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 8 de la serie C de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco 131

Figura 5.3 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 10 de la serie C de Roth en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	132
Figura 5.4 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 13 de la serie C de Roth en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	133
Figura 5.5 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 7 de la serie E de Roth en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	134
Figura 5.6 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 14 de la serie E de Roth en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	135
Figura 5.7 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 16 de la serie E de Roth en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	136
Figura 5.8 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 18 de la serie E de Roth en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	137
Figura 5.9 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador ANCH 6 en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	138
Figura 5.10 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador DBDA(CA) ₇ en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	139
Figura 5.11 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (AC) ₈ YG en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	140
Figura 5.12 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (GA) ₈ YC en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco	141
Figura 5.13 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (TCC) ₅ RY en individuos de <i>Persea</i> .	

El marcador de peso molecular de de 1 kb de Gibco	142
Figura 5.14 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (GACA) ₄ en individuos de <i>Persea</i> . El marcador de peso molecular de de 1 kb de Gibco	143
Figura 5.15 Matriz de distancias de similitud de individuos de <i>Persea</i> , obtenida mediante RAPD, con el índice Nei and Li (Dice)	145
Figura 5.16 Matriz de distancias de similitud de individuos de <i>Persea</i> , obtenida mediante ISSR, con el índice Nei and Li (Dice)	146
Figura 5.17 Matriz de distancias de similitud de individuos de <i>Persea</i> , obtenida al combinar análisis tipo RAPD e ISSR, con el índice Nei and Li (Dice)	147

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Persea* DE UN BANCO DE GERMOPLASMA MEDIANTE MARCADORES RAPD E ISSR

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY IN *Persea* AT A GERMPLASM BANK BY MEANS OF RAPD AND ISSR MARKERS

Juan Carlos Reyes Alemán¹ y Alejandro F. Barrientos Priego²

RESUMEN

Con la finalidad de establecer diferencias en la diversidad genética del subgénero *Persea* resguardado en el Depositario Nacional de Germoplasma de Aguacate de México, se estudiaron ocho especies (*P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens* y *P. indica*) mediante marcadores moleculares RAPD e ISSR, los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida. Las huellas de DNA se analizaron con métodos estadísticos multivariadas y de remuestreo. Se detectaron fragmentos polimórficos de DNA útiles para la distinción inter e intraespecífica. Los análisis mediante RAPD a diferencia de ISSR, agruparon de forma congruente a las diferentes especies de acuerdo a la taxonomía actual. Posteriormente se analizaron 79 accesiones que correspondieron a 11 especies; las ocho anteriores más *Persea* sp., *P. parvifolia*, *P. meyeniana* y *P. gigantea*. Los dendogramas mostraron agrupamientos similares correspondientes a las tres razas de aguacate, se encontró la separación de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*. Se distinguió a "Freddy 4" y "Nubes 104" dos accesiones consideradas raza Antillana como probables miembros de *P. americana* var. *costarricensis*, y a la colecta "Floccossa H" como posible *P. chamisonis*.

Palabras clave: aguacate, aguacate de monte, aguacatillo, chinini, germoplasma, Lauraceae, marcadores moleculares, recursos fitogenéticos.

ABSTRACT

With the aim of establishing differences in the subgenus *Persea* genetic diversity maintained in the National Avocado Germplasm Repository of Mexico, eight species were studied (*P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens* y *P. indica*) using molecular markers by means of RAPD and ISSR techniques, where the PCR products were separated in acrylamide gels. The DNA fingerprinting were analyzed using multivariate statistical methods and bootstrapping to establish their genomic relationships. Useful DNA polymorphic fragments were found for the inter and intra-specific distinction of the eight species considered of *Persea* in the study. The statistical analysis grouped the different species congruently to the current taxonomic classification. In the second part were analyzed 79 accessions belonging to 11 species: the mentioned eight plus *Persea* sp., *P. parvifolia*, *P. meyeniana* y *P. gigantea*. The dendograms showed similar groupings to the three avocado races and it was found the separation of the subgenus *Persea* and *Eriodaphne*. The accessions "Freddy 4", and "Nubes 104" considered as West Indian race, resulted probably as *P. Americana* var. *Costaricensis*, and "Floccossa H" probably of *P. chamisonis*.

Keywords: Avocado, "aguacate de monte", "aguacatillo", "chinini", germplasm, Lauraceae, molecular markers, plant genetic resources.

¹ Estudiante del Postgrado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México.

² Postgrado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México

CAPÍTULO I

1. Introducción general

La conservación del germoplasma del aguacate implica fases y acciones que demandan tiempo y trabajo institucional, estas etapas son; exploración, conservación, caracterización y utilización. Los bancos de germoplasma tienen la función del resguardo de los recursos colectados mediante accesiones que se conservan *ex situ*, en ellos la descripción de cada colecta debe de actualizarse constantemente mediante su caracterización, para tal fin debe realizarse la medición de caracteres morfológicos, complementado con el análisis de marcadores moleculares. El uso de herramientas genéticas modernas ayudan en los programas de mejoramiento incorporando métodos moleculares que permiten un análisis sistemático de la diversidad genética en los bancos de germoplasma (Witney *et al.*, 2005).

La conservación y uso de los recursos genéticos de plantas es esencial para el mejoramiento y mantenimiento continuo de la agricultura y la producción de plantas y por consecuente de un desarrollo sostenible de la misma. Los recursos genéticos de plantas incluyen el material de propagación tanto reproductivo como vegetativo de: (1) Cultivares en uso actual y nuevos, (2) Cultivares obsoletos, (3) Cultivares tradicionales utilizados por los productores, (4) Materiales silvestres y parientes cercanos de las especies cultivadas, (5)

portainjertos especiales incluyendo materiales élite y líneas mejoradas, aneuploides y mutantes (Frankel *et al.*, 1995).

Los recursos genéticos en plantas se describen como al material heredable dentro y entre especies de árboles que tienen o pueden tener para el humano, interés económico, científico y social. El objetivo de la conservación de los recursos genéticos de plantas es preservar una muestra lo más ampliamente posible de la diversidad genética de especies incluyendo genes reconocidos, caracteres y a los genotipos (Karp *et al.*, 1997).

La conservación adecuada de los recursos genéticos de plantas requiere de un esfuerzo complementario de métodos de conservación *ex situ* e *in situ* para eficientizar a la diversidad genética disponible. El objetivo de la conservación *ex situ* consiste en mantener a las colectas sin cambio en su constitución genética (Karp *et al.*, 1997). Muchas especies pueden almacenarse por periodos largos de tiempo a bajas temperaturas y humedad, sin embargo, hay especies cuyas semillas no se pueden conservar de esta manera, ya que producen semillas "recalcitrantes" y no pueden ser almacenadas como en el género *Persea*. Este grupo de especies pueden ser mantenidas solamente *ex situ* como colecciones en campo, o *in vitro* mediante cultivo de tejidos o criopreservación. Los curadores de los bancos de germoplasma tienen la encomienda de mantener la integridad de las accesiones conservadas e identificarlas, mediante una adecuada caracterización de cada una de ellas para determinar su identidad (Karp *et al.*, 1997).

En el presente estudio se realizó una caracterización de tipo molecular mediante las técnicas RAPDs e ISSRs de 89 accesiones conservadas en un banco de germoplasma con la finalidad de distinguir a la especie a la que pertenecen, o la relación entre ellas. En el presente trabajo de caracterización molecular, se consideró un estudio morfológico previo en donde se caracterizaron a las accesiones con base en características de hoja, flor, fruto y basados en las directrices de Barrientos-Priego *et al.* (1991), IPGRI (1995) y UPOV (2006).

A la par y de manera reciente, se han desarrollado escritos que indican un desacuerdo sobre la clasificación taxonómica del aguacate, al respecto van der Werff (2002) mencionó esto al haber identificado a las siguientes especies de *Persea*; *P. albiramea* van der Werff, *P. brevipetiolata* van der Werff y *P. laevifolia* van der Werff) que difieren con la clasificación de Kopp (1966), indicando que en el subgénero *Persea* hay solo dos especies *Persea americana* y *Persea shiedeana*. Indica este autor además que la variabilidad genética en aguacate se debe básicamente a los procesos de selección y cultivo que el hombre ha hecho a través de los años.

Las dificultades en la clasificación de las variedades hortícolas de aguacate, junto con la influencia del hombre es el hecho de que su progenie es extremadamente variable (Gama-Campillo, 1994)

Gama-Campillo (1994), realizó un estudio para obtener información relacionada con iconografía, etnobotánica, lingüística y acontecimientos históricos de las especies de aguacate expuestas a las relaciones planta-humano, lo llevó a cabo mediante un estudio sistemático que intentó ayudar a proponer una reclasificación taxonómica, aunque con sesgos palpables.

Mediante estudios heurísticos y de parsimonia Campos (2007), propuso algunas adecuaciones de reclasificación al género *Persea* de manera reciente, sugiriendo que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* podrían ser considerados precisamente como 2 géneros aparte.

Con base en lo anterior, se llevó a cabo un estudio de la variabilidad genómica y la relación genética que guardan las diferentes especies y accesiones de *Persea* que se conservan en el banco de germoplasma de aguacate de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. mediante marcadores moleculares del tipo ISSR y RAPD, en donde se establecieron los siguientes objetivos:

1.2 Objetivos generales

1.2.1. Establecer la distinción mediante las técnicas de marcadores RAPD e ISSR de genotipos representativos de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*.

1.2.2. Establecer el perfil molecular de huellas de DNA de las accesiones de aguacate que comprenden el banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX , S.C., mediante análisis RAPDs e ISSRs.

1.2.3. Establecer agrupamientos de *Persea* con base en la similitud y diferencias genómicas asociadas a los grupos ecológicos; razas Mexicana, Guatemalteca y Antillana.

1.2.4. Relacionar mediante análisis moleculares a las accesiones del banco que no se encuentren asociadas a algún grupo ecológico definido.

1.3 Hipotesis

Ho: El análisis molecular mediante RAPDs e ISSRs de DNA extraído de hojas de accesiones de *Persea* provenientes de un banco de germoplasma, permitirá caracterizarlas y asociarlas con base en sus diferencias genómicas; así mismo, puede proveer información básica que sugiera la posible ubicación taxonómica de las accesiones estudiadas.

Ha: El análisis molecular mediante RAPDs e ISSRs de DNA extraído de hojas de accesiones de *Persea* provenientes de un banco de germoplasma, no permitirá caracterizarlas ni asociarlas con base en sus diferencias genómicas, así mismo, no podría proveer información básica que sugiera la posible ubicación taxonómica de las accesiones estudiadas.

1.4. Etapas del trabajo

1.4.1. Los resultados de la investigación se indican en este escrito a manera de artículos los cuales son anexados, uno de ellos (capítulo 3) se transcribió de manera idéntica a la versión enviada para su publicación y el capítulo 4 está escrito de la forma como será enviado para su posible publicación.

1.4.2. El estudio consistió de 3 etapas, Inicialmente en el capítulo 1 se elaboró el marco teórico sobre el género *Persea* para considerar su origen, clasificación y taxonomía tradicionales y se comentó sobre los avances de estudios moleculares y actuales controversias taxonómicas del género. En este capítulo fue citado y comentado un trabajo previo con las mismas accesiones del estudio sobre caracterización morfológica realizado por Cabrera Hernández (2005) que permitió ponderar los resultados obtenidos molecularmente.

1.4.3. Posteriormente se llevó a cabo la adecuación del protocolo de extracción del DNA genómico. Dos fueron las modificaciones principales al método del CTAB (Procedimiento basado en los protocolos de Saghai-Marroof *et al.* (1984); el primer método usado fue el utilizado en el laboratorio de biología molecular del Departamento de Fitotecnia de la UACH (Modificado por Rogers y Bendich (1985) y Doyle y Doyle (1987). El segundo fue el procedimiento modificado en el laboratorio de biotecnología (INIFAP, Uruapan, Michoacán (Clarke *et al.* 1989) utilizado en el trabajo de tesis de licenciatura de Álvarez-García (2003). Tres modificaciones importantes fueron llevadas a cabo durante el proceso, estas fueron el ajuste a las concentraciones de PVP y BME (beta-mercaptoetanol), asimismo los tiempos y temperaturas durante el proceso de extracción, lo anterior permitió obtener DNA en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo los análisis moleculares, aunque no de algunas accesiones que definitivamente no fue posible realizar la extracción.

1.4.4. Se analizaron inicialmente 14 accesiones mediante RAPDs e ISSRs, las cuales representan a las especies del género *Persea* que se conservan en el banco de germoplasma de aguacate de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. Esta muestra representativa comprendió además accesiones pertenecientes a los diferentes grupos ecológicos, la finalidad fue sondear la tendencia de los agrupamientos así como afinar las metodologías utilizadas. Los resultados de esta parte se plasman en el capítulo 3, y permitieron la

elaboración de un artículo científico el cual se encuentra en vías de ser publicado en una revista arbitrada.

1.4.5. En la última parte de la tesis el esquema de análisis para la generación de huellas genómicas mediante ISSRs y RAPDs fue ampliado a 89 accesiones, esta muestra más amplia de genotipos comprendió al menos un ejemplar de cada una de las 11 especies que se conservan en el banco de germoplasma, así como de un grupo mayor y representativo de cada uno de los 3 grupos ecológicos conocidos como Razas: Mexicana, Antillana y Guatemalteca. Los resultados de esta parte se plasman y discuten en el capítulo 4, el cual fue elaborado a manera de artículo para ser posteriormente enviado para su posible publicación.

Tanto del capítulo 3 como del 4 se llevó a cabo un análisis multivariado de la información para realizar el agrupamiento por similitudes genómicas de las accesiones en estudio, permitiéndose estimar así su variabilidad genética que determina las relaciones inter e intraespecíficas.

1.5. Literatura citada

- Álvarez-García G. 2002. Aislamiento de ADN genómico de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo especialista en Fruticultura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 55 p.
- Barrientos P., F. A., Ben -Ya'cov, A. D., Cruz T., E., López L., L., Buffer, G., y M. W. Borys. (1991). Descriptores para aguacate. Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México. 69 p.
- Campos R., E., Terrazas, T. and L. López-Mata 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 249-258.
- Cabrera-Hernández, C. 2005. Caracterización morfológica (vegetativa, flor y fruto) de colectas del genero *Persea* en un banco de germoplasma. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Horticultor. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México. 68 p.
- Clarke, B.C., Moran, L.B. and R. Appels. 1989. DNA analysis in wheat breeding. *Genome*. 32: 334-339.
- Doyle, J.J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Frankel, O. H., Brown, A. H. D. and J. Burdon. 1995. *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge Univ. Press. London, U.K.
- Gama-Campillo, L. 1994. Studies on the systematic and ethnobotany of the subgenus *Persea*. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, University of California, Riverside, Riverside, USA. 294 p.
- IPGRI. 1995. Descriptores para aguacate-Descriptors for avocado (*Persea* spp.) Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI-FAO). Roma, Italia. 54 p.

- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. and T. Hodgkin. 1997. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. 47 p.
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea*-Lauraceae). Mem. New York Bot. Gard. 14: 1-117.
- Rogers, S.O. and A. J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol Biol Rep 5: 69-76.
- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K., Jorgensen, R.A. and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS 81: 8014-8018
- UPOV. 2006. Avocado (*Persea americana* Mill). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34 p.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central América. Novon 12(4): 575-586.
- Witney, G. W., Arpaia, M. L., Clegg, M. T. and G. W. Douhan. 2005. Avocado germplasm preservation and breeding program in California. Session 4. New germplasm and global breeding programmes. New Zealand and Australian Avocado Grower's Conference. 20-22 september. Tauranga, New Zealand. 8 p.

CAPÍTULO 2

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución

El árbol de aguacate es originario de México, prueba de ello son los restos fósiles de 8000 años de antigüedad encontrados en Tehuacán Puebla, y es a través de este descubrimiento que se sabe, ha sido utilizado como alimento y planta medicinal desde hace milenios (Barrientos y López, 2000).

La distribución de la planta del aguacate y la evidencia taxonómica son compatibles con el hecho de que es originario de México central (Zentmyer *et al.*, 1986).

El aguacate como el maíz, el dátil, el higo, el tabaco y la caña de azúcar han sido cultivados desde la antigüedad teniendo transformaciones a través de la selección del hombre desde la prehistoria (Zentmyer *et al.*, 1986).

Las culturas americanas antiguas contaban con un buen conocimiento acerca del aguacate y sus variantes, siendo en el código florentino donde se mencionan tres tipos de este grupo cuya descripción supone que: "aoacatl",

podría tratarse de *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana), “tlacacolaocatl” *Persea americana* var. *americana* (raza Antillana) y “quillaoocatl” *Persea americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca) (Barrientos y López, 2000).

2.2. Taxonomía y descripción botánica

2.2.1. Taxonomía

El aguacate es una dicotiledónea perteneciente al orden de las Ranales y a la familia Lauraceae. Fue clasificada por Gaertner como *Persea grátisima* y como *Persea americana* por Miller.

El aguacate perteneciente al género *Persea* contiene alrededor de 85 especies, la mayoría se encuentran desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*). Son excepciones *Persea indica* que se encuentra en las Islas Canarias (España) y otras del sur de Asia cuya inclusión en el género *Persea* no está aun definida.

El género *Persea* se divide en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne* (Koop, 1966), diferenciables por la cara interior de los sépalos; *Persea rigens* y *Persea cinerascens*. El aguacate *Persea americana* Mill., pertenece al subgénero *Persea*, que se conoce como el de los verdaderos aguacates y que son de un

tamaño mayor que los del otro subgénero; además del aguacate, se encuentran en este grupo *Persea nubigena* (aguacate de monte).

Koop (1966) clasificó al aguacate mexicano como *P. americana* var. *drymifolia*, y a los tipos guatemalteco y antillano como *P. americana* var. *americana* y a un aguacate silvestre como *P. americana* var. *nubigena* e incluye en este subgénero a *P. shiedeana*, *P. steyermakii* Allen y *P. floccosa* Mez.

2.2.2. Descripción botánica

El aguacate es una especie polimorfa y por ello muchos caracteres (dimensión de la hoja, tamaño del fruto, coloración del epicarpio, entre otros) son muy variables (Calabrese, 1992).

Aspecto general. Es una especie perenne de tallo aéreo (o epigeo) con características leñosas y follaje siempre verde, su raíz es bastante superficial.

Hojas. Sus hojas son simples, alternas, pecioladas y enteras. El pecíolo tiene de longitud de 1.5 a 3.5 cm. Las hojas de forma variable que va de elíptica-alargada, oval-oblonga a ovada. Están provistas de yemas axilares y vena pinnada. El ápice es más o menos agudo según la raza. La vena principal es de color amarillo pálido; dicha vena es especialmente prominente en la cara inferior. Cuando la hoja es joven presenta un color rojizo (contenido de pigmentos en las vacuolas) y una epidermis pubescente; al llegar a la madurez

estas hojas se tornan lisas, coriáceas y de un verde intenso y oscuro. La cara superior es glabra mientras que la inferior es ligeramente pubescente. Su superficie presenta numerosos puntos glandulares transparentes. La dimensión de las hojas varía mucho de 5 a 20 cm. de longitud y de 3 a 10 cm. de anchura. El árbol está normalmente cubierto de hojas y una vez cumplido su ciclo éstas se caen, siempre que ya se hayan renovado en las ramas. En algunas variedades antes de la floración hay una defoliación de corto tiempo, lo que significa que están vegetando fuera de su hábitat, es decir que no es una variedad apropiada para la zona en cuestión (Calabrese, 1992).

Parte aérea. Los árboles espontáneos de aguacate pueden alcanzar hasta 20 m de altura, con diámetro del tronco muy superior a un metro (Calabrese, 1992).

Ramas. El aguacate es sensible a las quemaduras provocadas por el sol y su susceptibilidad es variable según las variedades. Las ramas son abundantes, generalmente son delgadas y frágiles, por lo que se pueden romper al cargar muchos frutos y por la acción del viento. Las heladas también dañan los tejidos. Las ramas jóvenes son pubescentes, las adultas lisas de color verde pálido. Las ramas más vigorosas pueden alcanzar un diámetro de 5-7 cm en un año. (Calabrese, 1992).

Yemas. Las yemas pueden ser apicales o axilares. Estas últimas en la mayor parte de los casos, o permanecen en estado latente o se desprenden, de tal

forma que el crecimiento del aguacate tiene lugar, la mayor parte de las veces, a través de las yemas apicales (Calabrese, 1992).

Raíces. El sistema radical tiene una raíz principal corta y débil como la mayoría de las especies arbóreas que tienen su origen en ambientes ricos en agua en el periodo vegetativo. La mayor parte del aparato radical está de hecho comprendido en los primeros 50 cm del aguacate por ello no tiene necesidad de suelos profundos. La profundidad alcanzada puede ser de 1 a 1.5 m o mayor en suelos sueltos. La raíz del aguacate se caracteriza por no contar con pelos radicales y la absorción de agua y nutrientes se realiza principalmente en las puntas de las raíces a través de los tejidos primarios; esto determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad que induce a las asfixias y ataques de hongos que pudren los tejidos (Calabrese, 1992).

Flor. Las flores son hermafroditas (poseen los dos sexos), actinomorfas (simétricas), de color verde amarillento y pequeñas, de tal forma que en el momento de su apertura suelen medir de 1 a 1.5 cm de diámetro con un pedicelo corto y pubescente. La inflorescencia (agrupación de flores), es una panícula (racimo de racimos) que puede ser axilar o terminal, ya sea determinada o indeterminada. Se estiman unas 200 flores por panícula. La flor consta de un perigonio con dos verticilos trímeros. El androceo está compuesto por 12 estambres insertos por debajo del ovario o alrededor del mismo. De estos estambres solo 9 son funcionales. El gineceo posee un solo pistilo, un ovario súpero (por encima del pedúnculo) que es unilocular y con un solo óvulo.

En la parte superior de la panícula se encuentra una yema vegetativa que luego se desarrolla en rama (a veces se utiliza para injertar). El eje de la inflorescencia es grueso, cilíndrico y ligeramente achatado, de color verde-amarillo, densamente pubescente y provisto de numerosas brácteas también pubescentes. El perianto aparentemente carece de corola, pero las piezas que lo constituyen están dispuestas en dos series cada una formada por tres elementos. Las piezas externas son más grandes. Podría tratarse de tres pétalos y tres sépalos muy similares entre sí (Calabrese, 1992).

Fruto. El fruto es una baya que posee un pericarpio (delgado, grueso quebradizo), un mesocarpio carnoso (con un porcentaje de grasa que varía de 5 a 30 %) y el hueso. A pesar de las numerosas flores que hay en una inflorescencia, menos del 1 % tienen fruto. Los frutos de las últimas flores son, generalmente, más pequeños que los de las primeras. El fruto suele ser asimétrico. Externamente, la epidermis está recubierta de una ligera capa de cera y es más o menos rica en lenticelas amarillentas dependiendo del cultivar. El peso del fruto es diferente según el tipo ecológico, oscilando entre los 50 gramos a 2.5 kg. La parte comestible es de color amarillo pálido con una leve cubierta más verde, adherida al epicarpio. La pulpa es rica en aceite (hasta 25-28 %) la cual es menos abundante en los frutos de raza antillana (Calabrese, 1992).

Semilla. La semilla es de tamaño grande. En la maduración puede separarse de la pulpa. Suele ser monoembrionica. A veces puede ser observada en la

germinación de una semilla de aguacate la brotación de más de un tallito, no se trata de plantas provenientes de distintos embriones sino de ramificaciones formadas en la base de las dos mitades de la semilla. Su forma es variada, pudiendo ser: piriforme, esférica u ovalada. El color también varía: verde violáceo o rojizo (Calabrese, 1992).

2.3. Características de algunas especies del género *Persea* y de un género afín

2.3.1. Persea nubigena

Se caracteriza por sus hojas firmes, ásperas en la superficie y pequeñas, la hoja no presenta olor a anís al ser frotada. La estructura de las flores es similar al aguacate común, pero los racimos son más consistentes y más grandes y largos. El diámetro del fruto varía de 1.5 a 3 pulgadas, su forma es oval a circular, la semilla es grande en proporción al tamaño de la fruta, la cual presenta una cáscara gruesa (Figura 2.1). Es considerado un progenitor del aguacate guatemalteco además de ser compatible con el aguacate (Schroeder, 1951).



Figura 2.1 Árbol, hojas y frutos de *P. nubigena*.

2.3.2. *Persea steyermarkii*

Es un taxón muy raro de México, Guatemala, El Salvador y Venezuela. Su inflorescencia, flores y frutos indican una relación muy cerrada con *P. nubigena*, es considerado como un ancestro de la variedad guatemalteca (Shieber y Zentmyer, 1978) (Figura 2.2).



Figura 2.2 Arbol, hojas y frutos de *Persea steyermarkii*

2.3.3. *Persea schiedeana*

Es un ejemplar muy vigoroso nativo del trópico del sur de México y América Central, en México es conocido como “Chinini” o “Chinene” entre otros. En Guatemala se han descrito ejemplares que alcanzan más de 20 m de altura, su semilla es grande, el epicarpio es de color verde claro, grueso pero flexible, por lo tanto es fácil de desprenderse. El color de la pulpa varía del blanco a café pálido y tiende a exudar un jugo lechoso. Su semilla es más percedera que el aguacate ordinario. *P. schiedeana* tiene una estrecha relación botánica con el aguacate común *P. americana* (Figura 2.3). La principal diferencia encontrada es su pronunciada pubescencia en tallos, hojas y flores (Schroeder, 1974).

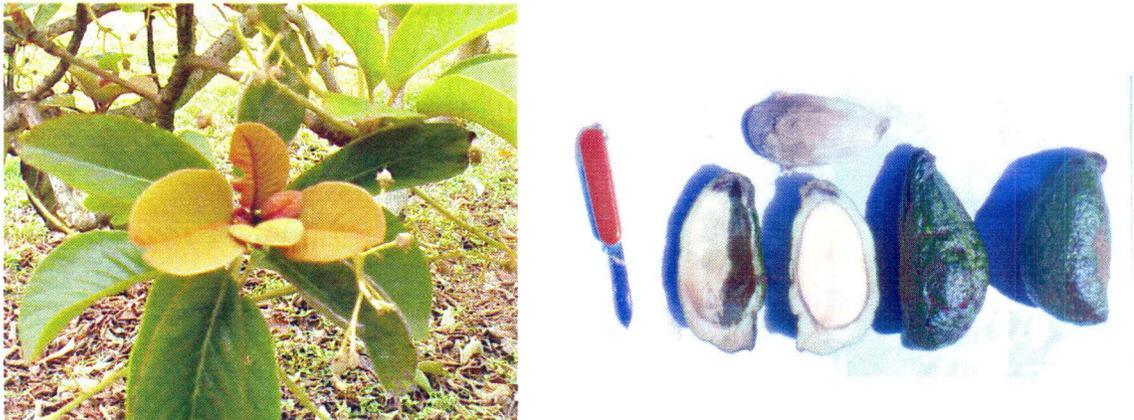


Figura 2.3 Hojas y frutos de *Persea schiedeana*

2.3.4. *Persea cinerascens*

En la región de Tacámbaro, Michoacán, se le conoce con el nombre de canelillo, se han encontrado ejemplares de hasta 20 m de altura, pero su tamaño normal es de 6 a 8 m, tiene un olor característico a canela en la madera

y en las hojas al ser frotadas. El pedúnculo de la infrutescencia es de 7 a 10 cm de longitud, con 20 y en algunos casos hasta 30 frutos. Los segmentos del perianto son persistentes a la madurez, y fácilmente observables; los frutos son baciformes, ligeramente elípticos: 0.9 x 1.2 cm de mesocarpio carnoso y ligero sabor a aguacate, el epicarpio es de color violeta en la madurez y el embrión es muy pequeño (Figura 2.4). Es incompatible con los cultivares Fuerte y Hass (García, 1970).

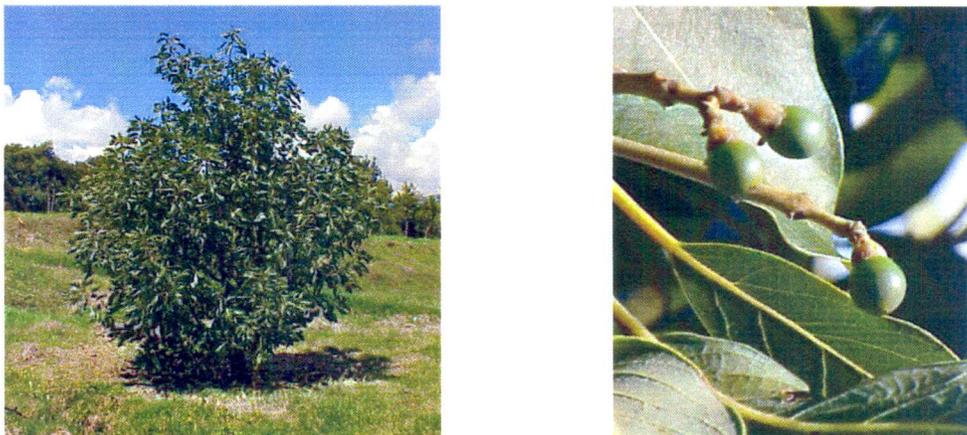


Figura 2.4 Árbol, hojas y frutos de *Persea cinerascens*

2.3.5. *Beilshmedia* sp.

El género *Beilshmedia* es representado en México por *B. americana*, *B. anay*, *B. mexicana*, *B. ovalis*, *B. pendula*, *B. schiedeana*, *B. steyermakii*. El fruto de *Beilshmedia anay* es oblongo, de color verde y negro, la epidermis del tipo verde es relativamente gruesa (0.4 mm) y el negro es de cáscara delgada, lo

que impide su separación de la pulpa, ambos producen frutos de similar tamaño, de piel brillante y atractivo (Borys *et al.*, 1993) (Figuras 2.5 y 2.6).



Figura 2.5 Árbol y frutos de *Beilschmiedia anay*



Figura 2.6 Hojas y flores de *Beilschmiedia mierssi*

2.4. Razas de aguacate

Se reconocen tres razas de aguacate; Mexicana (Figura 2.7), Guatemalteca (Figura 2.8) y Antillana (Figura 2.9). La clasificación botánica de estas tres razas ha sido variada, algunos indican a la raza Mexicana como una especie

por separado; *Persea drymifolia*, otros clasifican a la raza Guatemalteca como *Persea nubigena* var. *guatemalensis*; sin embargo, actualmente se considera a las tres razas dentro de la especie *Persea americana* Mill (Barrientos y López, 2000).

En 1987 (Bergh y Ellstrand, 1987) clasificaron 3 razas de aguacate y llamaron a la raza Mexicana como la variedad botánica *drymifolia* (*Persea americana* var. *drymifolia*), y a la raza Guatemalteca la denominaron var. *guatemalensis* (*Persea americana* var. *guatemalensis*); a la tercera raza, a la Antillana le llamaron variedad americana (*Persea americana* var. *americana*).

Otros autores encontraron después que las tres razas se separan genéticamente analizando el DNA genómico de éstas (Bergh, 1992; Buffler y Fiedler, 1996).

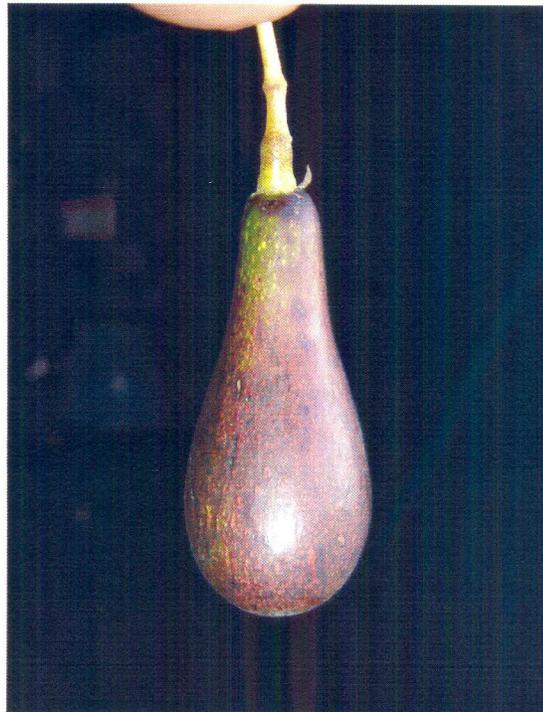


Figura 2.7 Fruto de raza mexicana *P. americana* var. *drymifolia*

2.4.1. Ecología de las razas de aguacate

La raza Mexicana tiene como principal ventaja la resistencia a frío, así como su alto contenido de aceite, olor a anís de sus hojas en casi todos los individuos (Barrientos y López, 2000).

La raza Guatemalteca presenta una cáscara bastante gruesa si se compara con las otras tres razas, lo que le permite resistencia del fruto al transporte, sin embargo, como está formada por tejidos esclerificados son bastante duros y no permite saber con el tacto si los frutos ya están en madurez de consumo. Otra

característica favorable es el tamaño pequeño y forma redonda de la semilla en varios individuos de esta raza (Barrientos y López, 2000).

La raza Antillana se adapta a clima tropical y como portainjerto es más tolerante a la salinidad, también tiene un lapso de flor a fruto bastante corto, entre otras características (Barrientos y López, 2000).

Barrientos y López (2000), indicaron que la raza Costarricensis se adapta a condiciones subtropicales de Costa Rica y al parecer la semilla es redonda como la raza Guatemalteca, la cáscara como la raza Antillana y las hojas son medianas a pequeñas similares a las de la raza Mexicana pero sin olor a anís.

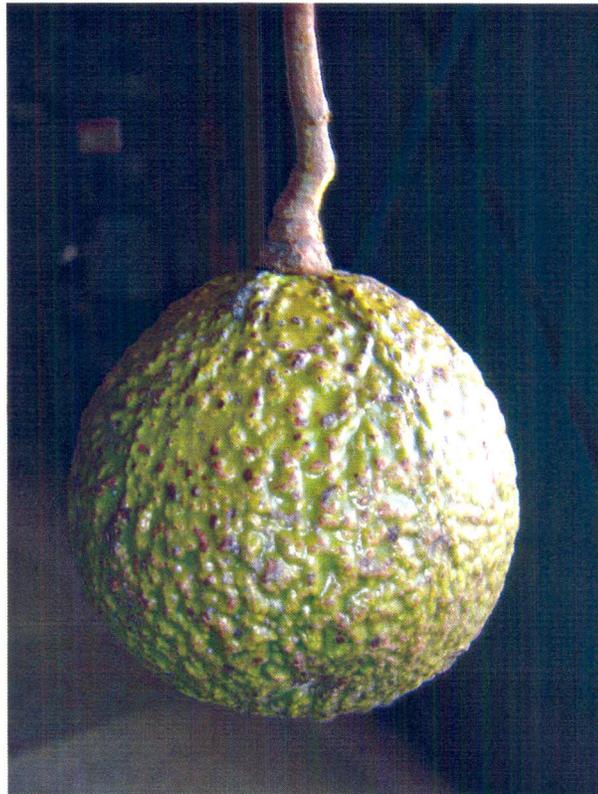


Figura 2.8 Fruto de raza guatemalteca *P. americana* var. *guatemalensis*

2.4.2. Condiciones climáticas para la raza Mexicana

Tiene un clima subtropical o templado-cálido. El invierno es benigno con raras heladas. Los meses de invierno a primavera son sin lluvias y con lluvias regulares de verano a otoño. Su precipitación pluviométrica debe de ser de un mínimo de 800 a 1200 mm. Los vientos no presentan corrientes violentas ya que pueden ocasionar defoliación, caída de flor y fruto causando también desgajamientos si estos son muy fuertes. La latitud va entre los 35° ó 36° norte o sur y de una altitud que comprenda entre los 1000 m a 1800 m de altura sobre el nivel del mar. El clima y temperatura media anual es: semi-cálido o subtropical de 18 a 22 °C, templado-cálido de 15 a 18 °C. La temperatura media en invierno no debe descender mas de – 4 °C pues la fruta empieza a sufrir daños orgánicos. Para el aguacate mexicano es necesario un ambiente atmosférico semi-seco lo cual lo obliga a seleccionar áreas geográficas cuyo régimen pluvial este bien definido, lluvias en verano a otoño y sequía relativa en invierno y primavera (Rodríguez-Suppo, 1982).

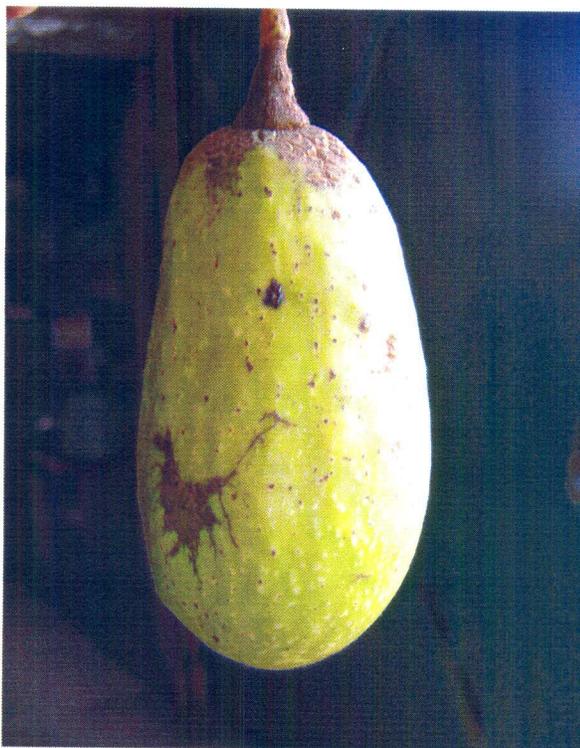


Figura 2.9 Fruto de raza antillana *P. americana* var. *americana*.

2.4.3. Condiciones climáticas para la raza Guatemalteca.

Su clima es tropical o subtropical, sin grandes variaciones de una estación a otra con una precipitación pluvial de 1200 mm a 1800 mm. Como mínimo, los vientos son libres pero no violentos. La latitud esta situada entre los 32° o 34° de latitud Norte o Sur y la altitud en áreas ubicadas entre los 500 y 1100 msnm donde las zonas con granizo regular no son frecuentes. El clima y la temperatura media anual son: subtropical o semi-cálido de 18 a 22 °C, tropical o cálido de 22 °C en adelante. Esta especie exige un clima regular en todas las estaciones, donde no se produzcan variaciones importantes del paso de una estación a otra en cuanto a temperatura y donde la media invernal sea de 15 °C

y la nocturna no descienda a menos de 1 °C ya que se manifiestan daños al descender las temperaturas a -2.3 °C. Este grupo ecológico tiene un régimen de lluvia continuo de humedad sin que haya periodos prolongados de sequía (Rodríguez-Suppo, 1982).

2.4.4. Condiciones climáticas para la raza Antillana.

Su clima es tropical, sin variación en el paso de las estaciones, su precipitación pluvial va de 1800 a 2000 mm anuales como mínimo. Su latitud está dentro de los 32 °C de latitud norte o sur. La altitud esta entre los 0 y 500 m, las variedades comprendidas dentro del grupo ecológico antillano exigen temperatura media anual superior a los 22 °C. Por la cercanía al ecuador terrestre en las zonas con este clima, el invierno es inexistente y la temperatura media en el año generalmente no desciende de los 16 °C (Rodríguez-Suppo, 1982).

2.5. Cronología de estudios taxonómicos en aguacate

La primer investigadora que realizó una agrupación taxonómica completa para *Persea* fue Lucille E. Kopp (1966), estableciendo la primera clave para la identificación de los miembros que la comprenden, estableció que el aguacate pertenece al género *Persea*, el cual a su vez se divide en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodhapne*. Indicó que la principal forma de distinción entre estos es

mediante la pubescencia de la cara interior de los sépalos; *Persea* tiene ambas caras pubescentes y *Eriodhapne* tiene la cara interna sin pubescencia, con la excepción de *Persea pallida*, *Persea rigens* y *Persea cinerascens* (Barrientos *et al.*, 2007). El aguacate cuya especie es *Persea americana* Mill. pertenece al subgénero *Persea*, que se conoce como el de los verdaderos aguacates y que son de un tamaño mayor que los del otro subgénero; además del aguacate, se encuentran en este grupo: *Persea nubigena* (aguacate de monte), *Persea steyermarkii* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (chinini, chinene, chenene, yas, hib), *Persea floccosa* (aguacate cimarrón) (Barrientos *et al.*, 2007).

La segunda clave de identificación taxonómica para el subgénero fue la establecida por Louis O. Williams (1977), y hasta la fecha luego de estas dos claves de identificación no ha sido realizada una revisión completa de este subgénero, con excepción de recientes aportaciones para su reagrupación (van der Werff, 2002; Chanderbali *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2007).

La primera clave no incluyó a algunas especies de clasificación reciente, ni consideró a *Persea americana* var. *guatemalensis* (raza guatemalteca) y *Persea nubigena*, ya que a estas las clasificó dentro de *Persea americana* var. *nubigena* (Barrientos *et al.*, 2007)

Por otra parte la clave de Williams del año 1977 no consideró tampoco a las nuevas especies, incluyó a la raza Guatemalteca dentro de *Persea nubigena* y

a *Persea primatogena* que había sido excluida del género *Persea* y que actualmente se clasificó dentro del género *Beilschmiedia*. Dicha clave se basa en gran medida en los frutos de cada especie (Barrientos *et al.*, 2007). En este subgénero además se incluyó a *Persea parvifolia* (aguacatillo de Veracruz, México) y a *Persea primatogena* (guaslipe de Nicaragua), este último reclasificado como de otro género diferente al del aguacate llamado *Beischmiedia*. Schieber y Zentmyer en el año de 1987 habían propuesto la incorporación de *Persea tolimanensis* (aguacate de mico) y *Persea zentmyerii* de Guatemala a este subgénero. Realizando una reciente exploración el Dr. Alejandro F. Barrientos encontró en la región de Motozintla, Chiapas, lo que podría tratarse de una nueva especie más cercana a la raza Guatemalteca que *Persea nubigena* y *Persea steyermarkii*, además de otros tipos como los de la región de Monte Verde, Costa Rica, que al parecer son del subgénero *Persea* según Ben-Ya'acov y otros autores en 1995. Todas estas especies se encuentran localizadas en Mesoamérica, principalmente en México y Guatemala (Barrientos *et al.*, 2007).

Ashworth and Clegg (2003) documentaron inicialmente el uso de un amplio número de marcadores de microsatélites para tratar de discernir la genealogía entre 35 cultivares y portainjertos de *P. americana* y dos parientes silvestres asumiendo que los microsatélites son marcadores genéticos mas versátiles que combinan útilmente la alta variabilidad, la herencia codominante y dan una buena reproducibilidad, su codominancia los hace apropiados en descifrar el dilema de la paternidad por el confuso

desplazamiento del polen, además de ser abundantes y estar muy distribuidos a lo largo de todo el genoma.

Davis *et al.* (1998) inicialmente estudiaron mediante RFLP las relaciones genealógicas de 36 aguacates cultivados con el objetivo de discernir el parentesco y relaciones genéticas, visto esto como una posibilidad de obtener información útil para diseñar una estrategia de mejoramiento genético en aguacate, así como una mejor y efectiva forma de conservación de germoplasma. En este estudio se lograron separar tres conglomerados correspondientes a tres razas; Mexicanos, Antillanos y Guatemaltecos, así como a un grupo interesante de híbridos como; 'Hass', 'Gween' y 'Fuerte'.

Se conocen tres razas de aguacate; Mexicana, Guatemalteca y Antillana. La clasificación botánica de esas razas ha sido diversa y se les considera dentro de *Persea americana* Mill. Se ha realizado una clasificación muy acertada de las razas de aguacate, agrupando a la raza Mexicana como la variedad botánica *drymifolia* (*Persea americana* var. *drymifolia*), la raza Guatemalteca como var. *guatemalensis* (*Persea americana* var. *guatemalensis*) y la raza Antillana como variedad americana (*Persea americana* var. *americana*). También se ha encontrado que las razas; Mexicana, Antillana y Guatemalteca son genéticamente diferentes al emplear análisis de marcadores genéticos de DNA mediante la técnica de RAPD (amplificación al azar de DNA genómico) encontrando una adecuada separación y confirmando distante a la especie *P. shiedeana* (Fiedler *et al.*, 1998; Buffer y Fiedler, 1996).

2.6. Controversias taxonómicas recientes en aguacate

Debido a que la clasificación actual del aguacate presenta controversias de ubicación para muchos casos, la presente tesis sin consistir en un análisis de taxonomía pretende orientar la ubicación de las accesiones en agrupamientos que incluye como referencia a 11 especies del género *Persea*, y trata de ponderar el grado de similitud o parentesco entre ellos. van der Werff (2002) identificó a las nuevas especies; *P. albiramea* van der Werff, *P. brevipetiolata* van der Werff y *P. laevifolia* van der Werff e indica que la variabilidad genética en aguacate se debe a los procesos de selección y cultivo que el hombre le ha hecho a través de los años y difiere con la clasificación de Kopp (1966), quien reconoció a dos subgéneros dentro del género *Persea*; subgénero *Persea* y *Eriodaphne*. Sin embargo, algunas dificultades en la clasificación de las variedades de aguacate son junto con la influencia del hombre el hecho de que su progenie es extremadamente variable (Gama-Campillo, 1994), esta autora realizó un estudio relacionado con iconografía, etnobotánica, lingüística y acontecimientos históricos de las especies expuestas a las relaciones planta-humano y realizó un estudio sistemático que intentó ayudar a proponer una reclasificación taxonómica. Campos *et al.* (2007) mediante estudios heurísticos y de parsimonia (consistentes en la búsqueda de adecuaciones mas apropiadas a las teorías que reclasifican actualmente al género *Persea*) y basándose en caracteres morfológicos, proponen algunos ajustes de reclasificación al género sugiriendo que no es un grupo monofilético y que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* deberían reconsiderarse como géneros independientes.

Gama-Campillo (1994), en su estudio sugiere también que el aguacate había sido usado por las poblaciones indígenas durante tiempos considerables antes de la llegada de los descubridores europeos. Smith (1966) ubicó aproximadamente entre 7000 – 8000 a.c. la evidencia más antigua del consumo de aguacate por parte de los pobladores en cuevas localizadas en la parte central de México, a la par en los valles de Oaxaca hay evidencias de su consumo y posible selección hacia los años 4000 a 2800 a.c. A mediados del siglo XVI el aguacate ya era cultivado por pobladores de México y del Perú en los tiempos de la conquista por los españoles (Popenoe, 1963; Storey *et al.* 1986).

Hoy en día resulta poco claro el origen de muchos genotipos, como cuales o cuantas especies silvestres y/o cultígenos (plantas desarrolladas en cultivo o domesticación) fueron los progenitores de las razas o variedades actuales. Storey *et al.*, (1986) y Williams (1977), sugieren que las condiciones topográficas, las barreras climáticas y lo voluminoso del tamaño de semilla, limitaron la mezcla de razas que se mantenían hasta antes de que se descubriera el océano pacífico por el año 1513, hoy en día las razas se translapan en muchas regiones de América, y numerosas colectas hacen constatar ésto haciendo evidente una actual introgresión racial (Ashworth y Clegg, 2003). El hábito de floración y polinización cruzada del aguacate es otro factor que dificulta conocer el pedigree de los cultivares y razas actuales, aunado con su forma prolífica y poco amarre de fruto, dejando un difícil legado

a los estudios taxonómicos con una confusión de genotipos con afinidades inciertas y poco comprobables y una amplia difusión de razas y genotipos.

2.7. Caracterización morfológica en aguacate

Existe un trabajo previo sobre caracterización morfológica de aguacate en el banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S.C., que estudió en parte a las mismas accesiones que posteriormente se analizaron mediante marcadores moleculares en el presente estudio, debido a esto será citado a continuación parte de dicho trabajo llevado a cabo por (Cabrera Hernández, 2005).

Los objetivos de dicha caracterización morfológica fueron los siguientes:

- Caracterizar morfológicamente a las colectas del banco de germoplasma.
- Relacionar las características morfológicas de dichos materiales para encontrar la similitud entre ellos.
- Realizar por medio de un análisis estadístico por componentes principales la relación entre características vegetativas, flor y fruto de las colectas.
- Describir las características vegetativas, flor, fruto y semilla de las colectas del banco de germoplasma.

Cabrera Hernández (2005) realizó el trabajo de caracterización en el municipio de Coatepec Harinas, México ubicado en los 18°46'38" de latitud norte y

99°46'38" de longitud oeste a una altitud de 2140 m. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano temperaturas media anual de 16.1 °C y precipitación pluvial de 1135 mm.

El material vegetal utilizado fueron genotipos de aguacate (*Persea spp*) los cuales pertenecen a las tres razas de aguacate y otras especies descritas (Cuadro 2.1), además de una especie afín. Estos genotipos han sido colectados a lo largo de 25 años en estados del sur y centro de México, así como Centro y Sudamérica (López *et al.*, 1997), las colectas caracterizadas se muestran en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Colectas del banco de germoplasma consideradas en el estudio de caracterización morfológica por Cabrera Hernández (2005).

NOMBRE DEL GENOTIPO	NÚM. DE ÁRBOL	ORIGEN DE LA MUESTRA	RAZA O PARENTESCO	INJERTO/SEMILLA /CLON
Almoloya clon	28	México	Mexicana	Clon
Lonjas	36	México	Mexicana	Injerto
Mantequilla	37	México	Mexicana	Semilla
Telez 1	38	México	Mexicana	Injerto
Pinte5/39	39	México	Mexicana	Injerto
Guay 1	41	Ecuador	Mexicana	Injerto
1sP.Timbinal	44	México	Mexicana	Clon
Tepetl	46	México	Mexicana	Clon
SnCrMr4s2	61	México	Mexicana	Injerto
Vargas	65	México	Mexicana	Injerto
Guadalupe 1 clon	85	México	Mexicana	Clon
Pinte 2	86	México	Mexicana	Semilla
24PTB	87	México	Mexicana	Injerto
Príncipe negro	88	México	Mexicana	Injerto
Parque timbinal	91	México	Mexicana	Semilla
S. aguacate negro	96	México	Mexicana	Clon
Hacienda vieja	107	México	Mexicana	Injerto
Tacámbaro	115	México	Mexicana	Injerto

Aguila s1	119	México	Mexicana	Semilla
Hacienda Guadalupe	128	México	Mexicana	Clon
Temascaltepec	132	México	Mexicana	Injerto
Ixtapan del Oro	138	México	Mexicana	Injerto
Tlacolula 3s1	139	México	Mexicana	Injerto
257 PTB	141	México	Mexicana	Clon
Temascaltepec 1s3	147	México	Mexicana	Injerto
Aquijic s2	165	México	Mexicana	Injerto
Feliciano	174	México	Mexicana	Injerto
Aquijic	178	México	Mexicana	Injerto
Almoleya	183	México	Mexicana	Injerto
Pahua negro	184	México	Mexicana	Semilla
Mantequilla	191	México	Mexicana	Injerto
El Mirador	207	México	Mexicana	Clon
Tochimilco 1	208	México	Mexicana	Injerto
Tochimilco 4	211	México	Mexicana	Injerto
Amatenango	228	México	Mexicana	Injerto
Temascaltepec1s2	240	México	Mexicana	Injerto
Malinalco s2	243	México	Mexicana	Injerto
Mexicano	247	México	Mexicana	Semilla
Segregante de aguacate azul	279	México	Mexicana	Semilla
Olanca 2clon	25	México	Guatemalteca	Clon
Olanca 1 clon	30	México	Guatemalteca	Clon
Palestre	34	Guatemala	Guatemalteca	Semilla
Nocham 3	35	Guatemala	Guatemalteca	Semilla
Comcar1	33	México	Guatemalteca	Injerto
Comcar 1	47	México	Guatemalteca	Injerto
Sn marcos	49	Guatemala	Guatemalteca	Semilla
Larrainzar 1	54	México	Guatemalteca	Injerto
Miramundo	55	Guatemala	Guatemalteca	Semilla
Teni	56	Guatemala	Guatemalteca	Semilla
SnCrMr7-s-1	60	México	Guatemalteca	Injerto
SnCrMr7s2	63	México	Guatemalteca	Injerto
Olanca2s3	89	México	Guatemalteca	Injerto
Amatenango S1	94	México	Guatemalteca	Injerto
Olanca 2-s-3	114	México	Guatemalteca	Injerto
Olanca s1	116	México	Guatemalteca	Injerto
SnCrMr1s3	193	México	Guatemalteca	Injerto
151PLC Tetiz	77	México	Antillano	Injerto
Marichal	102	Costa Rica	Antillano	Semilla
Las nubes 6	104	Costa Rica	Antillano	Semilla

230 PTB	51	México	Híbrido	Injerto
Day	53	Israel	Híbrido	Injerto
Portainjerto antillano	176	México	Híbrido	Semilla
La Mesa	185	México	Híbrido	Semilla
Negra la cruz	221	Chile	Híbrido	Injerto
Fuerte negro	223	Chile	Híbrido	Injerto
Hass JB	264	México	Híbrido	Injerto
253 PTB	272	México	Híbrido	Injerto
257 PTB	273	México	Híbrido	Injerto
264 PTB	274	México	Híbrido	Injerto
Hass Cupanguaro	277	México	Híbrido	Injerto
Hass Tacámbaro	283	México	Híbrido	Injerto
<i>P. indica</i>	1	USA (España)	<i>P. indica</i>	Semilla
<i>P. cinerascens</i>	2	México	<i>P. cinerascens</i>	Semilla
<i>P. gigantea</i>	3	Guatemala	<i>P. gigantea</i>	Injerto
<i>P. nubigena</i> 1/8	6	Guatemala	<i>P. nubigena</i> 1/8	Injerto
<i>P. nubigena</i> 1/7	12	Israel	<i>P. nubigena</i> 1/7	Injerto
<i>P. nubigena</i>	66	México	<i>P. nubigena</i>	Injerto
162 PLC rodeo 1	70	México	<i>P. nubigena</i>	Injerto
<i>P. floccosa</i>	10	Israel (México)	<i>P. floccosa</i>	Injerto
<i>P. steyermarkii</i>	232	México	<i>P. steyermarkii</i>	Injerto
Otrabanda	17	Guatemala	<i>P. shiedeana</i>	Semilla
Yaruche 3	227	Honduras	<i>P. shiedeana</i>	Injerto
<i>Beilschmiedia anay</i>	22	México	<i>Beilschmiedia anay</i>	Semilla

Algunos caracteres consideradas en el proceso de caracterización en el estudio de Cabrera Hernández (2005), así como su escala de medición, y que resultaron discriminantes para los agrupamientos se muestran en los Cuadros 2.2, 2.3 y 2.4 de acuerdo a los descriptores para aguacate de IPGRI (Barrientos *et al.*, 1991).

Cuadro 2.2 Caracteres Vegetativos considerados por Cabrera-Hernández (2005).

Pubescencia en el haz de la hoja	Desde 3= ligera, 5= moderada, 7= abundante.
Pubescencia del envés de la hoja.	Desde 3= ligera, 5= moderada, 7= abundante
Olor a anís.	Desde 1= ninguno 2= débil 3= medio 4= intenso
Longitud del pecíolo de hojas maduras.	Promedio de 10 hojas seleccionadas al azar
Forma de la hoja.	10 observaciones de hojas maduras. Donde 3= obovado, 4= oval, 5= circular, 6= cordiforme, 7= lanceolado, 8= oblongo, 9= oblongo- lanceolado 10= otra
Extensión de crecimiento de vástagos	Medida después del flujo mayor de crecimiento y pasada la cosecha. Media de 10 vástagos seleccionados al azar.
Diámetro de vástagos	Tomados en cm. con 10 repeticiones seleccionadas al azar.
Color de hojas jóvenes	1= verde claro 2= verde 3= café claro 4= café 5= rojo claro 6=rojo 7= otro.

Cuadro 2.3 Caracteres de flor considerados por Cabrera-Hernández (2005).

Color de flor	Observación única: 1= crema, 2= verde, 3= amarillo, 4= café, 5= rojizo.
Longitud de sépalo	Media de 5 a 10 repeticiones (mm)
Longitud de ramificaciones de la inflorescencia	Tomados en la media de 5 a 10 repeticiones en cada individuo de ramificaciones (cm).
Longitud de eje principal de la inflorescencia.	La media de 5 a 10 repeticiones en cada individuo (cm).
Longitud de pedicelo.	La media (cm) de 5 a 10 repeticiones por cada individuo
Longitud de pétalo.	La media de 5 a 10 repeticiones en cada individuo (cm)
Número de ramificaciones por inflorescencia.	De 5 a 10 repeticiones por individuo
Número de flores por inflorescencia.	De 5 a 10 repeticiones por individuo.
Ancho de pétalo.	Tomado en cm de 5 a 10 repeticiones por individuo.
Ancho de sépalo.	Medido en mm y realizando de 5 a 10 repeticiones por individuo

Cuadro 2.4 Caracteres de fruto considerados por Cabrera-Hernández (2005).

Color de cáscara del fruto.	Medido en una rango de colores donde: 1= verde claro 2= verde 3= verde oscuro 4= amarillo 5= rojo 6= púrpura 7= negro 8= mezclado.
Brillantez de la cáscara del fruto.	3= débil 4= mediana y fuerte
Fibra en la pulpa de fruto.	Tomada de fruta en madurez de consumo con una escala de valores del 1 al 4 donde: 1= ninguna 2= poca 3= media 4= bastante
Grosor de la cáscara.	Medida en mm con un vernier haciendo 5 repeticiones de fruto por árbol.
Sabor a nogado de la pulpa.	Tomado de fruta en madurez de consumo Con una escala de del 1 al 4 donde 1= ninguno 2= bajo 3= intermedio 4= alto.
Textura de la pulpa.	Tomado de fruta en madurez de consumo. En una escala del 1 al 5 donde: 1= acuoso. 2= cremoso 3= pastoso 4= granular 5= otro.
Adherencia de la cáscara a la pulpa.	Tomado de frutos en madurez de consumo con una escala del 3 al 7 donde 3= ligera 5= intermedia 7= fuerte
Flexibilidad de la cáscara.	Tomado en frutas en madurez de consumo en una escala de valores del 3 al 7 donde 3= flexible y 7= quebradiza
Textura de la cáscara.	Tomado de fruta en madurez de consumo en una escala de valores del 1 al 3 donde: 1= membranosa 2= correa 3= corchosa
Longitud del pedúnculo.	Incluyendo al pedicelo medida en c m con una regla.
Forma del fruto.	Medido con valores del 1al 10 donde: 1= oblata 2= esferoide 3= esferoide alto 4= elipsoide 5= obovoide 6= obovado 7= periforme 8= oblongo 9= romboidal 10= otro.
Longitud del fruto.	Medido en cm haciendo 5 repeticiones de fruto por árbol.
Peso de fruto.	Medido en gr haciendo repeticiones de 5 frutos por árbol.
Diámetro del fruto.	Medido en cm haciendo 5 repeticiones de frutos por árbol.

2.7.1. Procedimiento utilizado en la caracterización de un banco de germoplasma de aguacate (Cabrera-Hernández, 2005)

La información colectada en el estudio se realizó mediante la ayuda de fichas pomológicas que fueron tomadas de los Descriptores para Aguacate (Barrientos *et al.*, 1991) para caracteres vegetativos, de fruto y de flor (Cuadro 2.5). Asimismo los descriptores gráficos se muestran en la Figura 2.10.

Después de terminada la toma de los datos se capturó la información en una base datos; posteriormente se realizó una estandarización de los mismos y se procesaron en el programa The SAS System for WINDOWS release 6.12, para el análisis por componentes principales.

Cuadro 2.5 Ficha pomológica utilizada para la colecta de información de campo en la caracterización de un banco de Germoplasma de Aguacate (Cabrera-Hernández, 2005).

VEGETATIVO

1. Número de árbol:
2. Edad del árbol:
3. Forma del árbol:
4. Hábito del árbol:
5. Altura del árbol:
6. Densidad de la copa:
7. Tipo de árbol:
8. Vigor del árbol:
9. Diámetro de la copa N-S, E-O:
10. Distribución de ramas:
11. Altura de ramas principales:
12. Angulo de inserción de las ramas principales:
13. Extensión del crecimiento de los vástagos:
14. Longitud de entrenudos de los vástagos:
15. Diámetro de vástagos:
16. Color de vástagos juveniles:
17. Lenticelas de vástagos jóvenes:
18. Color de lenticelas de vástagos jóvenes:
19. Patrón de ramificación:
20. Superficie de vástagos jóvenes:
21. Color de ápice del vástago:
22. Superficie del ápice del vástago:
23. Superficie del tronco:
24. Diámetro del tronco

HOJA

1. Forma de la hoja:
-

-
2. Olor a anís:
 3. Color de hojas maduras:
 4. Color de hojas jóvenes:
 5. Pecíolo acanalado:
 6. Longitud del pecíolo de hojas maduras:
 7. Color de la pubescencia del pecíolo:
 8. Angulo de inserción del pecíolo foliar:
 9. Margen de la hoja:
 10. Área foliar:
 11. Distinción de la venación en la superficie del haz:
 12. Relieve de la venación en la superficie del haz:
 13. Angulo de las venas secundarias respecto a la vena principal:
 14. Pubescencia de la vena principal:
 15. Torcedura del ápice de la hoja:
 16. Angulo del ápice de la hoja:
 17. Forma de la base de la hoja:
 18. Friabilidad de la hoja:
 19. Pubescencia en la superficie del envés de la hoja:
 20. Pubescencia en la superficie del haz de la hoja:
 21. Sección transversal de la hoja

FLOR

1. Época de floración:
2. Tipo de flor:
3. Años de floración después de la plantación:
4. Floración secundaria:
5. Duración de la floración:
6. Abundancia de la floración:
7. Posición de la inflorescencia:
8. Número de flores por inflorescencia:
9. Color de las lenticelas de las inflorescencias:
10. Longitud de eje principal de las inflorescencias:
11. Número de ramificaciones de la inflorescencia:
12. Longitud de la ramificación:
13. Longitud del pedicelo:
14. Longitud del pétalo:
15. Anchura del pétalo:
16. Pubescencia del pétalo:
17. Densidad de la pubescencia del pétalo:
18. Longitud del sépalo:
19. Anchura del sépalo:
20. Pubescencia del sépalo:
21. Densidad de la pubescencia del sépalo:
22. Estilo de la flor:
23. Polen:
24. Base de nectario:
25. Color de la flor:

FRUTO

1. Época de fructificación:
 2. Forma del fruto:
 3. Ciclo de desarrollo del fruto:
 4. Fechas de la temporada de la fructificación:
 5. Tiempo que se retiene el fruto en el árbol después de alcanzar madurez:
 6. Rendimiento por árbol:
 7. Comportamiento del rendimiento:
 8. Productividad:
 9. Uniformidad de tamaño del fruto:
 10. Longitud del fruto:
 11. Diámetro del fruto:
 12. Peso del fruto:
 13. Forma de la base del fruto:
 14. Forma del ápice del fruto:
 15. Ápice del fruto:
 16. Aristas en el fruto:
 17. Número de aristas en el fruto:
 18. Tamaño de lenticelas en el fruto:
 19. Densidad de lenticelas en el fruto:
 20. Color de lenticelas:
-

-
21. Lenticelas corchozas:
 22. Color de la cáscara del fruto:
 23. Brillantez de la cáscara del fruto:
 24. Distinción de la unión del pedicelo con el pedúnculo:
 25. Forma del pedicelo:
 26. Pedicelo con forma de cabeza de clavo:
 27. Posición del pedicelo en el fruto:
 28. Persistencia del perianto:
 29. Longitud del pedúnculo:
 30. Diámetro del pedúnculo:
 31. Longitud del pedicelo:
 32. Diámetro de la base del pedicelo:
 33. Diámetro del ápice del pedicelo:
 34. Color del pedicelo:
 35. Superficie del pedicelo:
 36. Facilidad de cosecha manual:
 37. Grosor de la cáscara:
 38. Flexibilidad de la cáscara:
 39. Textura de la cáscara:
 40. Adherencia de la cáscara a la pulpa:
 41. Color de la pulpa cercana a la cáscara:
 42. Color de la pulpa cercana a la semilla:
 43. Textura de la pulpa:
 44. Sabor dulce de la pulpa:
 45. Sabor amargo de la pulpa:
 46. Sabor nogado de la pulpa:
 47. Sabor a anís de la pulpa:
 48. Sabor general del fruto:
 49. Aroma a anís de la pulpa:
 50. Fibra en la pulpa:
 51. Obscurecimiento de la fruta abierta después de cuatro horas:
 52. Porcentaje de aceite de la pulpa:
 53. Composición del aceite:
 54. Días de almacenamiento de la fruta:
 55. Vida de anaquel de la fruta:

SEMILLA

1. Longitud de la cavidad de la semilla:
2. Diámetro de la cavidad de la semilla:
3. Longitud de la semilla:
4. Diámetro de la semilla:
5. Cubierta de la semilla:
6. Espacio libre de la cavidad de la semilla:
7. Forma de la semilla:
8. Porcentaje de la semilla relativa al fruto:
9. Superficie del cotiledón:
10. Adherencia de los cotiledones:
11. Color del cotiledón:
12. Germinación de la semilla en fruta madura:
13. Forma de la sección transversal de la semilla:

SUSCEPTIBILIDAD A ESTRÉS

1. Agua y suelo salino:
2. Plaga araña roja:
3. Trips:
4. Agalla de la hoja:
5. Barrenador de semillas:
6. Barrenador de ramas:
7. Hongo tristeza:
8. Roña del fruto:
9. Antracnosis:
10. Cáncer del tronco:
11. Marchitez:
12. Otro:

Donde: 1= Extremadamente baja susceptibilidad

2= Baja susceptibilidad

3= Mediana susceptibilidad

4= Alta susceptibilidad

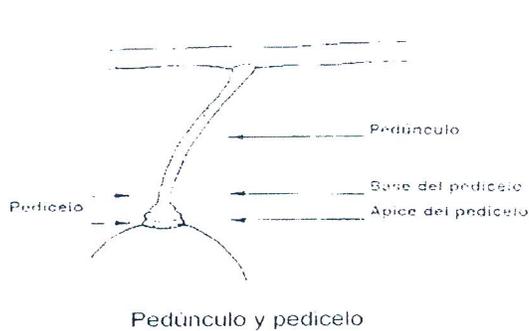
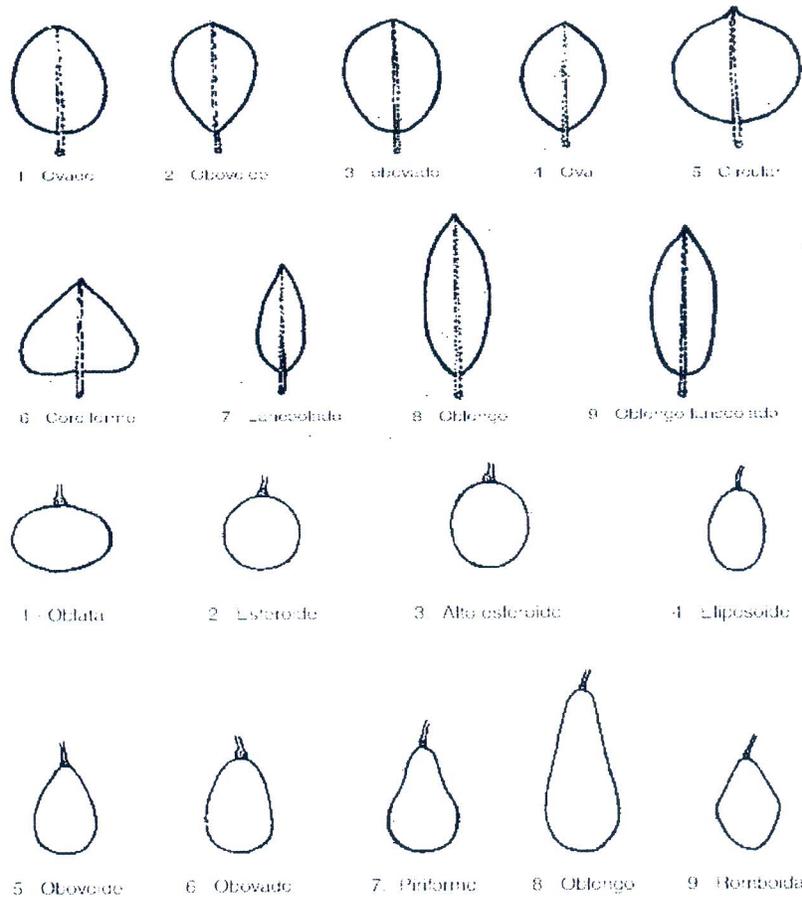


Figura 2.10 Formas de hojas, frutos, pedúnculo, pedicelo y extensión de vástagos en aguacate (Barrientos *et al.*, 1991), utilizados en la descripción morfológica del estudio realizado por Cabrera-Hernández (2005).

2.7.2. Conclusiones del análisis morfológico realizado por Cabrera-Hernández (2005)

Con las variables de flor, vegetativas, de fruto y de semilla, se pudo diferenciar a las razas según sus características morfológicas con cierta precisión. Se permitió la agrupación de colectas que no pertenecen a dichas razas, pero que se relacionan dentro de los grupos de Antillanos, Guatemaltecos o Mexicanos según su caso por ser híbridos. En algunos casos existieron genotipos separados completamente de alguna agrupación, estos casos raros se han podido asociar con antecesores de dichas razas o con géneros afines (Figura 2.11) (Cabrera-Hernández, 2005).

La caracterización morfológica presenta desventajas atribuibles principalmente a efectos del ambiente, sin embargo ha resultado de utilidad por su relativa facilidad y economía en los procesos de toma de datos y análisis de la información, y en algunos casos resulta bastante confiable (Cabrera-Hernández, 2005).

Adicional a la caracterización morfológica el complemento debe ser la caracterización molecular de las accesiones, de tal manera que con la información lograda por ambos tipos de caracterización; morfológica y molecular, se pueda elaborar una base de datos que pueda ser accesible de consultar por investigadores y fitomejoradores interesados en el cultivo. El catalogo de accesiones de un banco es un documento que podría conjuntar la

2.8. Cronología de estudios de marcadores moleculares de aguacate

En el género *Persea* han sido desarrollados un sinnúmero de trabajos encaminados a vislumbrar el camino del origen y distribución de las especies que lo integran, muchos trabajos se han centrado básicamente en caracterizar y describir especies nuevas (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6 Resumen cronológico sobre estudios utilizando marcadores moleculares y taxonómicos que han sido realizados por diferentes investigadores a través del tiempo.

Autores	Objetivo	Conclusiones
Bergh <i>et al.</i> 1973	Estudio de los componentes de aceites esenciales de 10 cultivares y 2 especies relacionadas mediante cromatografía de gases.	Se propuso que las razas mexicana, antillana y guatemalteca sean clasificadas como variedades botánicas bajo la designación de <i>Persea americana</i> , respectivamente.
Gama-Campillo (1994)	Realizó un estudio sistemático y etnobotánico del subgénero <i>Persea</i> .	Realizó un estudio relacionado con iconografía, etnobotánica, lingüística y acontecimientos históricos de las especies expuestas a las relaciones planta-humano y realizó un estudio sistemático con ejemplares de herbario que intentando a ayudar a proponer una reclasificación taxonómica.
Buffler y Fiedler (1992)	Abordaron las principales cuestiones metodológicas sobre la conservación de las hojas, aislamiento y purificación del DNA.	La técnica RAPD, es una herramienta útil en la colección y manejo del germoplasma de aguacate, usaron 3 métodos para secar hojas de aguacate y compararon la cantidad y calidad del DNA obtenido.
Buffler y Fiedler (1996)	Analizaron la variación genética de un banco de germoplasma de aguacate mediante NTS y RAPD.	Concluyeron que los marcadores RAPD son útiles para la clasificación del aguacate y para estudiar la diversidad genética de las colecciones en los bancos de germoplasma, pero concluyeron que para 'Hass' sin embargo son necesarios otros marcadores
Mhameed <i>et al.</i> (1997)	Utilizó marcadores VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) y análisis genéticos para medir las relaciones genéticas entre cultivares de <i>P. americana</i> y obtuvo un árbol filogenético de las especies de <i>Persea</i> .	El árbol filogenético obtenido muestra el alto valor de la variación entre cultivares de aguacate y especies del género <i>Persea</i> , se sugiere que la validez de raza y definición de especies entre <i>Persea</i> , debe ser tratado con precaución, ya que tanto el análisis genético como los VNTR presentaron un alto nivel de heterocigocidad como sugirió Mhameed en 1996 y Lavi en 1991, mostrándose una alta variación en la misma progenie así como entre especies y razas.
Sharon <i>et al.</i> (1997)	Presentó la generación de marcadores SSR específicos para aguacate, estos marcadores fueron integrados mediante marcadores de DNA: RAPD y SSR, para construir el primer mapa genético de aguacate	Los resultados se analizaron mediante varios programas de mapeo genético para establecer que programa era mejor para la progenie de los padres heterocigóticos. El análisis resultó en 12 grupos de unión con 34 marcadores (25 SSRs, 3 RAPDs y 6 bandas DFP) cubriendo 352.6 cm. El mapa puede servir para desarrollar un mapa genómico mas completo para identificación de la unión entre marcadores y loci de caracteres cuantitativos.
Sharon <i>et al.</i> (1998)	Detectaron los probables loci de características cuantitativas (SSR, RAPD, DNA).	Encontraron que seis características se asocian con al menos uno de los 90 marcadores.
Fiedler <i>et al.</i> (1998)	Estudiaron la relación genética de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill) usando marcadores RAPD	Se ha encontrado que las razas: Mexicana, Antillana y Guatemalteca son genéticamente diferentes al emplear análisis de marcadores genéticos de DNA mediante la técnica de RAPD (amplificación al azar de DNA genómico) encontrando una adecuada separación y

		confirmando distante a la especie <i>P. schiedeana</i>
Davis <i>et al.</i> (1998)	Fragmentos anónimos de DNA del genoma de aguacates cultivados (<i>Persea americana</i> Mill) se clonaron en un vector plásmido y se usaron para escanear un total de 36 cultivares.	Se encontró un alto nivel de polimorfismos, un análisis de los conglomerados de las similitudes genéticas reveló tres grupos raciales de aguacate cultivado, un cluster adicional refleja que los cultivares provienen de una hibridación racial.
Clegg <i>et al.</i> (1999)	Uso de marcadores moleculares en manejo y mejoramiento de aguacate	Mediante técnicas de marcadores moleculares con patrones RFLP separó adecuadamente las diferentes razas así como a híbridos entre ellas determinando su ascendencia.
Henk van der Werff (2002)	Realizó una nueva clasificación en base a caracteres morfológicos basados en muestras de herbario.	indica que la variabilidad genética en aguacate se debe a los procesos de selección y cultivo que el hombre le ha hecho a través de los años y difiere con la clasificación de Kopp (1966)
Shnell <i>et al.</i> (2003)	Determinó la variación genética en y entre razas hortícolas de aguacate (SSR).	Identificaron materiales, no determinaron marcadores útiles asociados a alelos únicos para separar entre razas. La agrupación hortícola de las razas es congruente con la agrupación generada por los marcadores.
Rodríguez-Medina <i>et al.</i> (2003)	Caracterizaron morfológica, bioquímica y de manera molecular cultivares de aguacatero (<i>Persea americana</i> Mill) en Cuba.	Realizaron un estudio morfológico, bioquímico y molecular del género <i>Persea</i> .
Tsu-Liang <i>et al.</i> (2003)	Analizaron la diversidad genética de accesiones de Aguacates en Taiwán	Construyeron dendogramas mediante UPGMA, analizaron 42 cultivares de aguacate basándose en índices de similitud, los cuales se correlacionaron bien con sus sitios de origen.
Ashworth y Clegg (2003)	Estudiaron 25 marcadores de microsatélites creados para aguacate los cuales sirvieron para diferenciar 35 cultivares y 2 especies silvestres usando Microsatélites (SSR) y QTL.	El estudio sugirió la existencia de hibridaciones ancestrales que sucedieron en <i>Persea</i> , hay una complejidad en el status de la hibridación (múltiple backcrossing), y que las razas botánicas se originaron mas recientemente que lo que se suponía.
Ashworth <i>et al.</i> (2003)	Trataron de desarrollar marcadores de microsatélites para facilitar el mejoramiento.	Ya que hay disponibles pocas secuencias de DNA de lauraceas en los bancos públicos de secuencias (GIS). Trataron de comparar la eficiencia de marcadores desarrollados a partir de una librería enriquecida con dinucleótidos y trinucleótidos. Se encontró que las modificaciones a la PCR y el rediseño de iniciadores, raramente condujo a mejoras significativas en la interpretabilidad de las bandas. Aunque de manera menos frecuente las repeticiones loci de trinucleótidos son mas fácil de interpretar que los de dinucleótidos.
Birnbaum <i>et al.</i> (2003)	Modelaron las fuerzas de la microevolución sobre las poblaciones de cultivo y establecieron una conservación del cultivo <i>in situ</i> en un sistema modelo.	Los resultados soportan la factibilidad de la conservación a nivel de granja (parcela de aguacate), pero la simulación también mostró que un alto nivel de flujo de genes podría conducir a pérdidas severas de la diversidad genética aún cuando los granjeros continuaran plantando diversas variedades de aguacate.
Cabrera <i>et al.</i> (2005)	realizó una caracterización morfológica de accesiones del depositario nacional de germoplasma de aguacate.	Encontró una separación de grupos que corresponden a los diferentes <i>Persea</i> que se albergan en un banco de germoplasma. Hizo agrupamientos más o menos definidos de accesiones pertenecientes a las 3 razas hortícolas.
Ashworth y Clegg (2005)	Estudiaron mediante microsatélites el género <i>Persea</i> .	Empleando marcadores de microsatélites, se estudiaron las relaciones genealógicas entre genotipos de aguacate cultivado.
Campos <i>et al.</i> (2007)	Determinaron si el género <i>Persea</i> corresponde a un grupo monofilético y si la división de los 2 subgéneros es válida.	Mediante estudios heurísticos y de parsimonia y basándose en caracteres morfológicos proponen algunas adecuaciones de reclasificación al género <i>Persea</i> sugiriendo que no es un grupo monofilético y que los subgéneros <i>Persea</i> y <i>Eriodaphne</i> deberían reconsiderarse como géneros independientes.
Borrone <i>et al.</i> (2006)	Estudiaron segmentos de secuencias expresados para <i>Persea americana</i> Mill, e investigaron expandir el número de marcadores de microsatélites informativos disponibles para aguacate.	Se detectaron un número 17 a 7.1 alelos por locus. Los iniciadores exitosamente amplificaron los productos en las diferentes variedades de <i>P. americana</i> , híbridos y especies relacionadas como <i>Persea shiedeana</i> . Dichos iniciadores pueden ser muy bien utilizados para caracterización de germoplasma, determinación de las relaciones genéticas de accesiones cultivadas y para el

		desarrollo de portainjertos antillanos tolerantes hacia <i>Phithophthora. cinnammomi</i> asistido por marcadores moleculares.
Chen <i>et al.</i> (2007) (en impresion)	Los niveles de polimorfismo de nucleótidos y desequilibrio de la unión de cuatro loci nuclear fueron investigados en una muestra de 21 accesiones de aguacate silvestre y 33 cultivados.	Diferencias genéticas significativas se encontraron entre 3 grupos geográficos de aguacate silvestre y el conglomerado asignó a 33 cultivares en 3 poblaciones "México central", "Sur de México/Guatemala", y el "Caribe (antillanos)".

2.9. Técnica de componentes principales utilizada en la caracterización de frutales

La técnica de componentes principales consiste en una matriz de correlación simple entre todos los posibles pares de variables que son estandarizados con el fin de homogeneizar las unidades de medida. Basados en esta matriz de correlación, las variables se transforman en factores o componentes principales los cuales son combinaciones lineales de las variables estandarizadas, siendo la máxima correlación el primer componente principal (CP) el cual tiene la mayor porción total del total de varianzas. Los coeficientes estandarizados reflejan la contribución de las variables a la función, mostrando así la influencia de cada variable en particular. Este método permite la estructuración de un conjunto de datos multivariados obtenidos de una población cuya distribución de probabilidades no necesita ser conocida; por lo que no necesita un modelo estadístico la estructura probabilística de los errores. Sin embargo, es posible que se presente una distribución multinormal en la población, o que el tamaño de la muestra sea tal que pueda asumirse multinormalidad, ya sea por el aumento en el número de variables consideradas o por el número de individuos que integran la muestra, y podrá entonces encontrarse significancia estadística en los componentes, ya que será posible asociar a cada uno de ellos una

medida de confiabilidad. Además las nuevas variables generadas (Componentes Principales) poseen algunas características estadísticas deseables, tales como independencia (cuando se asume multinormalidad) y en todos los casos no correlación (Cruz-Castillo *et al.*, 1999).

Esta técnica ha sido utilizada en diferentes investigaciones, por ejemplo, para caracterizar cultivares de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq) Moore Stearm, Portainjertos de fruta de kiwi, genotipos de tejocote y recursos genéticos de sapotáceas (Pérez, 2000), lo que presenta gran potencial en estudios de mejoramiento genético de frutales (Cruz-Castillo *et al.*, 1999).

2.10. Tipos de marcadores moleculares

Dentro de los organismos vivos existe una gran variedad de formas (morfológicas) que los distinguen entre sí. Esta variabilidad o “polimorfismos” genéticos, ocurren en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre 2 individuos sirve entonces como una etiqueta o “marcador genético” que se convertirá en un rasgo característico propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos (Mendoza-Herrera y Simpson, 1996). Se conocían dos clases de marcadores genéticos, siendo estos los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). Sin embargo, antes de los moleculares una segunda generación de marcadores genéticos son los marcadores “bioquímicos”, estos pueden ser representados por los metabolitos secundarios, proteínas estructurales, isoenzimas o enzimas

(Mendoza-Herrera y Simpson, 1996). Las isoenzimas son moléculas de proteínas cargadas diferentemente y que pueden separarse utilizando procedimientos de electroforesis usualmente mediante geles de almidón (Staub *et al.*, 1996).

Tanto los marcadores morfológicos como los bioquímicos pueden ser específicos de un tejido en particular o de un estadio de la planta. Aunque hay casos que han tenido éxito los marcadores morfológicos y bioquímicos; los primeros sin embargo, presentan desventajas como lo son las atribuibles al ambiente (Mendoza-Herrera y Simpson, 1996).

En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. No obstante, el uso de marcadores morfológicos tiene muchas más limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Para la gran mayoría de los frutales esto significa una espera no deseable de muchos años. Por otro lado, actualmente se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos las limitantes de los métodos tradicionales (Azofeifa-Delgado, 2006).

Las limitaciones han sido superadas con la nueva generación de marcadores, los llamados marcadores moleculares basados en las variaciones del DNA,

estos no son afectados por el ambiente al depender de las propiedades del DNA, las cuales no cambian aunque las plantas estén sujetas a condiciones variadas y extremas (Mendoza-Herrera y Simpson, 1996).

Los avances de la biología molecular durante la década de los 80s, han aportado esta clase nueva de llamados “marcadores genético moleculares” que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del DNA de los organismos. Estas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Este tipo de marcadores detecta variaciones directas a nivel del DNA y tienen ventajas como el hecho de ser dominantes o codominantes, de desarrollarse de manera estable, de carecer de efectos pleiotrópicos y sobre todo de no estar sujetos al ambiente (Valadez y Kahl, 2000).

Para obtener marcadores del DNA, se usan diferentes métodos que se pueden agrupar de manera convencional en tres categorías. La primera se basa en la técnica conocida como hibridación tipo “Southern”. Esta técnica tiene el propósito de explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos del DNA ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular. En esta categoría se incluye a los RFLP y a los VNTR (Valadez y Kahl, 2000).

La segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la Reacción de la Polimerización en Cadena o PCR (Polymerase Chain Reaction).

Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de DNA de longitudes variables no mayores de 6 kb en promedio. Estas secuencias iniciadoras pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas. Para esta tecnología se pueden citar como ejemplos las metodologías, RAPD, AP-PCR, DAF y AFLP (Valadez y Kahl, 2000).

La tercera categoría involucra metodologías que combinan la PCR o sus productos de DNA más la hibridación tipo Southern. Por ejemplo la técnica de RAHM o llamada también RAMPO, que requiere de la síntesis previa de DNA con cualquiera de las metodologías de la PCR y la posterior hibridación con alguna sonda que detecte microsatélites, optimizando de esta manera la tipificación del ensayo pues con el resultado de la PCR se detecta un patrón de fragmentos llamados de “primera generación” pero al hibridar las huellas con una sonda radioactiva que detecta microsatélites se revela otro patrón llamado de “segunda generación”, otra técnica basada en esta metodología son los AFLP la cual no requiere de hibridación aunque hacía uso de la radioactividad para poder detectar los polimorfismos; en la actualidad la detección de este tipo de fragmentos ya no corre riesgo alguno (Valadez y Kahl, 2000).

2.10.1. Descripción de las metodologías RAPDs e ISSRs para determinar marcadores moleculares

RAPD

De las tres tecnologías similares basadas en iniciadores simples de PCR; la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPDs), Amplificación de huellas

digitales de DNA (DAF) e iniciadores arbitrarios de PCR (AP-PCR), los RAPDs han sido los más utilizados para la construcción de mapas y el análisis de semejanzas de los genotipos (Karp *et al.*, 1997). Los marcadores de RAPDs son generados por la amplificación mediante PCR de segmentos aleatorios de DNA genómicos con iniciadores sencillos (usualmente de 10 nucleótidos de longitud) de secuencia arbitraria. Los iniciadores son utilizados como substratos por parte de la DNA polimerasa, para sintetizar y extender las secuencias genómicas a partir del extremo OH-3' de los iniciadores. La realización de este proceso, produce un discreto conjunto de productos de DNA amplificados que representan "blancos" de secuencias flanqueadas por los iniciadores orientados de forma opuesta y alineados en los sitios complementarios. Los productos amplificados pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida, visualizarse mediante tinción con bromuro de etidio o plata. Los RAPDs usualmente son marcadores dominantes con polimorfismos entre individuos definidos como la presencia o ausencia de una banda particular de RAPDs. Con el desarrollo de la metodología de RAPDs se han producido otros marcadores basados en la PCR (como SCAR y ASAP) (Staub *et al.*, 1996). La utilidad de los marcadores tipo RAPDs puede incrementarse secuenciando el término y longitud del iniciador. Dichas regiones amplificadas, caracterizadas y secuenciadas se denominan SCARs por sus siglas. Los SCARs son más reproducibles que los RAPDs y se pueden desarrollar en casos donde más o menos la electroforesis no es necesaria. Aunque los SCARs usualmente son marcadores dominantes, algunos teóricamente pueden ser convertidos a marcadores co-dominantes por digestión mediante endonucleasas (Staub *et al.*,

1996). Los ASAPs son una reciente modificación a la tecnología de la PCR ya que involucra la extracción alcalina del DNA con la subsecuente amplificación del DNA en microplatos utilizando iniciadores asociados con alelos específicos (ASAPs) que generan solo un fragmento de DNA sencillo a temperaturas apropiadas de alineamiento similares a SCARs (Staub *et al.*, 1996).

ISSR

Los microsatélites o Simple Sequence Repeats (SSR) son secuencias cortas y estrechas que consisten de motifs de una a seis bases que están en tandems repetidos. Obedeciendo a su obicuidad, hipervariabilidad, abundancia y su amplia distribución en el genoma. Los SSR loci representan una nueva generación de marcadores genéticos poderosos, para los organismos eucariontes. El uso de este sistema de marcadores, sin embargo, tiene la limitante de no tener acceso a la secuencia de información de las regiones que lo flanquean, si es que los iniciadores no fueron previamente diseñados para la amplificación de la PCR. De tal manera que el descubrimiento y caracterización de un gran numero de SSRs es muy consumidor de tiempo y costoso para los taxa (Bao y Wendel, 2001).

Recientemente una modificación de los marcadores basados en el sistema SSR son los análisis ISSR (Intersimple Sequence Repeat) popularizado por Wolfe *et al.* (1998), el análisis ISSR involucran la amplificación PCR del DNA genómico utilizando un iniciador simple que realiza la repetición por sí mismo, con 1 a 3

bases que anclan al iniciador a la terminación 3' o 5'. En suma a la necesidad de obtener información de las regiones que flanquean las secuencias, los análisis ISSR son muy simples técnicamente en comparación con muchos otros sistemas de marcadores. Este método provee una alta reproducibilidad de resultados y genera abundantes polimorfismos en muchos sistemas (Bao y Wendel, 2001).

2.11. Literatura citada

- Ashworth, V. E. T. M. and M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94 (5): 407-415.
- Ashwort, V.E.T.M., Kobayashi, M.C., De La Cruz, M. and M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae* 101: 255-267.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242.
- Bao, L. and J. F. Wendel. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1: 205-208.
- Barrientos, P., A. F., Ben -Ya'acov A. D., de la Cruz, T., E., López, L., L., Buffer, G. y M. W. Borys. 1991. Descriptores para aguacate. Ed. Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México. 69 p.
- Barrientos-Priego. A. F., Luis López L. 2000. Historia y genética del aguacate. *In. Téliz D. El Aguacate y su Manejo Integrado*. Ed. Mundi-Prensa. D.F., México. pp. 3-15.

- Barrientos-Priego, A., Muñoz-Perez, R., Reyes-Alemán, J.C., Borys, W., M. y M. T. Martínez-Damían 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos. *In* : Téliz O., D. y A. Mora A. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi-Prensa. Mexico, D.F. 321 p.
- Bergh, B. O., Scora, R. W. and W. B. Storey. 1973. A comparison of leaf terpenes in *Persea* subgenus *Persea*. *Bot. Gazette* 134: 130-134.
- Bergh, B. and N. C. Ellstrand. 1987. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-145.
- Bergh, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 76: 61-75.
- Birnbaum, K., DeSalle, R., Peters, Ch. M. and P. M. Benfey. 2003. Integrating gene flow, crop biology, and farm management in on-farm conservation of avocado (*Persea americana*, Lauracea). *American Journal of Botany* 90 (11): 1619-1627.
- Borys, M. W., Leszczyńska-Borys, H., Ramírez-Marañón, S. and L. Castro. 1993. An avocado relative: *Beilschmiedia anay* (Blake) Kosterm. fruit source. *California Avocado Society Yearbook* 79: 125-136.
- Borrone, J. W., Shnell, S.J., Violi, H. A. and R. C. Ploetz. 2006. Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequence tags. *Molecular Ecology*.
- Buffler G. and J Fiedler 1992. A study of the avocado genetic resources, GIARA-88- 4, Institut für Obst-, Gemüse- und Weinbau, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Buffler, G. and J. Fiedler. 1996. Avocado genetic resources. Final Report. GIARA B-14 Julio, 1996. 50 pp.
- Cabrera-Hernández C. 2005. Caracterización morfológica (vegetativa, flor y fruto) de colectas del género *Persea* en un banco de germoplasma. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Horticultor. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México. 68 p.
- Calabrese F. 1992. El Aguacate. Edit. Mundi-Prensa. Madrid, España.

- Campos, R. E., Terrazas, T. and L. López-Mata 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 249-258.
- Chanderbali, A. S., van der Werff, H and S. S. Renner 2001. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(1): 104-134.
- Chen, H., Morrell, P. L. and M. T. Clegg. 2007. Neucleotide diversity, and genealogical relationships in wild and cultivated avocados (*Persea americana* Mill). (en impresión).
- Clegg, M. T., Kobayashi, M. and J. Z. Lin. 1999. The use of molecular markers in the management and improvement of *Persea americana* Mill. Proc. IV World Avocado Congress, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. 5:227-231.
- Cruz-Castillo, J.G., Torres-Lima, P. A., Torres-Rivera, J. A. y V. Domínguez-Martínez, 1999. El análisis multivariado en la selección de frutales con características hortícolas sobresalientes. *In*. Memoria del XII Curso Internacional de actualización "La importancia del mejoramiento genético en frutales" Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México. pp. 27-37.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., Clegg, M. T. and M. T. Clegg. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analysis. *Journal of Heredity* 89(4): 319-322.
- Fiedler, J., Buffler, G. and F. Bangerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill) using RAPD markers. *Euphytica* 101: 249-255.
- García, A. 1970. Estudio botánico-citológico del "Canelillo" (*Persea* af. *cinerascens*, Blake) su posible utilización. *Agrociencia* 5(1): 119-127.
- Gama-Campillo, L. 1994. Studies on the systematic and ethnobotany of the subgenus *Persea*. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy University of California, Riverside. Riverside, USA. 294 pp.

- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayad, W. G. and T. Hodgkin. 1997. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. 47 p.
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea*-Lauracea). Mem. New York Bot. Gard. 14: 1-117.
- López, L. L., Rubí, A. M., Ben Ya'acov, A. D. Barrientos, P., A. F. y J. C. Reyes-Alemán. 1997. La biodiversidad del genero *Persea* y especies afines preservados en los bancos de germoplasma del estado de México. Revista Chapingo. Serie Horticultura 3(11): 39-44.
- Mendoza-Herrera, A. y J. Simpson. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. XV aniversario de la Unidad Irapuato. Avance y Perspectiva vol. 16. pp. 53-57.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. Theor. Appl. Genet. 94: 279-286.
- Pérez, A., C. 2000. Recursos genéticos de sapotáceas y su aprovechamiento en mejoramiento genético. Memoria del XIII curso internacional de actualización frutícola Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S. C. Coatepec Harinas, México. pp. 23-32.
- Popenoe, W. 1963. Early history of the avocado. Calif Avocado Soc Yearbook 47: 19-24.
- Rodríguez-Medina, N. N., Rhode, W., González, C., Ramírez, I.M., Fuentes, J. L., Román, M. A., Xiqués, X, Becker, D y J. B. Velázquez. 2003. Caracterización morfológica, bioquímica y Molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill) en Cuba. Memoria de resúmenes del V Congreso Mundial del aguacate del 19 al 24 de octubre. Málaga, España. pp. 47-49.
- Rodríguez-Suppo, F. 1982. El aguacate. A. G. F. Editores. D. F. México.
- Shnell, R.J., Brown, J.S., Olano, C.T., Power, E.J., Krol, C.A., Kuhn, D.N. and D.N. Motamayor. 2003. Evaluation of avocado germoplasm using

- microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(6): 881-889.
- Sharon, D., Cregan, P.B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav, E. and U. Lavi. 1997. An integrated genetic linkage map of avocado. *Theor. Appl. Genet.* 95: 911-921.
- Sharon, D., Hillel, J., Mhameed, S., Cregan, P., Lahav, E. and U. Lavi. 1998. Association between DNA markers and loci controlling avocado traits. *Journal of the American Society for horticultural science* 123(6): 1016-1022.
- Schroeder, C. A. 1951. Avocado materials for horticultural research. *California Avocado Society Yearbook* 35: 107-112.
- Schroeder, C. A. 1974. *Persea schiedeana*, the coyo, a possible rootstock for avocado in South Africa. *California Avocado Society Yearbook.* 57: 18-24.
- Shieber, E. and G. A. Zentmyer. 1978. Hunting for *Persea steyermarkii* in the mountains of Guatemala. *California Avocado Society Yearbook* 62: 67-71.
- Smith, C. E. 1966. Archaeological evidence for selection in avocado. *Econ. Bot.* 20: 169-175.
- Staub, J. E., Serquen, F.C. and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in Plant Breeding. *HortScience* 31(5): .
- Storey, W. B., Bergh, B.O. and G. A. Zentmyer 1986. The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 127-133.
- Tsu-liang, Ch., Ming-te, L., Chien-an, L. and Ch. lou-zen. 2003. Genetic diversity analysis of Taiwan avocado accessions. *Proceedings V World Avocado Congress. Málaga, España.* pp. 55-59.
- Tanksley, 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 3-8.

- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. D.F., México 147 p.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central América. *Novon* 12(4): 575-586.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q-Y and S.R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.
- Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Econ. Bot.* 31: 315-320.
- Zentmyer, G. A., Bergh, B. and W. B. Storey. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 127-133.

CAPÍTULO 3

III. DISTINCIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Persea* CON MARCADORES RAPD E ISSR

RESUMEN

Con la finalidad de establecer las diferencias en la diversidad genética de *Persea* y en especial del subgénero *Persea* resguardado en el Depositario Nacional de Germoplasma de Aguacate de México, se estudiaron ocho especies (*P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens* y *P. indica*) utilizando marcadores moleculares mediante las técnicas de RAPD e ISSR, donde los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida. Las huellas de DNA se analizaron con métodos estadísticos multivariados y de remuestreo para conocer su relación genómica. Se detectaron fragmentos polimórficos de DNA útiles para la distinción inter e intraespecífica de las ocho especies del género *Persea* en estudio. Los análisis estadísticos de las huellas mediante RAPD a diferencia de ISSR, agruparon de forma congruente a las diferentes especies de acuerdo a la taxonomía actual. Se encontró que *P. indica* y *P. lingue* mantienen poca relación genómica con el resto de las especies estudiadas, y esto concuerda ya que pertenecen al subgénero *Eriodaphne*. Por otra parte los resultados permitieron diferenciar genotipos de las diferentes especies del subgénero

Persea incluyendo a *P. americana* y un híbrido interespecífico incluido en el análisis.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: aguacate, aguacate de monte, aguacatillo, chinini, germoplasma, Lauraceae, marcadores moleculares, recursos fitogenéticos.

DISTINCTION OF SPECIES OF THE GENUS *Persea* BY MEANS OF RAPD AND ISSR MARKERS

ABSTRACT

With the aim of establishing differences in the *Persea* genetic diversity and specially of the subgenus *Persea* maintained in the National Avocado Germplasm Repository of Mexico, eight species were studied (*P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens* y *P. indica*) using molecular markers by means of RAPD and ISSR techniques, where the PCR products were separated in acrylamide gels. The DNA fingerprinting were analyzed using multivariate statistical methods and bootstrapping to establish their genomic relationships. Useful DNA polymorphic fragments were found for the inter and intra-specific distinction of the eight species considered of *Persea* in the study. The statistical analysis of the DNA fingerprints by means of RAPD compared with ISSR, grouped the different species congruently to the actual taxonomic classification. According to the present study *P. indica* y *P. lingue* show less genomic relationship with the rest

of the species studied, and this is accordance to the fact that they correspond to the subgenus *Eriodaphne*. The results permitted to differentiate genotypes of the different species of the subgenus *Persea* that includes *P. americana* and a inter-specific hybrid included in the study.

ADDITIONAL KEYWORDS: Avocado, aguacate de monte, “aguacatillo”, “chinini”, germplasm, Lauraceae, molecular markers, plant genetic resources.

3.1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con amplia diversidad de tipos de aguacate y existen en el país al menos 20 diferentes especies relacionadas con el aguacate (Barrientos *et al.*, 2007). El género *Persea* que pertenece a la familia Lauraceae es considerado como uno de los más difíciles de abordar taxonómicamente (Kopp, 1966). Hace unos años se publicó que el subgénero *Persea* solo está formado por *Persea americana* y *Persea schiedeana*, dejando fuera a *P. nubigena*, *P. steyermarkii*, *P. parvifolia*, *P. tolimanensis*, *P. floccosa*, y *P. zentmyerii*, y se e indicó que la variabilidad genética en aguacate se debe básicamente a los procesos de selección y cultivo que el hombre ha hecho a través de los años (van der Werff, 2002). Furnier *et al.* (1990) utilizando RFLP logró separar *P. nubigena* y *P. steyermarkii*; y a *P. floccosa* de *P. americana*, sin embargo, indicó que pueden ser solo variantes de *P. americana*. Recientemente Campos *et al.* (2006) planteó la hipótesis de que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* se consideren como géneros separados y se basan en un análisis

de parsimonia algorítmica, donde también reconoce como especies a las del subgénero *Persea*.

Las dificultades en la clasificación de las variedades hortícolas de aguacate, junto con la influencia del hombre se basa en que su progenie es extremadamente variable (Gama-Campillo, 1994), por lo que las herramientas como los marcadores moleculares podría tener una aplicación directa para resolver la ubicación taxonómica dentro del complejo *Persea*, existen ya antecedentes en aguacate como los estudios de Davies *et al.* (1998) con RFLP, Mhameed *et al.* (1997) con DFP - SSR, Fiedler *et al.* (1998) con RAPD, Chao *et al.* (2003) con AFLP y Ashworth y Clegg (2003) con microsatélites. Fiedler *et al.* (1998) indicaron que si se dan las condiciones estandarizadas y estrictas a lo ensayos con marcadores basados en RAPD se pueden realizar pruebas rápidas y de menor demanda técnica, comparados con minisatélites y microsatélites. Asimismo estos mismos autores indicaron que los RAPD pueden ayudar a elucidar la variación genética de todo el subgénero *Persea*, ya que se demostró la detección de fragmentos monomórficos específicos para cada raza de *Persea americana*, lo cual no se ha encontrado con SSR (Shnell *et al.*, 2003)

Por lo anterior, se planteó como objetivo establecer la distinción mediante las técnicas de marcadores RAPD e ISSR de genotipos representativos del subgénero *Persea* como de *Eriodaphne*, con énfasis en el primero.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio, un total de 14 genotipos de *Persea* provenientes del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. localizado en Coatepec Harinas, México, fueron evaluados (Cuadro 3.1).

3.2.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó con el método del CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) basado en los protocolos de Saghai-Marroof *et al.* (1984), con modificaciones: donde fue realizada la extracción de DNA de hojas frescas de aguacate de 8 especies del género *Persea* correspondientes a; *P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens*, *P. indica*, posible híbrido *Persea nubigena* x *Persea americana* y un híbrido *Persea schiedeana* x *Persea americana* var. *guatemalensis*. Se analizaron los perfiles moleculares de las especies utilizando las técnicas RAPD e ISSR.

El método tuvo 2 modificaciones, una de ellas realizada durante el proceso de extracción en el Laboratorio de Biología Molecular en la Universidad Autónoma Chapingo; y la segunda en el Laboratorio de Biotecnología de INIFAP en Uruapan, Michoacán por Álvarez-García (2003).

Protocolo de extracción adaptado en el laboratorio de biología molecular en la Universidad Autónoma Chapingo

Las soluciones utilizadas para este protocolo se indican en el Cuadro 3.2.

Se molieron 3 g de muestra fresca usando nitrógeno líquido, un mortero y un pistilo dejando un polvo fino. Se transfirió el polvo con la ayuda de una espátula tan rápido como fue posible a 15 mL de buffer de extracción precalentado (60 °C) en un tubo de polipropileno cubierto. Se incubó por 30 minutos a 60 °C en baño de agua. Mezclándolo cada 10 minutos. La temperatura óptima de incubación y el tiempo variaron entre especies. Se adicionó un volumen de cloroformo alcohol isoamílico, cubriendo el tubo se realizó la extracción por 10 minutos en un agitador rotatorio o a mano. La mezcla se realizó suavemente pero asegurando la emulsificación de las fases. Se centrifugó por 10 minutos (5000 x g, a temperatura ambiente) y posteriormente la fase acuosa (parte superior) fue re-extraída una o varias veces con cloroformo alcohol isoamílico. Se transfirió la fase final acuosa utilizando una pipeta a un tubo de vidrio para centrifugar. Se adicionó ARNsa a una concentración final de 100 µg·mL⁻¹. Se mezcló, e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se adicionó 0.6 en volumen de isopropanol frío, cubriéndolo con parafilm, se mezcló suavemente pero en forma total invirtiendo el tubo en repetidas ocasiones. En esta etapa, el complejo DNA/CTAB pudo precipitarse como una nube. Sucediendo esto, se sacó el precipitado de la solución con un ganchillo de vidrio y se transfirió a la solución de lavado, y se secó al ambiente invirtiendo el tubo sobre una hoja de papel absorbente. Si la muestra presentaba un aspecto floculento, nuboso o como agua clara después de mezclarse con isopropanol, se colectaba el

precipitado mediante centrifugación a velocidad baja (10 minutos, 2000 x g, 4°C). Si la pastilla se hacía visible, se transfería a la solución de lavado y posterior secado, habiéndose pasado a un tubo de micro-centrifuga de 1.5 mL, si no era así, se colocó la solución a -20 °C toda una noche y se centrifugó nuevamente. Se adicionaron 350 µL de la solución de lavado, se agitó suavemente la pastilla por pocos minutos y colectó por centrifugación (10 min, 5000 x g, 4°C), los residuos de CTAB se eliminaron de este modo. Se Invertieron los tubos y drenaron sobre una toallita de papel por aproximadamente una hora. Se tuvo cuidado de que la pastilla no se deslizara por la pared del tubo. Se cuidó que las pastillas no presentaran residuos de etanol, ni estar demasiado secas, ya que en ambos casos, la disolución se dificultaba. Se adicionó un volumen apropiado de buffer TE (por ejemplo 1 mL; dependiendo de los subsecuentes pasos de purificación seleccionados) y se permitió que las pastillas se disolvieran a 4 °C sin agitación.

Dada la naturaleza de algunas hojas y si la muestra presentaba exceso de contaminantes como taninos o aceites esenciales, el protocolo se cambió y utilizó el propuesto por el laboratorio de biotecnología de INIFAP, de Uruapan Michoacán (Álvarez-García, 2003).

Protocolo de extracción adaptado del Laboratorio de Biotecnología de INIFAP en Uruapan, Michoacán.

Se colectaron de 2 a 3 segmentos de hojas jóvenes (1.0 cm cada uno) por muestra (200 mg) y en un mortero se molieron adicionando nitrógeno líquido,

hasta obtener un polvo fino y se agregó 1.0 mL de la solución extractora (Cuadro 3.3). Se Incubó el extracto en un horno a 65 °C durante 45 min. Se agitó suavemente cada 15 minutos, posteriormente se destaparon los tubos y se dejaron enfriar durante 5 min. Se agregó 1 mL de la mezcla cloroformo-octanol (24:1) mezclando suavemente de 5 a 10 minutos y se centrifugó a 3200 rpm, por 10 minutos. Se transfirieron 600 µL de la fracción acuosa a tubos Eppendorf de 2.0 mL. Se agregaron 500 µL de la mezcla cloroformo-octanol (24:1). Se mezcló suavemente de 5 a 10 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 3200 rpm. Se transfirió la fase acuosa (500 µL) a tubos nuevos. Se agregaron 15 µL de ARNsa (10 mg·µL⁻¹) e incubó por 30 minutos a 37 °C. Se agregaron 75 µL de 5 M NaCl y 750 µL de etanol absoluto frío. Se colocaron los tubos a -80 °C por 30 minutos y centrifugaron durante 15 minutos a 3200 rpm. Se decantó el etanol y NaCl, se secaron los tubos invirtiéndolos durante 30 minutos. La pastilla de DNA se resuspendió sobre 150 µL de solución TE y se almacenó la muestra a 4 °C hasta su uso.

3.2.2. PCR

Mediante la técnica de PCR se sintetizaron fragmentos específicos de DNA con la finalidad de detectar fragmentos específicos en el genoma de aguacate. Se utilizaron los siguientes programas de termociclaje para RAPD e ISSR, respectivamente: Para RAPD se utilizó el equipo Gene Amp ® PCR System 2700 AB Applied Biosystems y el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 1 min a 94 °C; 35 ciclos [comprendiendo la

desnaturalización, alineamiento y extensión de 30 s a 94 °C, 30 s a 40 °C y 1.5 min a 72 °C, respectivamente] y al final 1 ciclo de extensión de 2.5 min a 72 °C]. Para ISSR se utilizó también el equipo; Gene Amp® PCR System 9700 AB Applied Biosystems, y el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 1 min a 94 °C; 38 ciclos [comprendiendo desnaturalización, alineamiento y extensión de 30 s a 94 °C, 30 s a 48 °C y 2 min a 72 °C, respectivamente] y al final 1 ciclo de extensión de 2.5 min a 72 °C.

Los componentes de reacción para el análisis de RAPD se colocaron en tubos Eppendorf de 500 µL conteniendo cada uno 25 µL de los siguientes componentes; 5 µL de DNA [20 ng·µL⁻¹], 0.3 µL enzima Taq polimerasa [5 U·µL⁻¹] (Fermentas), 10 µL dNTPs [500 µM], 2.5 µL amortiguador Taq [1x], 2 µL de MgCl₂ [25 mM], 2 µL de iniciador y 3.2 µL de agua.

Los componentes de reacción para el análisis tipo ISSR fueron los mismos que se utilizaron para RAPD solo que en este caso se utilizaron; 2.5 µL de DNA [20 ng·µL⁻¹] y 3 µL de MgCl₂ [25 mM].

Se utilizaron 7 iniciadores para el caso de RAPD (Cuadro 3.4) y 5 para ISSR (Cuadro 3.5).

Los productos amplificados de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (29:1) 8 % preparados con 24 mL de poliacrilamida, 12 ml de TBE 10x, 84 mL de H₂O y 480 μ L de APS (preparado al momento) más 70 μ L de Temed. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 2.5 μ L de la mezcla del producto de la reacción de PCR agregando 1 μ L de buffer de carga "orange blue" 6x 6190 A de Promega. Se utilizó el marcador 1 kb de Gybcó. Los geles se corrieron a 280 volts aproximadamente por 2.5 h en amortiguador TBE 1X y se tiñeron con AgNO₃ 0.2 % de acuerdo al protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2000). Para la documentación de las huellas de DNA se utilizó el sistema Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

3.2.4. Análisis estadístico

Con los perfiles de bandas obtenidos en los geles se elaboró una matriz básica de datos correspondiente a cada iniciador utilizado, donde la presencia y ausencia de bandas fue registrado, asignando 1 y 0, respectivamente.

Para el estudio de similitud entre los datos generados a partir de cada matriz, se utilizó el criterio de distancias de similitud mediante el índice Jaccard (Jaccard, 1908) y para el agrupamiento se utilizó el método Neighbor-joining recomendado para generar grupos por similitud (Saitou y Nei, 1987). Para elaborar el árbol se

utilizó el programa FreeTree Versión 0.9.1.50 (Pavlícek *et al.*, 1999), considerando el método de remuestreo (“bootstrap”) con 1000 repeticiones, (Vladimir *et al.*, 2001), para visualizar el árbol obtenido se utilizó el programa Tree View 1.6.6 (Page, 1996)

3.3. RESULTADOS

Con cada iniciador seleccionado para RAPD como para ISSR se obtuvieron fragmentos de DNA suficientes y de calidad como se ejemplifica en las Figuras 3.1 y 3.2. Dichos fragmentos fueron más abundantes para la mayoría de los iniciadores RAPD (Cuadro 3.4), mientras que en los ISSR fueron menos abundantes (Cuadro 3.5); donde todos los iniciadores mostraron 80 % o más fragmentos polimórficos. El patrón de bandeo en general difirió marcadamente entre individuos, donde se detectaron bandas únicas para cada uno de los individuos variando en su número con la técnica de RAPD (Cuadro 3.6), sin embargo para ISSR solo se encontraron fragmentos únicos para *Persea indica*, *Persea floccosa*, posible híbrido *Persea nubigena* x *Persea americana*, las dos *Persea americana* var. *guatemalensis*, *Persea nubigena*, *Persea americana* var. *drymifolia* (‘Tochimilco 1’), *Persea schiedeana* y *Persea lingue*. Los patrones de las bandas detectadas para todos los iniciadores fueron altamente informativas y distintivas para los individuos considerados en el estudio.

Con el fin de comparar los datos de bandeo, todos los fragmentos de DNA evidentes en cada juego de iniciadores se registraron de forma binaria (1=presente, 0=ausente) y usadas para construir la matriz de datos. Donde la matriz final para RAPD contó con 3808 caracteres de todos los 14 individuos, mientras que para ISSR la matriz se constituyó de 1470 caracteres. Dichas matrices fueron utilizadas para derivar árboles de relación genética para RAPD e ISSR (Figura 3.3 y 3.4).

Mediante RAPD los individuos formaron una marcada separación inicial que fue entre *Persea indica* y el resto de los individuos, lo cual fue soportado por un alto valor de remuestreo (100 %). La siguiente bifurcación fue de *Persea lingue* con el restante de los individuos (Figura 3.3). La tercera bifurcación formó dos grupos: el primero que a su vez se dividió en *Persea gigantea*, *Persea steyermarkii*, *Persea nubigena* y posible híbrido *Persea nubigena* x *Persea americana*, y en otro que abarcó a *Persea americana* var. *drymifolia* y a los dos individuos de *Persea americana* var. *guatemalensis*; el segundo grupo también se dividió en dos, donde el primero abarcó a *Persea schiedeana*, *Persea cinerascens* y al híbrido interespecífico *Persea schiedeana* x *Persea americana* var. *guatemalensis*, y el segundo incluyó a *Persea floccosa* y a *Persea americana* var. *drymifolia*.

En el caso de ISSR los genotipos formaron una marcada separación inicial que fue entre *Persea floccosa* y el resto de los individuos, lo cual estuvo sustentado por un alto valor de remuestreo (100 %). La siguiente bifurcación fue de un

grupo que abarcó dos individuos de *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana) y en otro grupo el restante de los individuos (Figura 3.4). La tercera bifurcación formó dos grupos: el primero abarcó solo al posible híbrido *Persea nubigena* x *Persea americana*, y el segundo que a su vez se dividió, donde en un grupo estuvo integrado por *Persea steyermarkii*, *Persea cinerascens*, *Persea schiedaeana* y otro grupo incluyó a *Persea gigantea* además de las dos *Persea americana* var. *Guatemalensis*; el segundo, abarcó un grupo solo a *Persea nubigena* y en otro grupo al híbrido interespecífico *Persea schiedeana* x *Persea americana* var. *guatemalensis*, *Persea indica* y a *Persea lingue*.

Todos los individuos se pudieron diferenciar y no existieron redundancias. La distancia genética más lejana para el caso de RAPD fue de 0.875 entre *Persea schiedeana* y *P. indica*, y la con mayor cercanía fue entre *Persea nubigena* y para el posible híbrido *P. nubigena* x *Persea americana* con un 0.511 de distancia. Para ISSR la distancia genética más lejana fue de 0.9035 entre *Persea gigantea* y *Persea nubigena*, mientras que para el híbrido *P. nubigena* x *Persea americana* y *Persea americana* var. *drymifolia* ('Tochimilco') resultó la menor con una distancia de 0.604.

3.4. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que los RAPD e ISSR pueden utilizarse para distinguir fidedignamente los individuos. En el caso del árbol de RAPDs producto del análisis estadístico, resultó en la separación y agrupación

de los materiales utilizados conforme a la taxonomía indicada por Williams (1977) para el subgénero *Persea* y parcialmente con la de Kopp (1966) para todo el género *Persea*. Donde fue marcada la separación de *Persea indica*, especie de las Islas Canarias, España (Koop, 1966) y que hasta hace unos años era la única *Persea* fuera de las Américas; sin embargo, Chanderbali *et al.* (2001) indican la existencia de especies del género *Persea* en Asia designados dentro del subgénero *Machilus*. La separación clara de *Persea indica* fue seguida por la de *Persea lingue*, especie proveniente de Chile, por lo que la separación de estas dos primeras ramas del árbol incluyen a las dos especies del subgénero *Eriodaphne* incluidas en este estudio, lo cual coincide con lo encontrado por Chanderbali *et al.* (2001) donde existe separación del subgénero en *Persea* de *Eriodaphne* con secuencias ITS. Sin embargo, en otro estudio que incluyó a nueve especies tanto del subgénero *Persea* (6) y *Eriodaphne* (4) incluyendo las tres razas de aguacate, no se pudo separar los dos subgéneros con marcadores DFP y SSR (Mhameed *et al.*, 1997); pero si a *Persea americana* del resto de las especies, incluyendo una clara separación entre las razas. Tres individuos de *Persea americana* se agruparon y se pudieron separar, con excepción de "Tochimilco" que se agrupó con *Persea floccosa*, especie que se piensa es ancestro de *Persea americana* var. *drymifolia* (Scora y Bergh, 1990). "Tochimilco" se estudio anteriormente con AFLP (Chao *et al.*, 1990) y se encontró dentro de un grupo muy específico de aguacates de la raza Mexicana donde se formaron un total de 7 grupos de la raza Mexicana con una gran variación genética. Cabe indicar que los posibles antecesores de la raza Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis*)

como *Persea nubigena* (Williams, 1977), *Persea gigantea* y *Persea steyermarkii* (Schieber y Zentmyer, 1978), se agruparon y se separan del mismo modo donde está la raza Guatemalteca, Furnier *et al.* (1990) encontraron mediante RFLP evidencia de que *Persea nubigena* y *Persea steyermarkii* pudieron dar origen a *Persea americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca), por lo que su cercanía concuerda con lo encontrado en este estudio.

La inclusión de *Persea cinerascens* que es del subgénero *Eriodaphne* contrasta al agruparse con *Persea schiedeana* y el híbrido interespecífico *Persea schiedeana* x *Persea americana* var. *guatemalensis*, *Persea schiedeana* es la especie más distintiva del subgénero *Persea* y se ha encontrado que es altamente variable, como lo ha indicado Barrientos *et al.* (1992) donde probablemente existen razas dentro de *Persea schiedeana* y por las evidencias encontradas con marcadores DFP y SSR donde se encontró alta variación en tres fuentes de *Persea schiedeana* (Mhameed *et al.*, 1997). *Persea cinerascens* tiene características intermedias entre los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* al igual que *Persea pallida* y *Persea rigens* (Kopp, 1966), como es la pubescencia en el pistilo que es característico del subgénero *Persea* mientras que las especies del subgénero *Eriodaphne* no la presentan. De hecho se ha reportado la posible existencia de híbridos interespecíficos entre *Persea cinerascens* y *Persea americana* (García, 1973), por lo que es posible que comparta algunas características genéticas con *Persea schiedeana*, ya que con los marcadores ISSR también se encontró una alta afinidad.

La separación de los individuos de acuerdo a la taxonomía clásica del aguacate hasta el nivel de razas, ya había sido indicada por Fiedler *et al.* (1998), donde se pudieron separar con RAPD las tres razas y la nueva posible raza *Costarricensis* (Ben-Ya'acov *et al.*, 1995), indicando que estas tienen una distancia genética equidistantes, tal como ya lo había indicado anteriormente Bergh (1995) y de igual forma también con AFLP (Thomas Chao, Universidad de California Riverside, USA. 2003. Comunicación personal). Es probable que esta separación conforme a la taxonomía, se deba a que los marcadores moleculares tipo RAPD usan iniciadores arbitrarios de oligonucleótidos de 10 bases y que toman al azar secuencias a lo largo de todo el genoma tanto nuclear como de organelos, o sea muestreos al azar del mismo (Williams, 1990); lo que no es el caso para marcadores moleculares del tipo de ISSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994). En comparación con marcadores de isoenzimas y microsatélites, existen algunas limitaciones para los RAPD, tales como la detección exclusivamente de marcadores dominantes y algunas veces la baja reproductividad, lo cual pudo haber desalentado a muchos investigadores del uso de RAPD; sin embargo, sus ventajas pesan más que sus desventajas (Sung y Wong, 2001), además de que se ha probado que al tener un buen control del perfil de temperatura en durante el termociclaje, los RAPD son reproducibles y muy informativos (Pendler *et al.*, 1993), tal como se pudo apreciar en el presente trabajo.

Para el caso de ISSR la separación de los materiales en estudio no se comportó como en RAPD, ya que no concordó con la taxonomía clásica de

Persea. Sin embargo, este tipo de marcadores lejos de mostrar la variabilidad genética, refleja la cercanía entre los individuos analizados; de manera que no se detectan muchos polimorfismos; la técnica tiende a proporcionar mayor cantidad de fragmentos monomórficos; pero los pocos polimorfismos detectados permiten la separación de los individuos involucrados en el estudio; ya que están señalando directamente mutaciones ocurridas en la información genética ubicada entre el núcleo de dos microsatélites del mismo tipo. En el presente trabajo en particular, fueron de utilidad para diferenciar todos los genotipos. Los marcadores ISSR son particularmente útiles para el estudio de individuos relativamente cercanos que exhiben bajos niveles de polimorfismo (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y se han utilizado exitosamente como una buena alternativa para obtener la huella genética y análisis genético en especies frutales incluyendo a los cítricos (*Citrus* spp.) (Fang y Roose, 1997; Fang *et al.*, 1998), vid (*Vitis vinifera* L.) (Moreno *et al.*, 1998), grosella (*Ribes* L.) (Lanham y Brennan, 1999) y ciruelo (*Prunus* L. sp.) (Goulão *et al.*, 2001) y nopal tunero (*Opuntia* spp.) (Luna-Paez *et al.*, 2007). En el presente estudio se agruparon algunos individuos con características en común como ocurrió con los dos individuos de la raza Mexicana, a los dos individuos de la raza Guatemalteca, y a *Persea lingue* y *Persea indica* del género *Eriodaphne* (Kopp, 1966). No así a *Persea nubigena*, al posible híbrido *Persea nubigena* x *Persea americana*, *Persea gigantea* y *Persea steyermarkii*, que son especies que se sabe dieron origen a la raza Guatemalteca (Fumier *et al.*, 1990), donde se mostraron dispersos en ramificaciones diferentes. Algo parecido sucedió con *Persea schiedeana* y el híbrido interespecífico *Persea schiedeana* x *Persea americana*

var. *guatemalensis* (Ellstrand *et al.*, 1986), que también se ubicó en ramificaciones distintas, así como con *Persea cinerascens* y *Persea floccosa*. Al respecto es marcada la falta de afinidad entre las especies e híbridos tanto del subgénero *Persea* (con excepción de las razas de *Persea americana*) como de *Eriodaphne*, lo anterior también se ha encontrado con marcadores DFP y SSR para especies diferentes a *Persea americana* cuando se analizaron junto a esta última (Mhameed *et al.*, 1997), donde si se pudieron separar las tres razas de aguacate (*P. americana*) del resto de las especies.

Los resultados obtenidos sugieren que *Persea* es un género polifilético tal como lo planteó Chanderbali *et al.* (2001), así como *Persea americana*, lo cual también fue indicado por Furnier *et al.* (1990). Fue posible mediante RAPD de manera mas clara que ISSR, la separación de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*. Sin embargo, con la finalidad de separar adecuadamente los materiales en estudio; sería conveniente considerar con fines de complementación otro tipo de análisis basados en secuencias de genes conservados con el fin de confirmar lo encontrado.

3.5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero a través del Proyecto clave 61 "Estudio de las relaciones genéticas entre especies del género *Persea* subgénero *Persea*" de la Red de Aguacate del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la

3.6. LITERATURA CITADA

- Ashworth, V. E. T. M. and Clegg, M. T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94(5): 407–415.
- Barrientos-Priego, A. F., Borys, M. W., Escamilla-Prado, E., Ben-Ya'acov, A., De La Cruz-Torres, E. y L. López-López. 1992. A study of the avocado germplasm resources, 1988-1990. IV. Findings in the Mexican Gulf region. *Proceedings of the Second World Avocado Congress I*: 551-558.
- Barrientos-Priego, A., Muñoz-Pérez, R., Reyes-Alemán, J.C., Borys, W., M. y M. T. Martínez-Damían. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos. *In*: Téliz O., D. y A. Mora A. *El aguacate y su manejo integrado*. Ed. Mundi-Prensa. Mexico, D.F. 321 p.
- Ben-Ya'acov, A., Solis Molina, A. and E. Peri. 1995. Progress of the study of avocado genetic resources. II. The avocado genetic resources in Costa Rica. Program and Book of Abstracts of the World Avocado Congress III. October 22-27, Tel Aviv, Israel. p.109.
- Campos-Rojas, E., Terrazas, T. and L. López-Mata. 2006. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 249-258.
- Chanderbali, A. S., van der Werff, H. and S. S. Renner. 2001. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88(1): 104-134.
- Chao, C. T., Barrientos-Priego, A. F, Reyes-Alemán, J. C. and P. S. Devanand. 2003. Genetic relationships among accessions from California and

- Mexico characterized by AFLP markers. Abstracts of the World Avocado Congreso V. Málaga, España. pp. 208-209.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., Clegg, M. T and M. T. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analysis. *J. Hered.* 89: 319–323.
- Ellstrand, N. C., Lee, J. M., Bergh, B. O., Coffey, M. D. and G. A. Zentmyer. 1986. Isozymes confirm hybrid parentage for 'G755' selections. *California Avocado Society Yearbook* 70: 199-203.
- Fang, D. Q., Krueger, R. R. and M. L. Roose. 1998. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:612–617.
- Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408–417.
- Fiedler, J., Bufler, G. and F. Bangerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPDS markers. *Euphytica* 101: 249-255.
- Furnier, G. R., Cummings, M. P. and M. T. Clegg. 1990. Evolution of the avocados as related by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity* 81: 183-188.
- Gama-Campillo, L. M. 1994. Studies on the systematics and etnobotany of the subgenus *Persea*. Doctor in Philosophy Thesis. University of California Riverside. Riverside, USA. 294 p.
- Goulão, L., Monte-Corvo, L. and C. M. Oliveira. 2001. Phenetic characterization of cultivars of plum (*Prunus* sp.) by high multiplex ratio markers: Amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:72–77.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223–270.
- Kopp, L. E. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14(1): 1–120.

- Lanham, P. G. and R. M. Brennan. 1999. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74:361–366.
- Luna-Páez, A., Valadez-Moctezuma, E., Barrientos-Priego, A. F. y C. Gallegos-Vázquez, C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp. mediante semilla con marcadores moleculares RAPD e ISSR y su posible uso para diferenciación. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 9: 43-59.
- Moreno, S., Martín, J. P. and Ortiz, J. M. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101:117– 125.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill) cultivars and between species. *Theo. Appl. Genet.* 94: 279-286.
- Page, R. D. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Applic. Biosc.* 12: 357-358.
- Pavlíček, A., Hradá, S. and J. Flegr. 1999. Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* 45(3): 97-99.
- Pendler, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J. and G. Fedak. 1993. Analysis among laboratories. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *PCR Methods Appl.* 2: 341-345
- Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics (ribosomal DNA spacer-length variation/restriction fragment-length polymorphisms/Rrnl/Rrn2). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.

- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Schnell, R. J., Brown, J. S., Olano, C.T., Power, E. J., Krol, C.A., Kuhn, D.N. and J.C. Motamayor. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(6): 881-889.
- Shieber, E. and G. A. Zentmyer. 1978. Hunting for *Persea steyermarkii* in the mountains of Guatemala. *California Avocado Society Yearbook* 62: 67-71.
- Scora, R. W. and B. O. Bergh. 1990. The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill.). *Lauraceae. Acta Horticulturae* 275: 387-394.
- Sung, M. and K. C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *Amer. J. Bot.* 88(12): 2180-2188.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. D.F., México 147 p.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon* 12(4): 575-586.
- Vladimir, H., Pavlíček, A. and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, J. K., Rafalski, J. A. and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, L. O. 1977. The avocado, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany* 31: 315-320.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

Cuadro 3.1 Genotipos de *Persea* tipificados mediante RAPD e ISSR en el estudio.

Número de Colecta	Origen de la Muestra	Nombre designado	Número En el Lote	Especie, Raza o Parentesco	Modo de Conservación ²
CH-C-29	España	Indica	1	<i>Persea indica</i>	S
CH-C-30	México	Canelillo	2	<i>Persea cinerascens</i>	S
CH-I-2	Guatemala vía Israel	Gigantea	3	<i>Persea gigantea</i>	I
CH-I-3	México vía Israel	Floccosa	10	<i>Persea floccosa</i>	I
CH-I-4	Guatemala vía Israel	Nubigena 1/7	12	Posible híbrido <i>Persea nubigena</i> x <i>Persea americana</i>	I
CH-C-62	Guatemala vía EEUU	Martín Grande c	19	Híbrido <i>Persea schiedeana</i> x <i>Persea americana</i> var. <i>Guatemalensis</i>	C
CH-G-7	México	ScrMer7 S1	60	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	I
CH-G-76	México	Rodeo 1	70	<i>Persea nubigena</i>	I
	México	CRM	76	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	S
CH-G-10	México	Olanca2 S3	114	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	I
CH-C-10	México	Tochimilco 1	208	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	I
	México	Steyermarkii	232	<i>Persea steyermarkii</i>	I
CH-H-7	Honduras	Lino	44	<i>Persea schiedeana</i>	I
	Chile	Lingue	32	<i>Persea lingue</i>	S

S: de semilla; I: injerto; C: Clon,

Cuadro 3.2 Soluciones para el protocolo adaptado en el laboratorio de biología molecular en la Universidad Autónoma Chapingo.

Solución	Componentes
Nitrógeno líquido	
Buffer de extracción:	2 % p:v CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA 100 mM Tris-HCL pH 8.0 0.2 % β-mercaptoetanol (adicionado justo antes de usarse). en relación 24:1 en v:v
Cloroformo-Alcohol isoamílico:	
Solución de RNAsa:	10 mg·mL ⁻¹ RNasa 10 mM Tris-HCl 15 mM NaCl pH 7.5 Solución hervida por 15 minutos, enfriada a temperatura ambiente y almacenada a -20 °C.
Isopropanol:	100 %
Solución de Lavado:	76 % de etanol o isopropanol 10 mM de acetato de amonio.
Buffer TE:	10 mM Tris-HCl 1 Mm EDTA, Ph 8.0
Acetato de amonio.	7.5 M

Cuadro 3.3 Soluciones del buffer de extracción para el protocolo adaptado del Laboratorio de Biotecnología de INIFAP en Uruapan, Michoacán.

Componente	Concentración Final	20 mL	100 mL
d H ₂ O		1.4 mL	17.0 mL
1000 mM Tris ^z	100 mM	2.0 mL	10.0 mL
5000 mM NaCl	2100 mM	8.4 mL	42.0 mL
500 mM EDTA ^z	150 mM	6.0 mL	30.0 mL
CTAB	4 %	0.8 g	4.0 g
PVP	4%	0.8 g	4.0 g
14000 mM BME	140 mM	0.200 mL	1.0 mL

^zpH 8.0

Cuadro 3.4 Iniciadores RAPD utilizados en el estudio de germoplasma de aguacate.

Iniciador ^z	Secuencia	Fragmentos de DNA detectados	Fragmentos Polimórficos (%)	Fragmentos de DNA exclusivos de cada genotipo.
A 15	5'-TTC CGA ACC C-3'	15	80.0	3
C 10	5'-TGT CTG GGT G-3'	48	83.3	8
C 13	5'-AAG CCT CGT C-3'	43	93.0	3
C 8	5'-TGG ACC GGT G-3'	51	88.2	6
E 14	5'-TGC GGC TGA G-3'	61	90.1	6
E 16	5'-GGT GAC TGT G-3'	68	94.1	4
E 18	5'-GGA CTG CAG A-3'	53	92.4	4

^zde Roth

Cuadro 3.5. Iniciadores ISSR utilizados en el estudio de germoplasma de aguacate.

Secuencia del Iniciador ^z	Fragmentos de DNA detectados	Fragmentos Polimórficos (%)	Fragmentos de DNA exclusivos de cada genotipo.
5'-(AC) ₈ YG-3'	25	80.0	5
5'-(GA) ₈ YC-3'	26	93.3	2
5'-(TCC) ₅ RY-3'	19	89.4	2
5'-(GACA) ₄ -3'	18	83.3	3
5'-(GATA) ₄ -3'	17	88.2	2

^z Productos de SIGMA Co. Y sustituye residuos C (citosina) y T (timina); R sustituye G (guanina) y A (adenina).

Cuadro 3.6 Genotipos de *Persea* y fragmentos exclusivos de DNA detectados mediante RAPD e ISSR.

Nombre designado	Especie, Raza o Parentesco	Fragmentos exclusivos de DNA detectados con RAPD	Fragmentos exclusivos de DNA detectados con ISSR
Indica	<i>Persea indica</i>	1	3
Canelillo	<i>Persea cinerascens</i>	5	0
Gigantea	<i>Persea gigantea</i>	3	0
Floccosa	<i>Persea floccosa</i>	2	1
Nubigena 1/7	Posible híbrido <i>Persea nubigena</i> x <i>Persea americana</i>	2	2
Martin Grande c	Híbrido <i>P. schiedeana</i> x <i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	1	0
ScrMer7 S1	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	2	1
Rodeo 1	<i>Persea nubigena</i>	2	1
CRM	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	3	0
Olanca2 S3	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	1	1
Tochimilco 1	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	2	1
Steyermarkii	<i>Persea steyermarkii</i>	2	0
Lino	<i>Persea shiedeana</i>	3	1
Lingue	<i>Persea lingue</i>	5	2

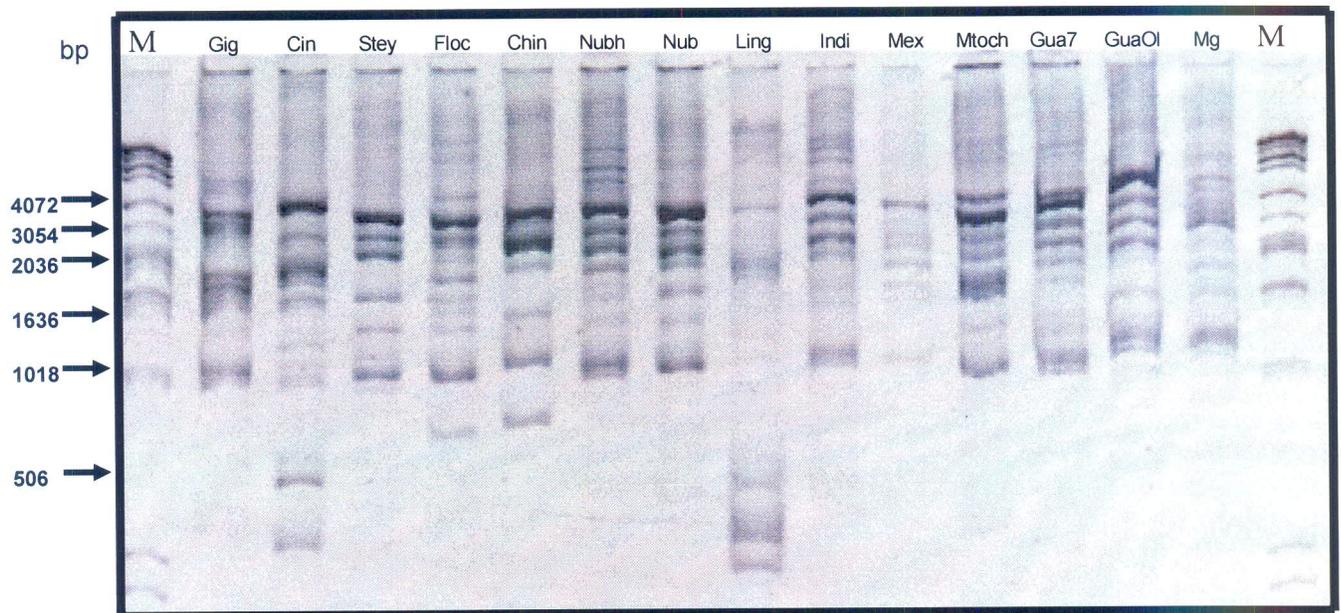


Figura 3.1 Perfiles RAPD obtenidos con el iniciador 16 de la serie E de Roth en diferentes especies del género *Persea* separados en geles de acrilamida 29:1. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

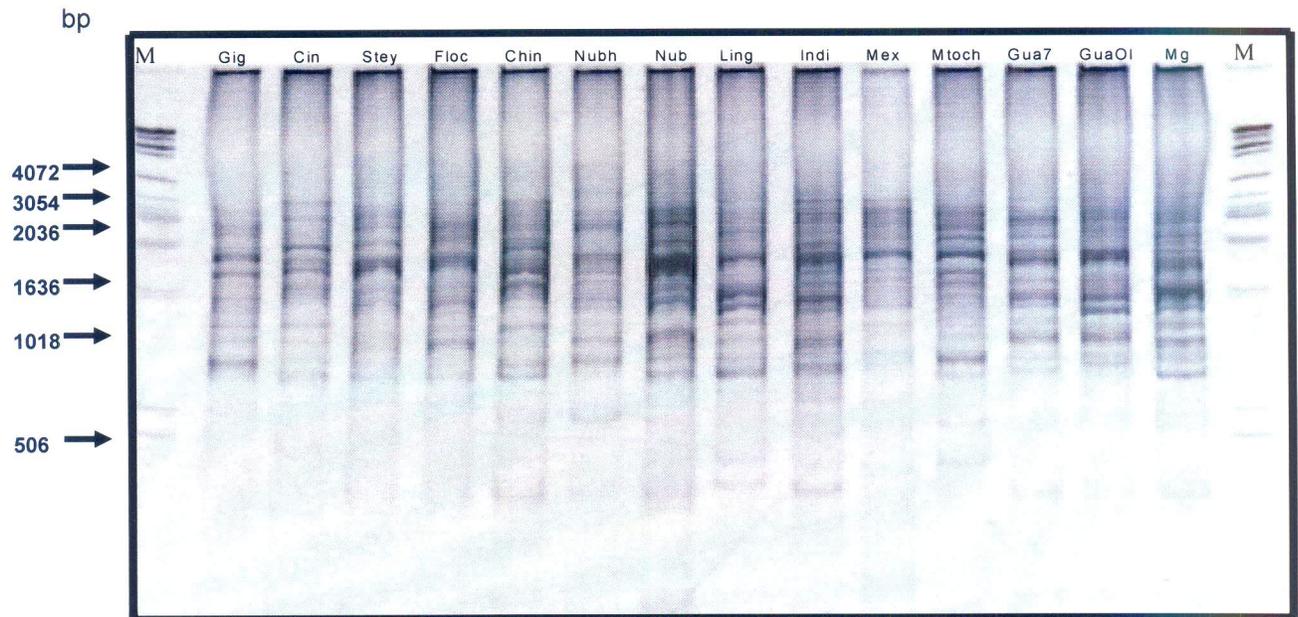


Figura 3.2. Perfiles ISSR obtenidos con el iniciador $(GA)_8YC$ en diferentes especies del género *Persea* separados en geles de acrilamida 29:1. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

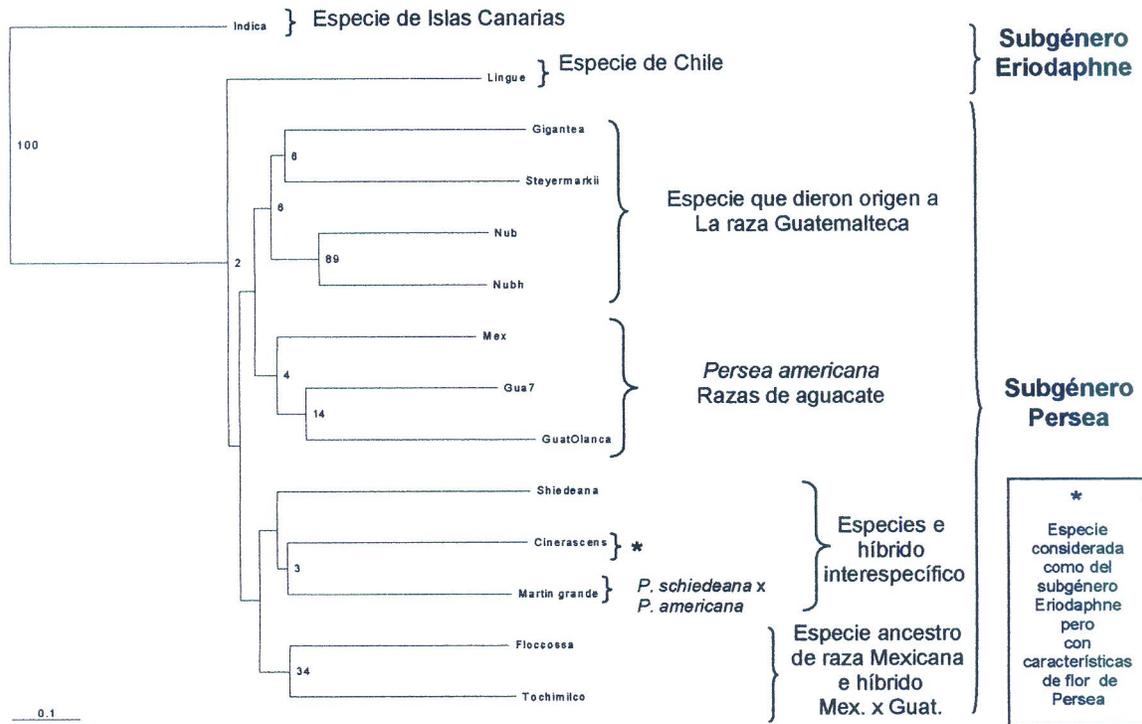


Figura 3.3 Dendrograma de 14 accesiones de aguacate obtenido con RAPD combinado las huellas de DNA obtenidas con 7 iniciadores arbitrarios de Roth (A-15, C-8, C-10, C-13, E-14, E-16 y E-18) utilizando el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”).

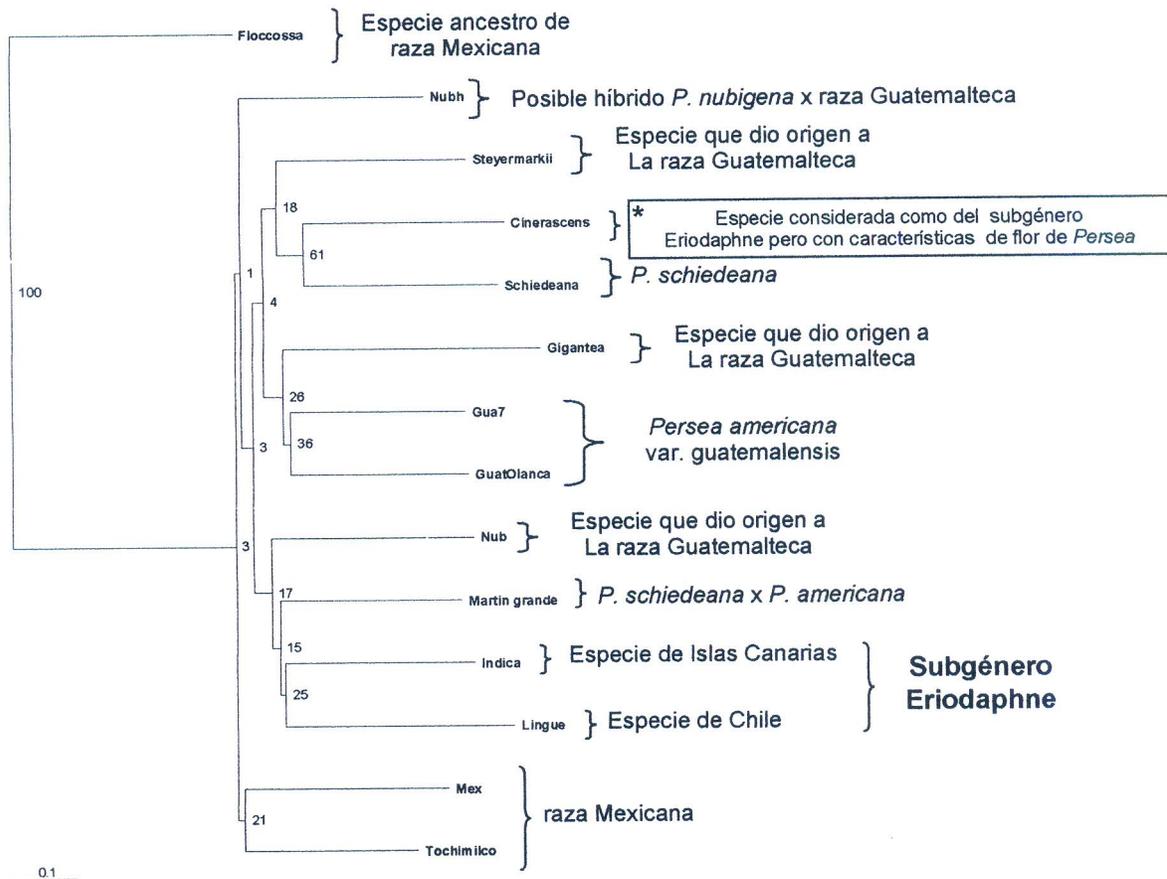


Figura 3.4 Dendrograma de 14 accesiones de aguacate obtenido con ISSR considerando un análisis estadístico combinado entre 5 iniciadores [(AC)₈YG, (GA)₈YC, (GACA)₄, (TCC)₅RY y (GATA)₄] utilizando el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”).

CAPÍTULO 4.

IV. SEPARACIÓN DE 79 ACCESIONES DEL GÉNERO *Persea* USANDO POLIMORFISMOS DE DNA OBTENIDOS CON RAPD e ISSR

RESUMEN

En la actualidad la reclasificación de especies de *Persea* subgénero *Persea* está en discusión, en tanto las técnicas moleculares de análisis de DNA ofrecen la posibilidad de distinguir las inter e intra específicamente, siendo esta una estrategia adecuada para conocer la diversidad de las colecciones. De tal manera que completando la parte I del estudio, en esta segunda etapa se tuvo como objetivo conocer la relación genética que guardan el resto de las accesiones de un banco de germoplasma de *Persea*; analizando 79 accesiones correspondientes a 11 especies: *Persea* sp., *Persea parvifolia*, *Persea meyeniana*, *Persea americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *Persea gigantea*, *P. floccosa* y *P. cinerascens*, utilizando las técnicas RAPD e ISSR. Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida y teñidos con sales de plata. Las huellas de DNA se analizaron mediante métodos estadísticos multivariados. Se obtuvieron dos dendrogramas con la información generada con los marcadores RAPD, ISSR. Los dendrogramas mostraron agrupamientos similares correspondientes a las tres razas de

aguacate y se encontró la separación de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*. Se distinguió a "Freddy 4", una accesión considerada dentro de la raza Antillana probablemente como miembro de *P. americana* var. *Costaricensis*.

Palabras Clave: aguacate, aguacatillos, chinini, marcadores moleculares, recursos fitogenéticos.

ABSTRACT

SEPARATION OF 79 ACCESSIONS OF THE GENUS *Persea* USING DNA POLYMORPHISMS OBTAINED BY RAPD AND ISSR

The re-classification of species of *Persea* subgenus *Persea* is actually in discussion, in the meantime the molecular techniques of analysis of DNA offer the possibility to distinguish species of *Persea* in a inter and intraspecific manner, being this an adequate strategy to know the diversity of what is collected. In such a way that completing the first part of the study, in this second part the objective was to know the genetic relationships that keep the remainder accessions of the *Persea* genebank; analyzing 79 accessions belonging to 11 species: *Persea* sp., *Persea parvifolia*, *P. meyeniana*, *P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. gigantea*, *P. floccosa* and *P. cinerascens*, using the techniques of RAPD and ISSR. Dendograms were generated for RAPD AND ISSR. The dendograms showed similar groupings,

corresponding to the three avocado races and it was found the separation of the subgenus *Persea* and *Eriodaphne*. The accession "Freddy 4", considered as of the West Indian race as a probable member of *P. Americana* var. *Costaricensis*.

Key words: Avocado, wild avocados, chinini, molecular markers, plant genetic resources.

4.1. INTRODUCCIÓN

La conservación del germoplasma del aguacate implica fases y acciones que demandan tiempo y trabajo institucional, estas etapas son; la exploración, la conservación, la caracterización y la utilización. Los bancos de germoplasma tienen la función del resguardo de los recursos colectados mediante accesiones que se conservan *ex situ*, en ellos la descripción de cada colecta involucra medición de caracteres morfológicos, análisis de la información genética mediante marcadores moleculares o marcadores bioquímicos que involucra la identificación de enzimas (Karp *et al.*, 1997). El uso de modernas herramientas genéticas ayudan en los programas de mejoramiento genético incorporando métodos moleculares que permiten un análisis sistemático de la diversidad genética en los bancos de germoplasma (Witney *et al.* 2005). En el presente estudio se hizo una caracterización de tipo molecular mediante el método RAPD e ISSR de 79 accesiones conservadas en un banco de germoplasma con la finalidad de distinguir la especie o grupo en las que se ubiquen, o presenten

mayor parentesco genómico. El presente estudio de caracterización molecular, toma como base un estudio morfológico previo que caracterizó a las accesiones de hoja, flor, fruto y semilla de cada una de ellas basados en las directrices de Barrientos-Priego *et al.* (1991), IPGRI (1995) y UPOV (2006).

Debido a que la clasificación actual del aguacate presenta controversias de ubicación para muchos casos, el presente estudio sin consistir en un análisis de taxonomía, pretende orientar la ubicación de las accesiones en agrupamientos que incluye como referencia a 11 especies del género *Persea*, y trata de ponderar el grado de similitud o parentesco entre ellos. van der Werff (2002) identificó a las especies nuevas *P. albiramea* van der Werff, *P. brevipetiolata* van der Werff y *P. laevifolia* van der Werff e indica que la variabilidad genética en aguacate se debe a los procesos de selección y cultivo que el hombre le ha hecho a través de los años y difiere con la clasificación de Kopp (1966) quien reconoció a dos subgéneros dentro del género *Persea*; subgénero *Persea* y *Eriodaphne*. Sin embargo, algunas dificultades en la clasificación de las variedades de aguacate se debe además de la influencia del hombre, a que su progenie es extremadamente variable (Gama-Campillo, 1994), esta autora realizó un estudio relacionado con iconografía, etnobotánica, lingüística y acontecimientos históricos de las especies expuestas a las relaciones planta-humano y realizó un estudio sistemático que intentó ayudar a proponer una reclasificación taxonómica. Campos *et al.* (2007) mediante estudios heurísticos y de parsimonia (consistentes en la búsqueda de adecuaciones mas apropiadas a las teorías que reclasifican actualmente al género *Persea*) y basándose en

caracteres morfológicos, propone algunas adecuaciones de reclasificación al género *Persea* sugiriendo que no es un grupo monofilético y que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* deberían reconsiderarse como géneros independientes.

Gama-Campillo (1994), en su estudio sugiere también que el aguacate había sido usado por las poblaciones indígenas durante tiempos considerables antes de la llegada de los descubridores europeos. Smith (1966) ubicó aproximadamente entre 7000 – 8000 a.c. la evidencia mas antigua del consumo de aguacate por parte de los pobladores en cuevas localizadas en la parte central de México; a la par, en los valles de Oaxaca hay evidencias de su consumo y posible selección hacia los años 4000 a 2800 a.c. A mediados del siglo XVI el aguacate ya era cultivado por pobladores de México y del Perú en los tiempos de la conquista por los españoles (Popenoe, 1963; Storey *et al.*, 1986).

Hoy en día resulta poco claro el origen de muchos genotipos; por ejemplo, la cantidad y tipo de especies silvestres y/o cultígenos (plantas desarrolladas en cultivo o domesticación) que fueron los progenitores de las razas o variedades actuales. Storey *et al.* (1986) y Williams (1976), sugirieron que las condiciones topográficas, las barreras climáticas y lo voluminoso del tamaño de semilla, limitaron la mezcla de razas que se mantenían hasta antes de que se descubriera el océano pacífico por el año 1513, hoy en día las razas se translapan en muchas regiones de América, y numerosas colectas hacen

constatar lo anterior haciendo evidente una actual introgresión racial (Ashworth y Clegg 2003). El hábito de floración y polinización cruzada del aguacate es otro factor que dificulta conocer el pedigree de los cultivares y razas actuales, aunado con su forma prolífica y poco amarre de fruto, dejando un difícil legado a los estudios taxonómicos con una confusión de genotipos con afinidades inciertas y poco comprobables y una amplia difusión de razas y genotipos.

Ashworth and Clegg (2003) documentaron inicialmente el uso de un amplio número de marcadores de microsatélites para tratar de discernir la genealogía entre 35 cultivares y portainjertos de *P. americana* y dos parientes silvestres, asumiendo que los microsatélites son marcadores genéticos mas versátiles que combinan útilmente la alta variabilidad, la herencia codominante y el alto grado de reproducibilidad, su codominancia los hace apropiados en descifrar el dilema de la paternidad por el confuso desplazamiento del polen, además de ser abundantes y estar muy distribuidos a lo largo de todo el genoma.

Davis *et al.* (1998) inicialmente estudiaron mediante RFLP las relaciones genealógicas de 36 aguacates cultivados con el objetivo de discernir el parentesco y relaciones genéticas, visto esto como una posibilidad de obtener información útil para diseñar una estrategia de mejoramiento genético, así como una mejor y efectiva forma de conservación de germoplasma. En este estudio se lograron separar tres conglomerados correspondientes a 3 razas; Mexicanos, Antillanos y Guatemaltecos, así como a un grupo interesante de híbridos como; 'Hass', 'Gween' y 'Fuerte'.

La clasificación taxonómica mas generalizada señala que el aguacate pertenece al género *Persea* que se divide en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodhapne*, cuya principal forma de distinción es la pubescencia de la cara interior de los sépalos; *Persea* tiene ambas caras pubescentes y en *Eriodhapne* la cara interna es sin pubescencia, con la excepción de *Persea pallida*, *Persea rigens* y *Persea cinerascens* (Barrientos *et al.* 2000). El aguacate cuya especie es *Persea americana* Mill. pertenece al subgénero *Persea*, que se conoce como el de los verdaderos aguacates y que son de un tamaño mayor que los del otro subgénero; además del aguacate, se encuentran en este grupo: *Persea nubigena* (aguacate de monte), *Persea steyermarkii* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (chinini, chinene, chenene, yas, hib), *Persea floccosa* (aguacate cimarrón) (Barrientos *et al.* 2000). En este subgénero se ha incluido a *Persea parvifolia* (aguacatillo de Veracruz, México) y *Persea primatogena* (guaslipe de Nicaragua), este último reclasificado como género diferente al del aguacate llamado *Beilschmiedia*. Recientemente se ha propuesto la incorporación de *Persea tolimanensis* (aguacate de mico) y *Persea zentmyerii* de Guatemala a este subgénero (Barrientos *et al.* 2000). Por otra parte se ha encontrado en la región de Motozintla, Chiapas, al parecer una nueva especie que está más cercana a la raza Guatemalteca que *Persea nubigena* y *Persea steyermarkii*, además de otros tipos como los de la región de Monte Verde, Costa Rica, que al parecer son del subgénero *Persea*. Todas estas especies se encuentran localizadas en Meso América, principalmente en México y Guatemala (Ben-Ya'acov *et al.*, 1992; Barrientos *et al.*, 2000).

Se conocen tres razas de aguacate; Mexicana, Guatemalteca y Antillana. La clasificación botánica de esas razas ha sido diversa y se les considera dentro

de *Persea americana* Mill. Se ha realizado una clasificación muy acertada de las razas de aguacate, agrupando a la raza Mexicana como la variedad botánica *drymifolia* (*Persea americana* var. *drymifolia*), la raza Guatemalteca como var. *guatemalensis* (*Persea americana* var. *guatemalensis*) y la raza Antillana como var. *americana* (*Persea americana* var. *americana*). También se ha encontrado que las razas; Mexicana, Antillana y Guatemalteca son genéticamente diferentes al emplear análisis de marcadores genéticos de DNA mediante la técnica de RAPD (amplificación al azar de DNA genómico) encontrando una adecuada separación y confirmando distante a la especie *P. shiedeana* (Buffler y Fiedler, 1996; Fiedler *et al.*, 1998).

El estudio se realizó teniendo como objetivo caracterizar y diferenciar el perfil molecular de las accesiones de aguacate que comprenden un banco de germoplasma mediante análisis tipo RAPD e ISSR.

4.2. MATERIALES Y METODOS

En el presente estudio se evaluó un total de 79 accesiones correspondientes a 11 especies (Cuadro 4.1): *Persea* sp., *Persea parvifolia*, *Persea meyeniana*, *Persea americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *Persea gigantea*, *P. floccosa* y *P. cinerascens*, provenientes del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. localizado en Coatepec Harinas, México.

Cuadro 4.1 Setenta y nueve genotipos de *Persea* analizados con RAPD e ISSR.

	Origen de la muestra	Nombre del genotipo	Registro en el lote	Raza o parentesco
1	Veracruz	<i>Persea</i> sp		<i>Persea</i> sp.
2	Veracruz	Parvifolia		<i>P. parvifolia</i>
3	Veracruz	Cinerascens		<i>P. cinerascens</i>
4	Chile	Meyeniana		<i>P. meyeniana</i>
5	Veracruz	Floccosa H		<i>P. chamisonis</i>
6	Israel (Veracruz)	Floccosa	10	<i>P. floccosa</i>
7	Chile	Lingue	32	<i>P. lingue</i>
8	Guatemala	Shiedeana-Otrabanda2	17	<i>P. shiedeana</i>
9	Honduras	Shiedeana-Yaruche3	227	"
10	Honduras	Shiedeana-LinoTB	45	"
11	Israel (Guatemala)	Nubigena 1/7		<i>P. nubigena</i>
12	Chiapas	Steyermarkii	232	<i>P. steyermarkii</i>
13	Israel (Guatemala)	Gigantea		<i>P. gigantea</i>
14	Israel (Veracruz)	Antigua	14	<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>
15	Costa Rica	Nubes	104	Posible <i>P. costaricensis</i>
16	México	Tetiz	77	"
17	Costa Rica	Marichal	102	"
18	México	Tetiz	79	"
19	México	144PLCTetiz1	79	"
20	México	Olanca2S3	80	<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
21	Guatemala	Miramundo	55	"
22	México	Olanca		"
23	Guatemala	Palestre	34	"
24	México	Larrainzar1	54	"
25	Guatemala	Teni	56	"
26	México	SnCrMer7s1	60	"
27	México	Comcar1	33	"
28	México	SnCrMer4S2	61	"
29	México	Olanca2s3	89	"
30	México	AmatenangoS1	94	"
31	México	SnCrMer7S1	203	"
			19	<i>P. shiedeana</i> x <i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
32	Estados Unidos (Guatemala)	M. Grande		"
34	México	230 ptb	51	"
35	Costa Rica	Cima de copey	78	Posible <i>P. costaricensis</i>
37	México	24 ptb	87	"
36	Costa Rica	Freddy 4	167	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>
33	California	Duke 7		"
38	Israel	Ettinger	99	"
39	México	La Meza	185	"
40	Chile	Negra LaCruz	221	"
41	Chile	Fuerte negro	223	"
42	México	Tepetl	46	"
43	México	Lonjas		"
44	México	Vargas	65	"
45	México	P. negro		"
46	México	Ixtapan del O.	138	"
47	México	Telez1	38	"
48	México	Mantequilla	137	"
49	México	Almoloja c	28	"
50	México	Timbinal S1	43	"
51	México	Pahua negro	184	"
52	Ecuador	Guay1	41	"
53	México	Portainj	98	"

	Origen de la muestra	Nombre del genotipo	Registro en el lote	Raza o parentesco
54	México	SnCrMer 7S2	63	"
55	México	SAg Negro	96	"
56	México	SnCrMer 1S5	64	"
57	México	CRM	97	"
58	México	Temascaltepec 3S4	73	"
59	México	Malinaltenango	84	"
60	México	Pintle2	86	"
61	México	S. Lonjas	90	"
62	México	S.ParqueTimb	91	"
63	México	S.Ag. negro	96	"
64	Ecuador	Guayll	157	"
65	México	Tlacolula 3S2	161	"
66	México	Larrainzar	172	"
67	México	Tlacolula86	177	"
68	México	AquijicS3	178	"
69	México	Pahua verde	182	"
70	México	Almolya	183	"
71	México	Ag. Negro	188	"
72	México	Mantequilla	191	"
73	México	Amaten S4	202	"
74	México	Tochimilco1	209	"
75	México	Tochimilco3	210	"
76	México	Tochimilco4	211	"
77	México	Tochimilco5b	214	"
78	México	Principe negro	216	"
79	México	Aquijic	220	"

4.2.1. Extracción de DNA

La extracción del DNA de hojas frescas se basó en el método del CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Copyright Prof. Dr. Kurt Weising, University of Kassel, Germany: basado en los protocolos de Saghai-Marroof *et al.* (1984), Modificado por Rogers y Bendich (1985), Doyle y Doyle (1987) y Clarke *et al.* (1989) el cual fue adaptado para aguacate en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Autónoma Chapingo y complementado con el procedimiento realizado por Álvarez-García (2002) en el laboratorio de biotecnología de INIFAP en Uruapan, Michoacán. Los perfiles moleculares de las especies fueron analizados utilizando las técnicas RAPD e ISSR.

4.2.2. Protocolo de extracción

Se colectaron de 2 a 3 segmentos de hojas (1.0 cm cada uno) jóvenes por muestra (200 mg) y se colocaron en tubos de plástico eppendorf de 2.0 mL. Las muestras se almacenaron en una hielera mientras se transportaban al laboratorio. En un mortero se molieron las muestras adicionando nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino y se agregó 1.0 mL de la solución extractora indicada en el cuadro. Se incubó el extracto en baño maría entre 30 a 45 minutos a 60 °C. Se agitó suavemente cada 15 minutos, posteriormente se destaparon los tubos y se dejaron enfriar durante 5 min. Se agregó 1 mL de la mezcla cloroformo-octanol (24:1) mezclando suavemente de 5 a 10 minutos y se centrifugó a 3200 rpm, por 10 minutos. Se transfirieron 600 µL de la fracción acuosa a tubos eppendorf de 2.0 mL. Se agregaron 500 µL de la mezcla cloroformo-octanol (24:1). Se mezcló suavemente de 5 a 10 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 3200 rpm. Se transfirió la fase acuosa (500 µL) a tubos nuevos. Se agregaron 15 µL de RNAsa (10 mg·µL⁻¹) e incubó por 30 minutos a 37 °C (se recomienda hervir la RNAsa durante 10 minutos previo uso). Se agregaron 75 µL de 5 M NaCl y 750 µL de etanol absoluto frío. Se colocaron los tubos a -80 °C por 30 minutos y centrifugaron durante 15 minutos a 3200 rpm. Se decantó el etanol y NaCl, se secaron los tubos invirtiéndolos durante 30 minutos. La pastilla de DNA se resuspendió sobre 150 µL de solución TE y se almacenó la muestra a 4 °C hasta su uso. Los componentes del amortiguador de extracción se muestran en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2 Soluciones del amortiguador de extracción utilizado.

Componente	Concentración final	20 mL	100 mL
d H ₂ O		1.4 mL	17.0 mL
1000 mM Tris ^z	100 mM	2.0 mL	10.0 mL
5000 mM NaCl	2100 mM	8.4 mL	42.0 mL
500 mM EDTA ^z	150 mM	6.0 mL	30.0 mL
CTAB	4 %	0.8 g	4.0 g
PVP	4%	0.8 g	4.0 g
14000 mM BME	140 Mm	0.200 mL	1.0 mL

^zPH 8.0

4.2.3. Procedimiento de la PCR

Mediante la técnica de PCR se sintetizaron fragmentos específicos de DNA con la finalidad de detectar diferencias en el genoma de hojas de aguacate. Se utilizaron los siguientes programas de termociclaje para RAPD e ISSR respectivamente: Para RAPD se utilizó el equipo Gene Amp ® PCR System 2700 AB Applied Byosystems (Figuras 4.1 y 4.2), y para ISSR se utilizó el equipo; Gene Amp ® PCR System 9700 AB Applied Byosystems.

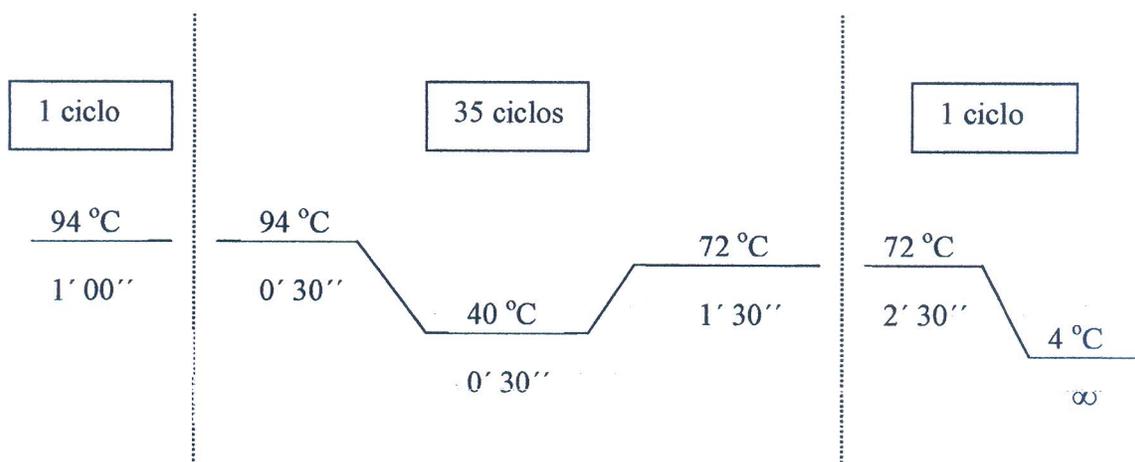


Figura 4.1 Programa de termociclaje utilizado para RAPD

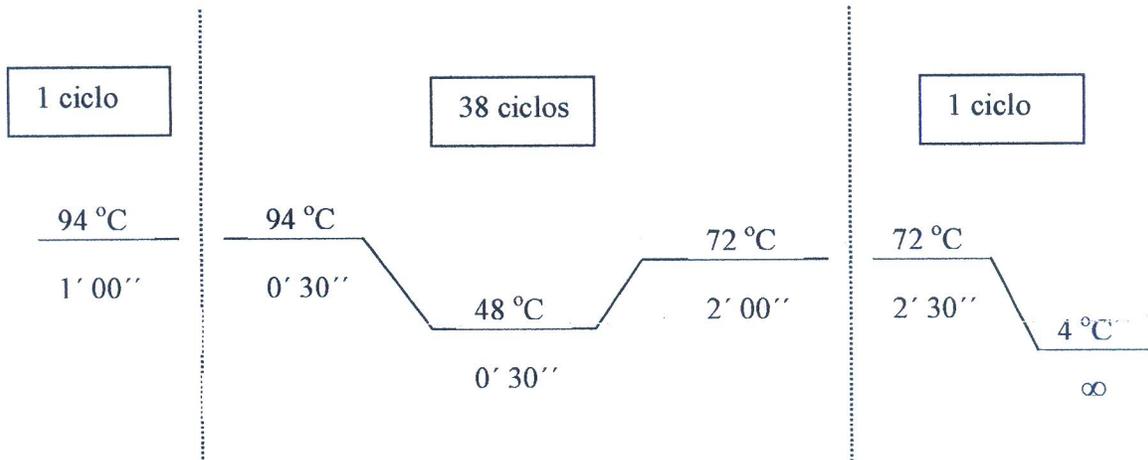


Figura 4.2 Programa de termociclaje utilizado para ISSR

Los componentes de reacción para el análisis tipo RAPD se colocaron en tubos eppendorf de 500 μL conteniendo cada uno 25 μL de los siguientes componentes; 5 μL de DNA [$20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$], 0.3 μL de enzima *Taq* DNA polimerasa [$5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$] (Fermentas), 10 μL de dNTPs [$500 \mu\text{M}$], 2.5 μL Amortiguador *Taq* [1x], 2 μL de MgCl_2 [25 mM], 2 μL de Primer y 3.2 μL de agua.

Los componentes de reacción para el análisis tipo ISSR fueron los mismos que se utilizaron para RAPD solo que en este caso se utilizaron; 2.5 μL de DNA [$20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$] y 3 μL de MgCl_2 [25 mM].

Se utilizaron ocho iniciadores para el caso de RAPD y seis para ISSR (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3 Iniciadores utilizados en la amplificación de DNA con RAPD e ISSR.

Iniciadores	Secuencia
RAPD	
A-15 ^z	5'-TTC CGA ACC C-3'
C -08	5'-TGG ACC GGT G-3'
C-10	5'-TGT CTG GGT G-3'
C -13	5'-AAG CCT CGT C-3'
E -7	5'-AGA TGC AGC C-3'
E -14	5'-TGC GGC TGA G-3'
E -16	5'-GGT GAC TGT G-3'
E -18	5'-GGA CTG CAG A-3'
ISSR	
DBDA (CA) ₇	
Micro Anch 6	5'- ACGACAGACAGACAGACA -3'
(AC) ₈ Y G	5'- ACACACACACACACACYG -3'
(GA) ₈ Y C	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAYC -3'
(TCC) ₅ R Y	5'- TCCTCCTCCTCCTCCRY -3'
(GACA) ₄	5'- GACAGACAGACAGACA -3'

^z de Roth

Y= C+T, R = A+G

4.2.4. Elaboración de geles

Los productos amplificados de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (29:1) 8 %. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 2.5 µL de la mezcla del producto de la reacción de PCR agregando 1 µL de buffer de carga orange blue 6x 6190 A de Promega. Como referencia se utilizó el marcador 1 kb de Gibco. Los geles se corrieron a 280 voltios aproximadamente por 2.5 h en amortiguador TBE 1X y se tiñeron con AgNO₃ 0.2 % de acuerdo al protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2000). Para la documentación de las huellas de DNA se utilizó el sistema Kodak Digital Science 1D V.2.0.3 (Figuras 4.3 y 4.4).

4.2.5. Análisis estadístico de la Información

Se determinó el número de bandas o polimorfismos de cada genotipo que fueron visualizados en los geles de acrilamida para cada iniciador; con estos datos se generó una matriz binaria 1 y 0; donde el 1 indicó la presencia de una banda de DNA particular en una muestra y el 0 representó la ausencia de dicha banda en aquellas muestras que no la presentaron.

Mediante los perfiles de bandas obtenidos en los geles se elaboró una matriz básica de datos para cada iniciador. Para el estudio de similitud entre los datos generados, se construyó un dendograma con el método Neighbor-joining y el criterio de distancias de similitud Jaccard con un remuestreo ("Bootstrapping") de 1000 repeticiones en el programa Free Tree versión 0.9.1.50 (Pavlíèek *et al.* 1999). Se obtuvo el árbol de consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir *et al.* 2001); para visualizar el árbol obtenido se utilizó el programa Tree View 1.6.6.

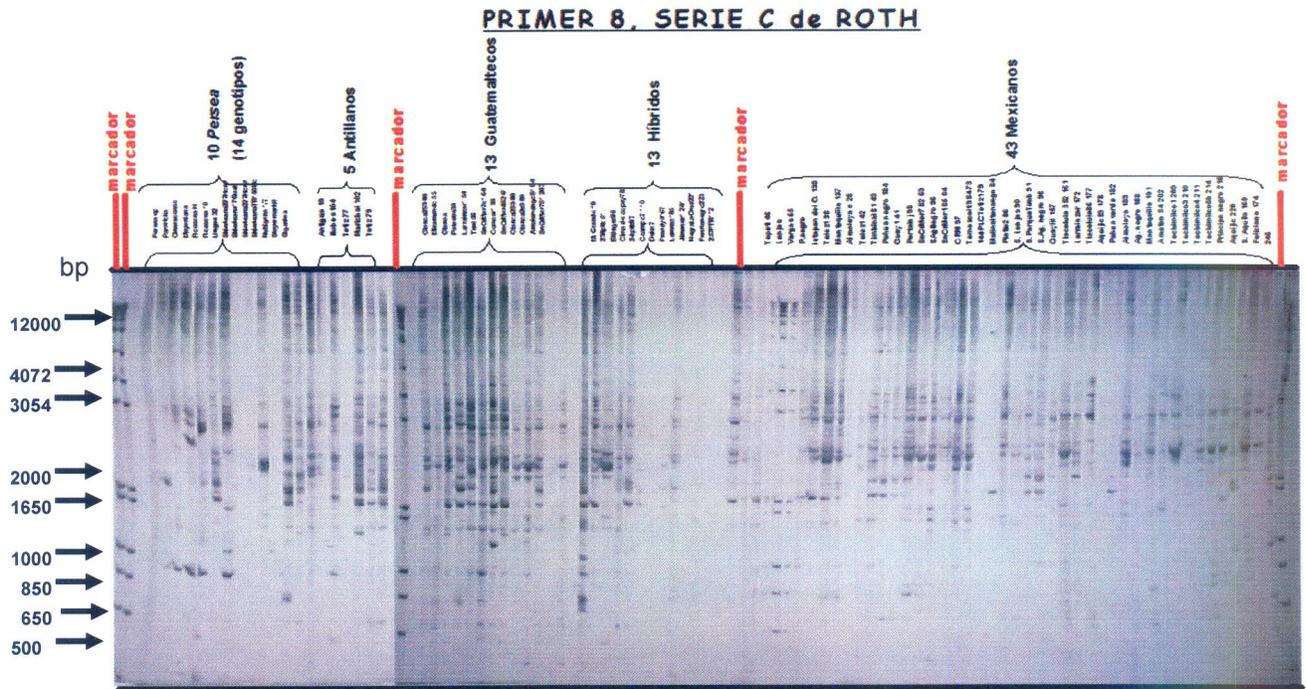


Figura 4.3 Ejemplo de gel de poliacrilamida correspondiente a RAPD de 88 genotipos de *Persea*.

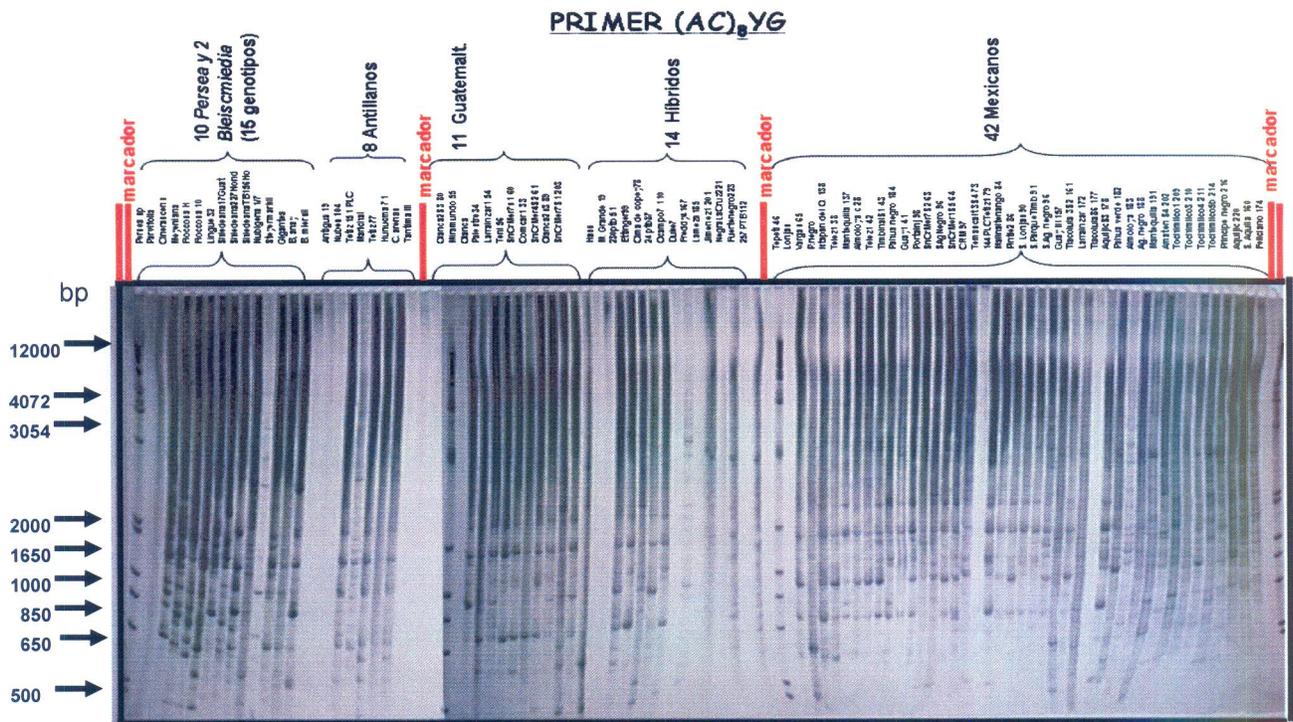


Figura 4.4 Ejemplo de gel de poliacrilamida correspondiente a ISSR de 90 genotipos de *Persea*.

4.3. RESULTADOS

Los iniciadores empleados para amplificar los fragmentos de DNA mediante la PCR permitieron la distribución de un gran número de bandas generadas por las técnicas RAPD e ISSR. El análisis que generó mayor abundancia de bandas fue RAPD con un total de 190 en 73 genotipos, lo que permitió la elaboración de una matriz básica de con 13,870 caracteres. En el caso de ISSR se generaron menor número de bandas, 111 en total, obteniéndose 8,103 caracteres.

Se encontró un reducido número de bandas tipo RAPD exclusivas en los genotipos; 'Cima de Copey', Lingue 32, Meyeniana y Cinerascens. Mientras que con ISSR no se obtuvieron bandas únicas (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4 Genotipos de *Persea* que presentaron bandas exclusivas con RAPD.

Nombre designado	Especie, raza o parentesco	Fragmento exclusivo de DNA obtenido con RAPD
Cima de Copey	<i>Persea costarricensis</i> (probable)	1
Lingue 32	<i>Persea lingue</i>	3
Meyeniana	<i>Persea meyeniana</i>	2
Cinerascens	<i>Persea cinerascens</i>	1

Los análisis RAPD indicaron que 12 genotipos correspondientes al subgénero *Persea*, presentaron la mayor distancia genética entre ellos (1.0); estos fueron; Shiedeana Otrabanda, 156 TB, Duke 7, Freddy 4-162, Lonjas, S. lonjas 90, S.Ag.Negro 96, Guay III 157, Tlacolula 3S2 161, Pahua verde 182, Tochimilco1

209 y Tochimilco 3 210. En tanto que los más cercanos con una distancia genética de 0.43 resultaron ser Olanca y Larrainzar 1 54, ambos de Chiapas y pertenecientes a la raza Guatemalteca.

Mediante ISSR en el subgénero *Persea*, la mayor distancia genética fue de 1.0 y se observó entre los genotipos; Freddy 4 167, Fuerte negro 223, 144PLC Tetiz 1 79 y Tochimilco 3 210. En tanto que una mayor cercanía con una distancia de 0.33 se presentó entre los genotipos; Lonjas 90 y Pintle 2 86, de Michoacán y Puebla, respectivamente y pertenecientes a la raza Mexicana.

Mediante el dendograma generado para RAPD (Figura 4.5), se obtuvieron dos ramas principales, correspondientes a los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, este último comprende a las especies *Lingue* 32, *Cinerascens*, *Meyeniana*; además de al muy probable *P. chamisonis*. Luego aparecen dos grandes grupos a partir de la rama del subgénero *Persea*; el primero agrupa a accesiones Guatemaltecas con Antillanos, el segundo grupo es de Mexicanos, pero comprendió cuatro subgrupos de mexicanos; I, II, III y IV, así como híbridos entre Guatemaltecos y Mexicanos.

Tratándose del subgénero *Persea* se encontraron cuatro agrupamientos de la Raza Mexicana (*P. americana*, var. *Drymifolia*) analizados con RAPD que se pueden apreciar en la Figura 4.5; pero de forma más específica en la Figura 4.6. Estos agrupamientos se derivaron de la rama del subgénero *Persea*, distribuyéndose de la siguiente manera: El subgrupo I contiene a 25 genotipos

donde destacan los de San Cristóbal de las Casas (SnCrMer), Olanca y Amatenango de Chiapas, de Tochimilco, Puebla, dos genotipos de Tlacolula, Oaxaca, y algunos del Estado de México; Almoloya, La Meza, Mantequilla, Principe y Pahua negro principalmente. El subgrupo II comprende a 6 genotipos denominados especiales por corresponder a frutos grandes de calidad comercial entre ellos a los provenientes de Chile; Fuerte Negro y Negra La Cruz, así como a las variedades de criollos regionales de México; Lonjas, Vargas, Pahua negro y Pahua verde. Los subgrupos III y IV comprenden a genotipos muy parecidos, destacando a las accesiones; Guay I y Guay III de Ecuador que son mexicanos típicos nativos, en el subgrupo IV se agrupa a Tepetl que es un portainjerto promisorio con posible tolerancia a *Phytophthora cinammomi*, comprende también a mexicanos segregantes del Grupo I tales como; S Aguacate negro, S Lonjas, entre otros originarios del estado de México. Entre los subgrupos de mexicanos, en una derivación separada se destaca la presencia de 4 especies distintas; *Persea parvifolia*, *P. shiedeana*, *P. costarricensis* y *Persea* sp., éste último es un *Persea* raro no identificado aún; lo anterior sugiere el grado de hibridación posible relacionado con esta raza, lo que se discute posteriormente.

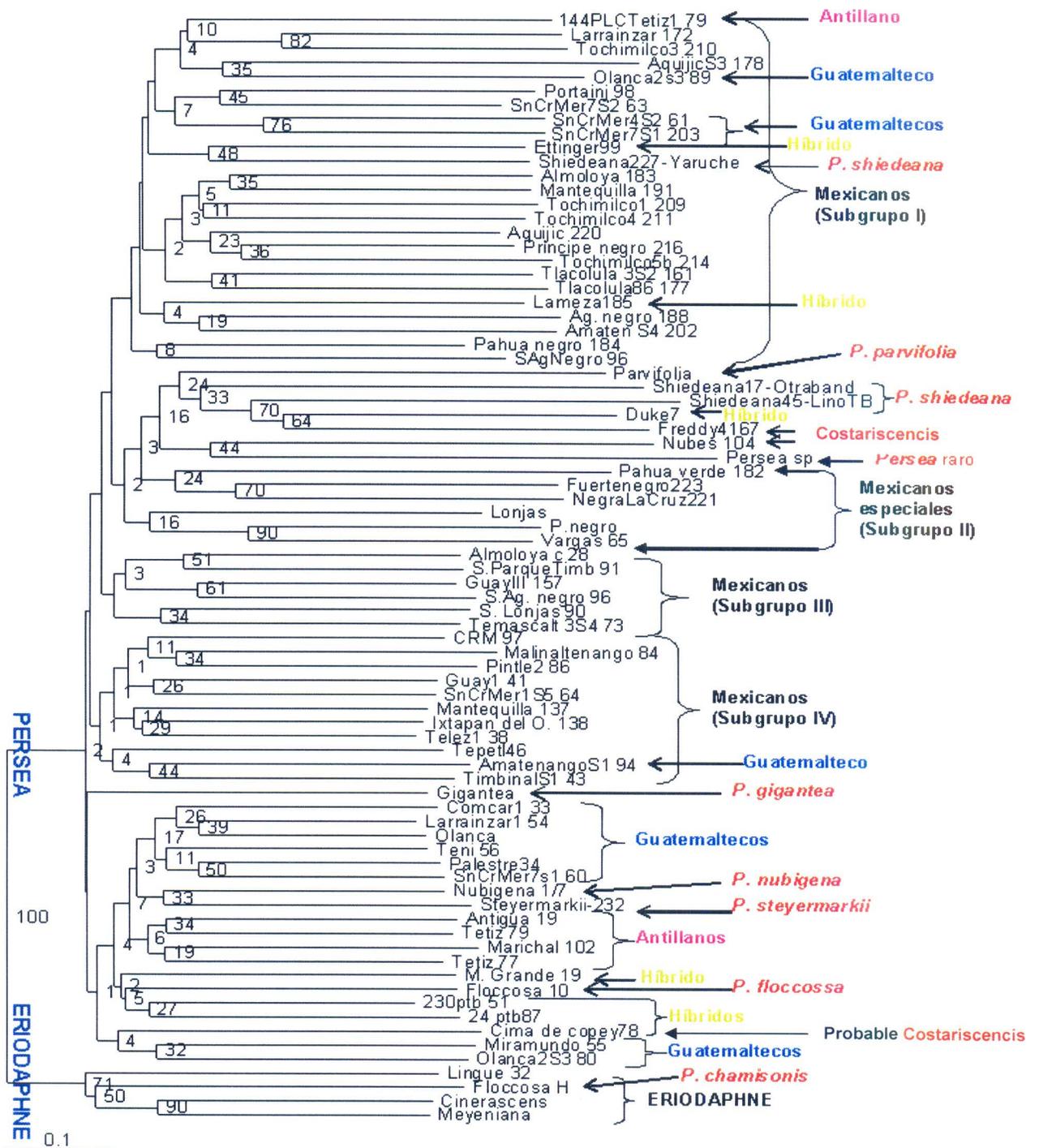


Figura 4.5 Dendrograma que agrupa a 79 accesiones de *Persea* caracterizadas con 8 iniciadores para RAPD. El agrupamiento se realizó con el índice Jaccard y la distancia Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones.

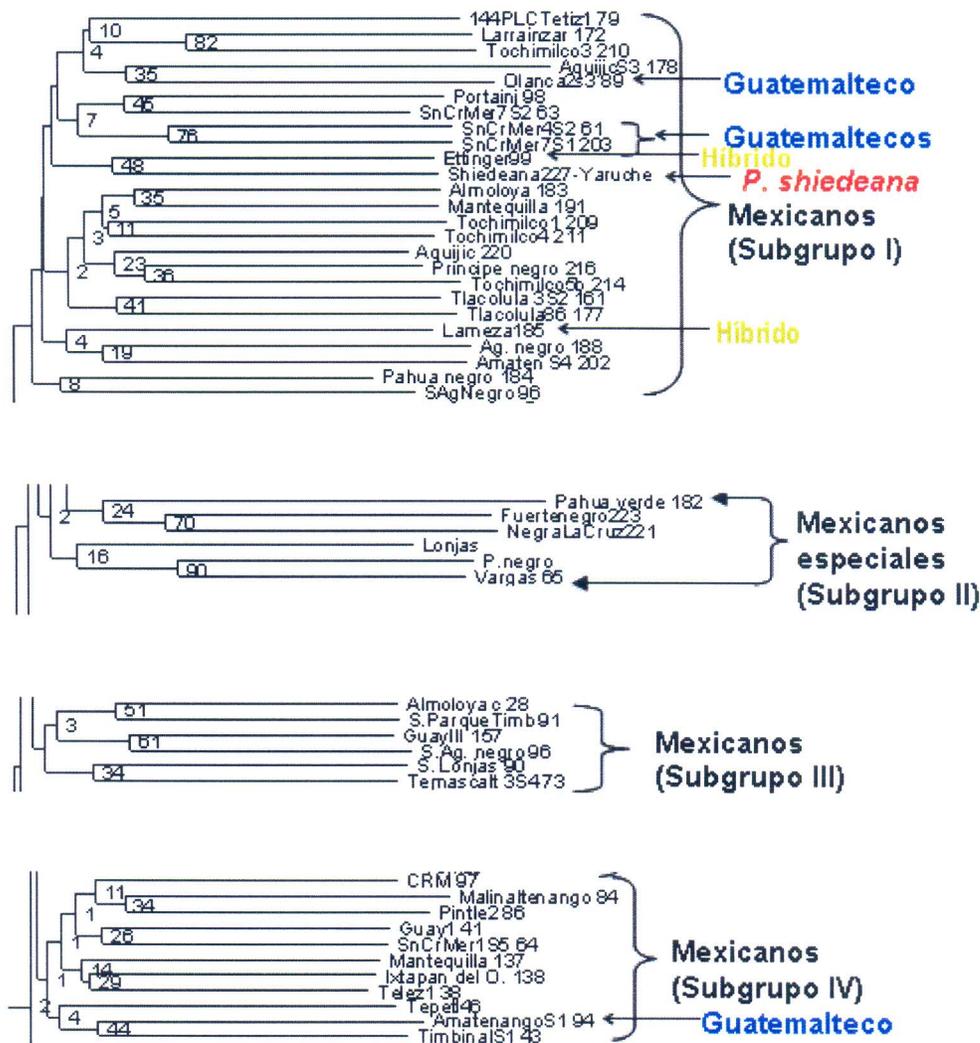


Figura 4.6 Agrupamientos correspondientes a *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana).

El dendrograma construido con la información obtenida de ISSR no contuvo el mismo número de accesiones utilizadas en RAPD, debido a las dificultades que durante el proceso de extracción de DNA se presentaron.

De manera general este dendrograma (Figura 4.7), permitió tener una agrupación congruente solamente en los últimos estratos de las ramificaciones.

De hecho el subgénero *Eriodaphne* (*P. lingue*, *P. meyeniana*, probable *P. chamisonis*, *P. cinerascens*, *P. Parvifolia*) se agrupó junto a un grupo definido de especies como *P. schiedeana*, *P. gigantea*, *P. nubigena* y *P. steyermarkii*, en el caso de estos dos últimos considerados como especies ancestrales que originaron a la raza Guatemalteca. Este conjunto de especies que se mencionaron al haberse agrupado muy cercanamente con *Eriodaphne* difieren del resto de las ramificaciones que comprendieron a *Persea americana*. *P. americana* se dispersó en pequeños subgrupos de genotipos pertenecientes a las razas Mexicana, Antillana y Guatemalteca.

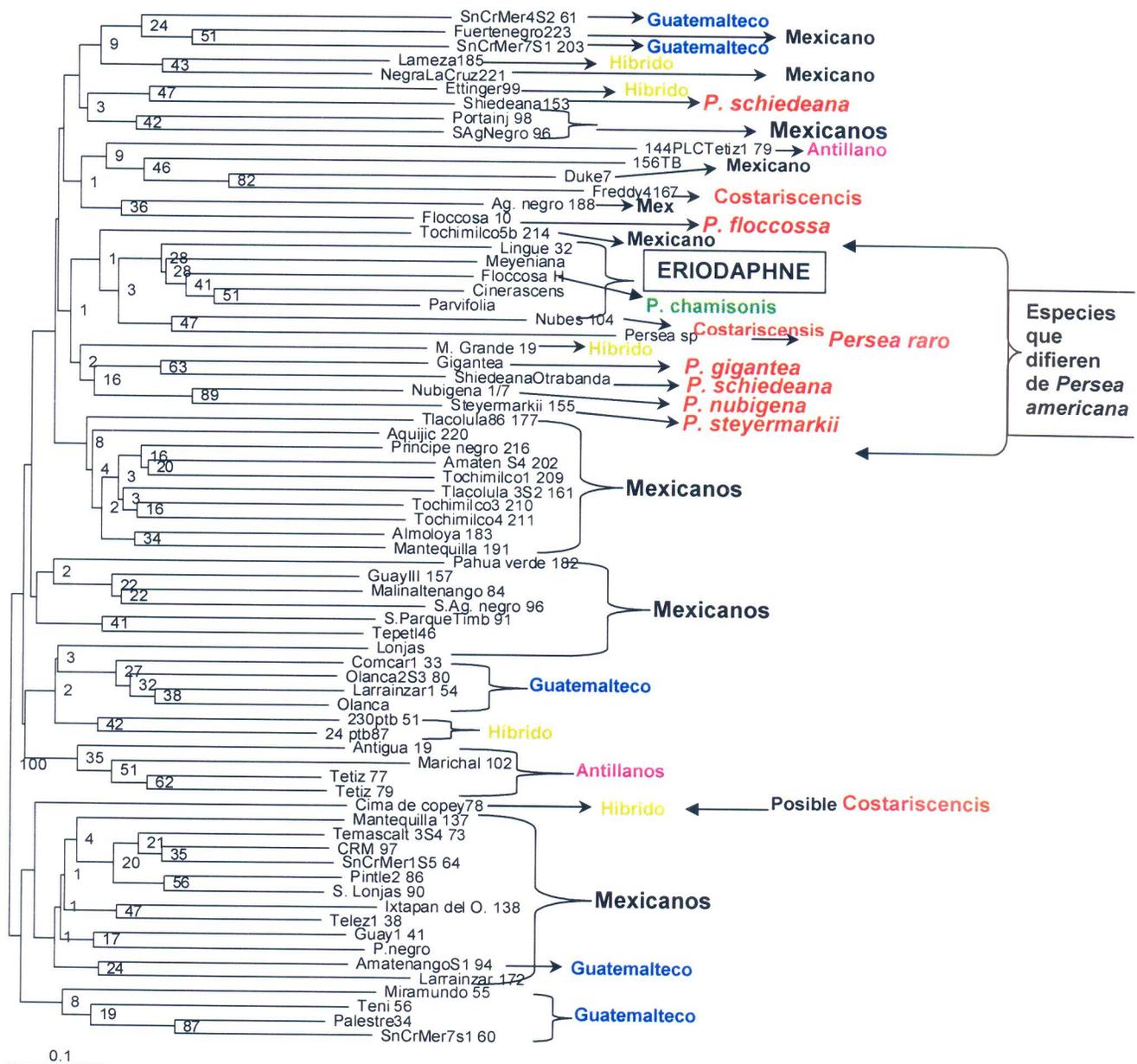


Figura 4.7 Dendrograma que agrupa a 72 accesiones de *Persea* caracterizadas con 5 iniciadores para ISSR. El agrupamiento se realizó con el índice Jaccard y la distancia Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones.

4.4.1. RAPD

El primer agrupamiento separa claramente a 2 grandes grupos (Figura 4.5); correspondientes a los subgéneros *Eriodaphne* y *Persea*, el subgénero *Eriodaphne* consiste de las accesiones mostrados de manera mas específica en la Figura 4.8 tomada del dendograma original, estas són; *P. lingue* 32 (*P. lingue*), *Floccosa* H (*P. chamissonis*), *cinerascens* (*P. cinerascens*) y *Meyeniana* (*P. meyeniana*).

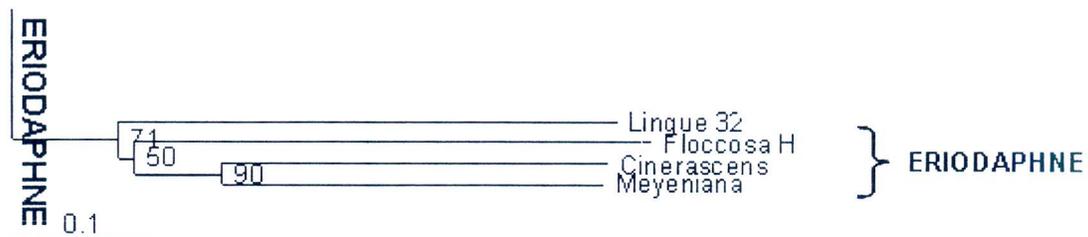


Figura 4.8 Agrupamiento correspondiente al subgénero *Eriodaphne*.

El subgénero *Eriodaphne*, alberga al grupo de los aguacatillos, entre ellos *P. cinerascens*, Colectado en Tacámbaro, Michoacán, al individuo *Floccosa* H que se suponía que era *P. floccosa*, pero actualmente se sugiere que se trata de *P. chamissonis* colectado en Huatusco, Veracruz en bosques silvestres. También se ubicó además a *P. meyeniana* y *P. lingue*, ambos colectados en Chile (Ben-Ya`acov *et al.*, 1995).

Persea sp. denominado "raro" es una especie colectada en Veracruz, se le ha atribuido este sobrenombre por sus atributos morfológicos diferentes de hoja; sin embargo, se ubicó dentro del subgénero *Persea* (Figura 5), aunque por las características del fruto claramente es del subgénero *Eriodaphne*. Esta colecta podría estar más relacionada con *Persea* nativos discutidos por Williams (1976); *Persea parvifolia* encontrado en Veracruz y descrito por este autor y que en la actualidad se encuentra en peligro de extinción en esta zona. Lorea-Hernández (2005) describió a dos nuevas especies de *Persea*; *P. chrysantha* y *P. obscura*, estas especies localizadas a 2200 msnm en los bosques mesófilos y de encinos húmedos en la sierra de Guerrero, la primera y la segunda en los bosques mesófilos de San Miguel Chimalapa, Oaxaca. Estas dos especies de no son comunes, sin embargo, al referir a *Persea* sp. "Raro" en nuestro estudio se sugiere la posibilidad de encontrar aún especies desconocidas dentro de *Persea* que quizá no se han identificado aún y puedan encontrarse de manera silvestre.

No se descarta la posibilidad como sugiere van der Werff (2002) que una revisión moderna del género *Persea* cambiaría de manera radical su taxonomía, tal es el caso de algunas especies como *P. obscura* que podrían tener mejor cabida en el género asiático *Alseodaphne* según indica este autor. Este razonamiento se basó en las contrariedades de la clasificación que considera la presencia de tépalos iguales y dehiscentes en frutos del subgénero *Persea*, respecto a la presencia de tépalos desiguales y persistentes en los frutos en el subgénero *Eriodaphne*. Este autor ha descrito tres nuevas especies que

combinan estos caracteres (*P. albiramea*, *P. brevipetiolata*, *P. laevifolia*) y que no entran en la clasificación clásica realizada por Kopp (1966). Sin embargo, es común encontrar aguacates de la raza mexicana que mantienen sus tépalos aún alcanzando madurez fisiológica, por lo que se piensa que los argumentos de van der Werff (2002) deben tomarse con reserva.

La separación clara de *Eriodaphne*, coincide con lo encontrado por Chanderbali *et al.* (2001) y Campos *et al.* (2007) quienes separaron a *Eriodaphne* del resto del subgénero *Persea*. Basándose en caracteres morfológicos en un trabajo reciente considerando secuencias de DNA Cabrera (2008), analizó cpDNA diferentes especies de *Persea* llegando a la misma conclusión. Los resultados obtenidos en la presente investigación, coinciden nuevamente con lo observado en este sentido; ya que el análisis estadístico de las huellas de DNA separaron ambos subgéneros con un 100 % de valor de remuestreo. Sin embargo, con la finalidad de conocer la taxonomía de las especies y variedades incluidas en el estudio, es necesario realizar análisis a nivel de secuencia más amplios en donde se involucren genes conservados nucleares y de organelos que apoyen con certeza la taxonomía de las variedades de aguacate (Chanderbali, *et al.*, 2001).

En el dendrograma de la Figura 5 en la ramificación que incluyó al subgénero *Persea* se destacó la formación de cuatro subgrupos de la raza Mexicana, distribuidos a lo largo de esta ramificación, esto sugiere una amplia variabilidad, lo cual coincide con Chao *et al.* (2003), que concluyeron lo mismo al emplear

AFLP. Es probable que esta variabilidad se deba al proceso de domesticación como lo ha mencionado van der Werff (2002). Por otra parte, una observación interesante en este árbol fue que aguacates de mayor tamaño (calidad comercial, denominándoles especiales) se agruparon, denotando mayor domesticación como en otros frutales (Luna-Morales, 2004). La raza Mexicana, comprende al grupo de aguacates más conocidos en la parte central de México, estos genotipos son abundantes en muchos pueblos del Valle de Orizaba, Veracruz y estados adyacentes, sus frutos fueron empleados por los nativos en el Valle de Tehuacan, Puebla, hace unos 8000 a 7000 años a.c. (Williams, 1976). Las accesiones de la raza Mexicana en este estudio tienen su origen de diferentes partes de México, excepto “Guay I” y “Guay III” de Ecuador. En este conjunto ‘Ettinger’ y ‘Duke 7’ son genotipos Mexicanos que han tenido un proceso formal de selección al ser liberados como variedad y portainjerto respectivamente. ‘Duke 7’ que pertenece a esta raza, se ubicó en una derivación aparte junto con otros géneros de este subgénero *Persea* producto de la selección que algunos genotipos han tenido. ‘Negra La Cruz’ y ‘Fuerte negro’, accesiones provenientes de Chile, son otro ejemplo de genotipos que pertenecen a la raza Mexicana pero que también tienen su origen en otros sitios y que se agruparon bien dentro del subgrupo IV en el dendrograma con tipos especiales de mexicanos.

En la raza Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis*) se agruparon 13 accesiones, sin embargo, éstas se encuentran dispersas a lo largo del dendrograma (Figura 4.5), es decir no se agruparon de manera compacta.

Existen cinco accesiones consideradas guatemaltecas de manera práctica dentro del banco de germoplasma por sus características, pero resultan mezcladas con la raza Mexicana en el dendograma, que son Olanca 2s3 89, SnCrMer7s263, SnCrMer4s261, SnCrMer7s1203, Amatenango-S194. Estas colectas provienen de Chiapas, México (Barrientos *et al.* 1992) y han convivido con la raza Mexicana; además cabe destacar que estos individuos se colectaron como semilla, de tal manera se podría sugerir la posibilidad de una posible hibridación dentro de estas razas. Es fácil entonces confundir a algunos genotipos cuando su identificación se basa tan solo en características de tipo morfológicas, como el aroma a anís o formas de fruto; sin embargo es claro que los marcadores moleculares pueden detectar evidencias de algunas otras diferencias a nivel de polimorfismos de DNA.

La raza Guatemalteca se considera procedente de *Persea nubigena*, Williams (1976). Este es un genotipo nativo de los bosques montañosos de la región de Veracruz, Oaxaca y Chiapas (México) hasta Costa Rica. Este autor consideró que esta raza es el resultado de la selección hecha por los nativos a partir de la abundancia de *P. nubigena* en la época prehispánica. El aguacate guatemalteco resultó de la selección en el interior de los Valles altos de Guatemala; de tal manera que congruente con lo que encontramos en el análisis tipo RAPD es acertado relacionar a *Persea nubigena* ("nubigena 1/7") con la raza Guatemalteca. Esta accesión aparentemente es un híbrido de *P. nubigena*, sin embargo, lo encontramos asociado en la derivación que tienen los guatemaltecos en el dendograma obtenido.

Otra probabilidad de hibridación de las accesiones de la raza Guatemalteca con la raza Mexicana pudo haber sido al llevarse estos tipos de aguacate de México a Guatemala y viceversa, por los pobladores de tiempos antes de la conquista. Posteriormente se pudo presentar dicha hibridación y dar lugar a tipos parecidos al cultivar "Fuerte" descubierto a principios del siglo anterior como lo señala el testimonio de Williams (1976). Furnier *et al.* (1990) consideraron también a la raza guatemalteca como a un híbrido generado entre *Persea steyermarkii* y *P. nubigena*; y de hecho *P. steyermarkii* está en la ramificación con *P. nubigena* y a su vez, éstos están junto a un grupo de aguacates de la raza Guatemalteca, por lo que aparentemente las relaciones genéticas son muy cercanas.

La raza Antillana integra a las accesiones Antigua 19, Tetiz 79, Marichal 102 y Tetiz 77, éstas se separan dentro del subgénero *Persea* cercano a un grupo de Guatemaltecos y *P. floccosa* aunque distantes de la raza Guatemalteca, El genotipo de Costa Rica "Nubes 104" se separó de este grupo, y era considerado como Antillano en el banco de germoplasma pero ubicándose más bien junto a "Freddy 4", este último genotipo asociado muy probablemente a *Persea costarricensis* (Ben-Ya'acov *et al.* 1995).

En el estudio se incluyeron a 10 accesiones que inicialmente se consideraron como genotipos híbridos, sin embargo luego del análisis, se pudo identificar que algunos de ellos se mantuvieron en subgrupos separados. Este comportamiento confirma el hecho de que efectivamente pueden ser producto de hibridaciones

probablemente entre distintas razas, tal es el caso de 230 ptb51, 24ptb87 y Cima de Copey78, pero este último se agrupó a un pequeño grupo de la raza Guatemalteca. Hubo genotipos como Freddy 4 167, Negra la Cruz 221, Fuerte negro 223 que también se han considerado híbridos y el análisis los reagrupó al primero (Freddy 4 167) como muy probable *P. costarricensis* y a los dos últimos (Negra la Cruz 221, Fuerte negro 223) en el agrupamiento de la raza Mexicana especial posiblemente constatándolos como híbridos. En el caso de Martín grande¹⁹, un híbrido de *P. schiedeana* x *P. americana* var. guatemalensis, se ubicó cercano a *P. floccosa* con quien la raza mexicana comparte su origen junto a 2 accesiones híbridas el 230ptb51 y el 24ptb87. El agrupamiento mediante el análisis realizado proporciona información que ayuda en la ubicación de aquellos genotipos cuya ascendencia se tiene en duda. Por otro lado, la distribución en el dendrograma de los diferentes genotipos de híbridos y razas de *Persea americana* podría sugerir que no existen realmente barreras reproductivas entre las 3 razas hortícolas, como lo refiere (Bergh, 1992).

Persea schiedeana es pariente del aguacate, esta especie es de fácil distinción porque sus hojas, ramificaciones jóvenes e inflorescencias presentan una densa pubescencia en comparación a otras especies, a excepción de *P. floccosa* que cuenta con pubescencia en hojas (Williams, 1977). Sin embargo, esta especie en el dendrograma realizado con información de RAPD no se agrupó con algún chinini, como se esperaba, pero si con un híbrido de *P. schiedeana* y *P. americana* var. guatemalensis. Sus grandes y escarificadas

lenticelas en sus tallos lo distinguen. Las venas secundarias grandes y abiertas de sus hojas ayudan a distinguirlos. Sus frutitos jóvenes son muy pubescentes. Las inflorescencias producen brotes tiernos que maduran al tiempo que el fruto lo hace. Estos árboles han sido cultivados o semicultivados por mucho tiempo encontrándose en traspatios, sus frutos son muy largos y se utilizan como alimento aunque equivocadamente se les ha catalogado como de menor calidad que el aguacate (Cruz-Castillo *et al.* 2007). Esta especie tiene mucha variación de frutos, estructuras vegetativas y de árbol en general, lo cual es de esperarse debido al proceso de selección que la especie ha sufrido a través del tiempo por el hombre que busca frutos de mayor tamaño. La distribución de esta especie se extiende desde Puebla, el sur de Veracruz y Chiapas hasta América central incluso Colombia (Williams, 1977), la altitud donde se encuentra es variable, desde el nivel del mar hasta 2000 msnm. En el dendograma obtenido con RAPD, tres colectas de *P. shiedeana*, una de ellas de Honduras denominada "Yaruche" se ubicó junto a un grupo de aguacates de la raza Mexicana; mientras que las otras dos se mantuvieron juntas en una ramificación "Lino" y "Otrabanda" (de Honduras y Guatemala respectivamente) muy cercanas a *Persea parvifolia*, *P. parvifolia* sorpresivamente se agrupa con estos dos chininis, siendo esta una especie de Veracruz que se caracteriza por tener hojas delgadas lanceoladas y glabras (Williams, 1977), muy distinta a *Persea shiedeana*. En tanto que "Martín Grande 19" que es un híbrido entre *P. schiedeana* y *Persea americana* var. *guatemalensis*, se ubicó alejado de estos. Esta dispersión de los individuos de *P. schiedeana* y su híbrido "M. Grande 19", da idea de la gran variabilidad que existe en esta especie, lo que ya se había

enfaticado por Mhameed *et al.* (1997) y Barrientos *et al.* (1992) quien ha sugerido que dentro de *P. schiedeana* existe gran variación y que probablemente existen razas con adaptación a las diferentes altitudes en las que se distribuye.

Persea gigantea es un una especie que Williams (1953) clasificó como válida y Kopp (1966) como *Persea americana* var. *nubigena*, sin embargo, en el dendograma obtenido con RAPD se ramifica tempranamente e independiente en el Subgénero *Persea*, por lo que es probable que sí se trate de una especie y no sea *P. americana*.

4.4.2. ISSR

Mediante ISSR se generó el dendograma que defirió del obtenido con RAPD. Sin embargo, cabe hacer notar que las ramificaciones finales agruparon congruentemente a los individuos por su similitud. Los marcadores ISSR se piensa que son particularmente útiles para el estudio de individuos relativamente cercanos que exhiben bajos niveles de polimorfismo en las zonas amplificadas (Zietkiewicz *et al.*, 1994), esto explicaría la congruencia en las agrupaciones.

La conformación de los grupos incluyó a los del subgénero *Eriodaphne*: *Persea lingue*, *P. meyeniana*, *P. cinerascens*, *P. parvifolia* y a “*Floccosa H*” (*Persea chamissonis*), y *Persea sp*, como lo que encontró Mhameed *et al.* (1997). Así

como, a especies diferentes que *Persea americana*, como: 'Martín Grande 19' (*Persea schiedeana* x *Persea americana* var. *guatemalensis*), *Persea gigantea*, *P. schiedeana*, *P. nubigena* y *P. steyermarkii*.

También se agruparon los de la raza Mexicana en diferentes subgrupos, lo que nos indica una gran variabilidad en dicha raza, lo cual coincide con Chao *et al.* (2003). Mientras que las razas Guatemalteca y Antillana se agruparon en grupos, indicando variabilidad, la cual pudiera indicar que se debe a la domesticación del aguacate (Kopp, 1966, van der Werff, 2002).

4.5. RAPD versus ISSR

ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) Son una herramienta bastante útil en el estudio de la diversidad genética, variación somaclonal, relaciones filogenéticas, y parentesco en muchas especies que se cultivan. La distribución de los ISSRs en el genoma de los eucariontes los convierte en marcadores altamente informativos (Tautz y Renz, 1984), además reproducibles y de un costo accesible, y no requieren información previa de la secuencia (Gupta *et al.* 2004). Esta estrategia es atractiva por que evita los costos de clonación y secuenciación inherentes en la técnica original de microsatélites (Bao y Wendel, 2001), es muy sensible y suficiente para diferenciar entre individuos cercanamente muy relacionados (Zietkiewicz, 1994). Además si algún locus específico o microsatélite contiene alguna secuencia de interés, se puede aislar, clonar o reamplificar a partir de las bandas individuales obtenidas. Por estas

razones esta técnica es usada adecuadamente para analizar parentescos genéticos en muchas especies de plantas (Damodar-Reddy, *et al.* 1999).

RAPD es una técnica mas versátil comparada a ISSR, usualmente es una técnica que provee marcadores dominantes, pues los polimorfismos se detectan mediante las opciones presencia y ausencia de bandas que representan ya sea inserciones o deleciones en las regiones amplificadas o a partir de cambios de bases con lo que se altera la unión del iniciador (Valadez y Kahl, 2000). Los RAPD son un método ágil para analizar poblaciones provenientes de diferentes cultivares de plantas, especies de un mismo género o diferentes géneros de una familia. Este método permite comparar fragmentos que se amplificaron arbitrariamente en los genomas con base a la complementariedad química que mantuvieron los iniciadores con el DNA blanco. Este tipo de comparaciones entre fragmentos diferentes bordeados por un solo tipo de iniciador, permite estimar la diversidad/variabilidad genómica y compararla entre los organismos analizados. Cada polimorfismo que se detecta, es la consecuencia de la variabilidad que presenten los individuos.; por tal razón este tipo de técnica proporcionó mayor número de polimorfismos (bandas) comparado con ISSR en el presente estudio de *Persea*.

Mediante ISSR en cambio, los fragmentos que se detectan no son aleatorios sino más específicos, ya que los iniciadores utilizados reconocen sitios localizados (más conservados) situados entre 2 microsatélites; es decir, la unión del iniciador ya no es arbitraria, la información detectada entonces se expresa

mas comúnmente por monomorfismos que polimorfismos, diferenciándose así el genoma de los individuos ya que se permite establecer relaciones genómicas estrechas entre organismos, los cuales comparten al menos una misma longitud en los fragmentos amplificados (Luna-Paez, 2008).

Aún cuando la información derivada de los RAPDs e ISSR es diferente debido a la ubicación en el genoma, las agrupaciones provenientes de los respectivos árboles, tienden a mostrar agrupamientos similares que albergan a las mismas razas. Ambos tipos de marcadores muestran en el caso de las razas tanto Mexicana como Guatemalteca la obtención de varios subgrupos; esto indica la amplia variación existente al interior de las mismas razas.

4.6. Conclusiones

Con base en lo anterior, podemos decir que los dos criterios de análisis molecular, RAPD e ISSR han permitido agrupar a los genotipos representativos de un banco de germoplasma de aguacate de manera congruente en la mayoría de los casos.

Con los análisis RAPD e ISSR, se separaron los diferentes *Persea*, ubicando de manera mas alejada a los *Persea* ajenos a *P. americana* constituido por las razas Mexicana, Guatemalteca y Antillana

Dada la gran variabilidad genética y fenotípica del género *Persea* y a las dificultades que la taxonomía de las diferentes razas, especies silvestres y variedades domesticadas ha presentado, es necesaria la comparación de secuencias de genes o regiones conservadas para inferir de forma inequívoca las relaciones evolutivas de las accesiones del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.

En general RAPD nos ayudó a reconocer grandes grupos acordes a la taxonomía actual en las ramificaciones iniciales del dendograma, mientras que ISSR nos permitió reconocer agrupamientos semejantes acordes a la similitud hasta las ramificaciones mas alejadas del dendograma.

En ambos dendogramas generados: RAPD e ISSR; se distinguió la separación de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* en ramificaciones independientes. *Eriodaphne* con algunas especies típicas de acuerdo a la taxonomía tradicional; *P. meyeniana*, *P. cinerascens*, *P. lingue* y probable *P. chamisonis*. El subgénero *Persea* se distinguió en este estudio como muy diverso; albergó de manera clara a las especies que típicamente se encuentran asignadas por la taxonomía actual; tales como *P. steyermarkii*, *P. nubigena*, *P. shiedeana*, *P. floccossa* *P. gigantea* y *P. americana*.

Persea americana, contuvo la mayor diversidad de accesiones del estudio. Mediante la generación de los dendogramas basados en los marcadores RAPD e ISSR, se obtuvieron varios agrupamientos, correspondientes a las razas; Mexicana, Antillana, Guatemalteca y Costariscencis conformada esta última por los genotipos "Freddy 4 167"

y "Nubes 104". El mayor número de accesiones correspondieron a la raza Mexicana, en esta fue posible generar varios subgrupos de genotipos, sobresaliendo el de los denominados especiales por albergar a aquellos con calidad comercial como "Vargas", "Lonjas", "Fuerte negro", "Negra la Cruz" entre otros.

Los agrupamientos logrados nos permitieron diferenciar a aquellos genotipos que podemos denominar como "más evolucionados" o "domesticados" como "Lonjas", de aquellos que por su origen o utilidad actual puedan ser considerados más "intactos" o "primitivos" como "Floccossa H", probablemente *P. chamisonis*.

Fue posible mediante marcadores RAPD e ISSR identificar y diferenciar la diversidad genética que alberga el banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. pudiendo considerar que la diversidad que se conserva en este banco puede ser considerada como una muestra representativa de la diversidad genética del género *Persea* que actualmente prevalece en los sitios nativos de México, constituyendo así una herramienta para planificar la conservación, utilización y futuras colectas de este género y especies afines.

4.7. Literatura citada

- Álvarez-García G. 2002. Aislamiento de ADN genómico de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo especialista en Fruticultura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 55 p.
- Ashworth, V. E. T. M. and M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94(5): 407-415.
- Bao, L. and J. F. Wendel. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1, 205-208.
- Barrientos-Priego, A. F., Ben-Ya'acov, A. D., de la Cruz-Torres, E., López-López, L., Buffer, G. and M. W. Borys. 1991. Descriptores para aguacate- Descriptors for avocado. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, Estado de México. México. 69 p.
- Barrientos-Priego, A. F., Borys, M. W., Escamilla-Prado, E., Ben-Ya'acov, A., de La Cruz-Torres, E. and L. López-López. 1992. A study of the avocado germplasm resources, 1988-1990. IV. Findings in the Mexican Gulf region. *Proceedings of the Second World Avocado Congress I*: 551-558.
- Ben-Ya'acov, A., Bufler, G., Barrientos-Priego, A. F., de la Cruz-Torres, E. and L. López-López. 1992. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I. General description of the international project and its findings. *Proceedings of Second World Avocado Congress II*: p. 535-541.
- Ben-Ya'acov, A., Solis M., A. and E. Peri. 1995. Progress of the study of avocado genetic resources. II. The avocado genetic resources in Costa Rica. *Program and Book of Abstracts of the World Avocado Congress III*. October 22-27, Tel Aviv, Israel. p.109.
- Bergh, B. O. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yrbk.* 76: 61-75.

- Bufler, G. and A. D. Ben-Ya'acov 1992. Study of avocado germplasm resources, 1988 – 1990. Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in avocado. Proc. Second World Avocado Congress II: 545-550.
- Bufler, G. and J. Fiedler. 1996. Avocado genetic resources. Final Report . GIARA B-14 Julio, 1996. 50 pp.
- Cabrera, H. C. 2008. Inferencia filogenética en *Persea* basada en secuencias de la región *TrnI-TrnF* de cpDNA. Tesis. Maestría en Ciencias de Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Téxcoco. México. 90 pp.
- Chanderbali, A. S., van der Werff, H. and S. S. Renner. 2001. The relationships and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. Ann. Missouri Bot. Gard. 88: 104-134.
- Chao, C. T., Barrientos-Priego, A. F., Reyes-Alemán, J. C., and P. S. Devanand. 2003. Genetic relationships among accessions from California and Mexico characterized by AFLP markers. Abstracts of the V World Avocado Congress. Málaga, España. pp. 208-209.
- Cruz-Castillo, J. G.; Del Ángel-Coronel, O. A.; de la Cruz-Medina, J.; Joaquín-Martínez, M. C. .2007. Características morfológicas y bioquímicas de frutos de chinene (*Persea schiedeana* Nees.). Revista Chapingo Serie Horticultura 13(2): 41-47.
- Clarke, B.C., Moran L.B. and R. Appels. 1989. DNA analysis in wheat breeding. Genome. 32:334-339.
- Damodar-Reddy, K., Nagaraju, J. and E. G. Abraham. 1999. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. Heredity 83: 681-687.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., Clegg, M. T. and M. T. Clegg. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analysis. J. Heredity 89(4): 319-322.
- Doyle, J.J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11-15.

- Campos R. E., Terrazas T. and L. López-Mata 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:249-258.
- Fiedler, J., Bufler, G. and F. Bangerth. 1998, Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill) using RAPD markers. *Euphytica* 101: 249-255. a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1, 205-208.
- Furnier, G. R., Cummings, M. P. and M. T. Clegg. 1990. Evolution of avocados as related by DNA restriction fragment variation. *J. Heredity* 81: 183-188.
- Gama-Campillo, L. 1994. Studies on the systematic and ethnobotany of the subgenus *Persea*. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy University of California. Riverside, USA. 294 p.
- Gupta, K., Deepak Prem, D., Singh Negi, M. and A. Agnihotri. 2004. ISSRs: An efficient tool to characterize interspecific F₁ hybrids of *Brassica* species. *New Directions for a Diverse Planet. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. Brisbane, Australia.*
- IPGRI. 1995. Descriptores para aguacate (*Persea* spp.) Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI-FAO). Roma, Italia. 54 p.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayad, W. G. and T. Hodgkin. 1997. *Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies.* IPGRI Technical Bulletin No. 2. 47 p. a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1, 205-208.
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea*-Lauracea). *Mem. New York Bot. Gard.* 14:1-117.
- Lorea-Hernández, F. G. 2005. Nuevas especies de *Licaria*, *Ocotea* y *Persea* (Laurácea) de México. *Acta Botánica Mexicana* 71: 61-87.
- Luna-Paez, A. 2008. Diferenciación genómica de semillas y cladodios de *Opuntia* spp. y su posible uso para diferenciación. Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Horticultura. Chapingo, México. 128 p.
- Luna-Morales, C. del C. 2004. Recolección, cultivo y domesticación de

- cactáceas columnares en la Mixteca Baja, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(2): 195-102.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theor. Appl. Genet.* 94: 279-286.
- Popenoe, W. 1963. Early history of the avocado. *Calif Avocado Soc Yearbook* 47: 19-24.
- Rogers, S.O. and A. J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol Rep* 5: 69-76.
- Saghai-Marooof, M. A., Soliman, K., Jorgensen, R. A. and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.
- Smith, C. E. 1966. Archaeological evidence for selection in avocado. *Econ. Bot.* 20: 169-175.
- Storey, W. B., Bergh, B. O. and G. A. Zentmyer. 1986. The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70:127-133.
- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple Sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4137.
- UPOV. 2006. DRAFT. Avocado (*Persea americana* Mill). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34 p.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas, Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147 p.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central América. *Novon* 12(4): 575-586.

- Vladimir, H.; Pavlíček, A.; Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Witney, G. W., Arpaia M. L., Clegg M. T. and G. W. Douhan. 2005. Avocado germplasm preservation and breeding program in California. New Zealand and Australian Avocado Grower's Conference. 20-22 september. Tauranga, New Zealand. Session 4. New germplasm and global breeding programmes. 8 p.
- Williams, L. O. 1953. New Central American plants. *Ceiba* 4(1): 39.
- Williams, L. O. 1976. The botany of the avocado and its relatives. In: Proceedings of the first international tropical fruit short course. The avocado, Miami Beach, Florida, November 5-10. Sauls J.W., Phillips R.L., Jackson L.K. University of Florida. Gainesville, FL, USA. pp. 9-15.
- Williams, L. O. 1977. The avocado, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany* 31: 315–320.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

CAPÍTULO 5. V. ANEXOS

ANEXO 1. Geles de poliacrilamida obtenidos mediante RAPD e ISSR.

Figura 5.1 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 15 de la serie A de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

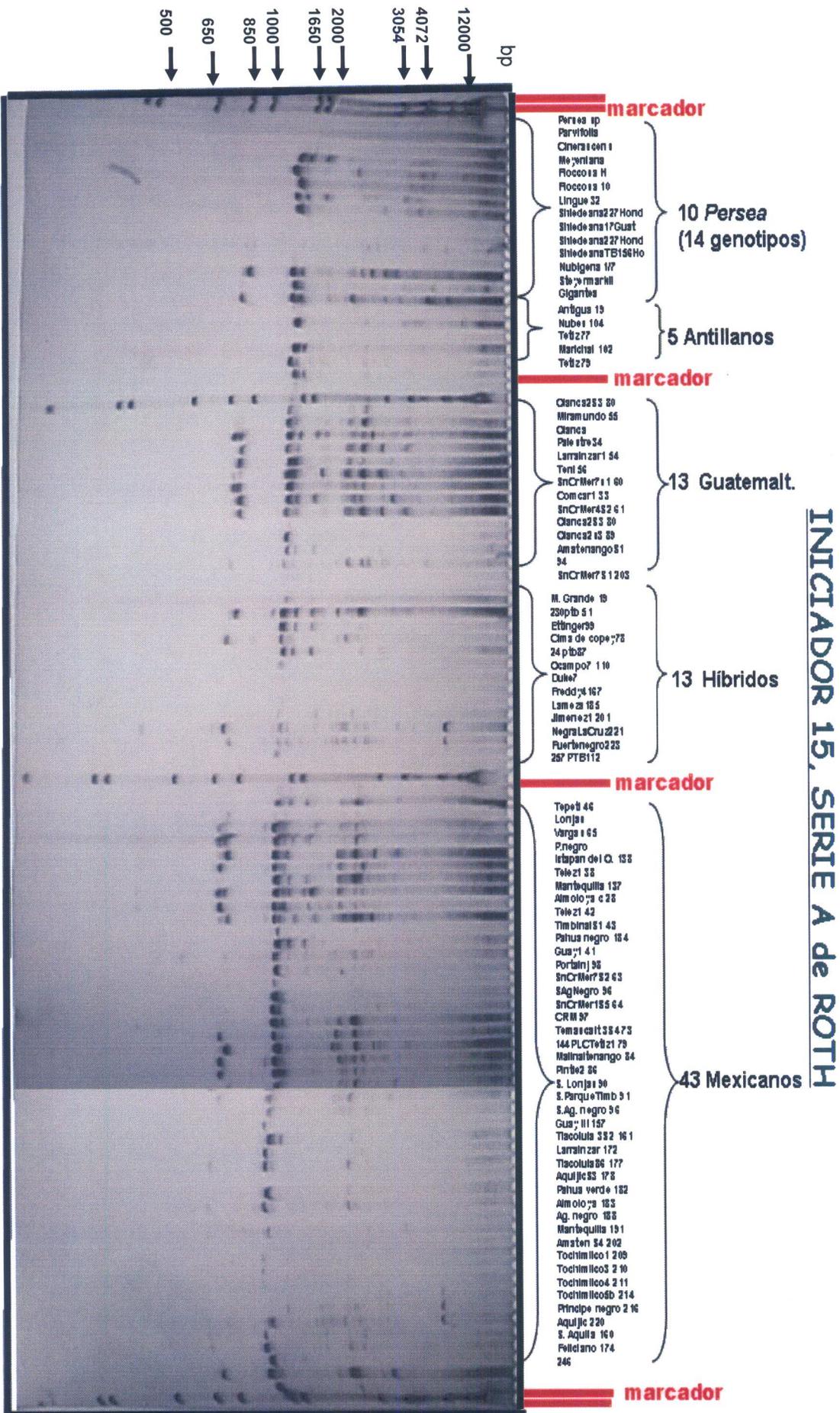


Figura 5.3 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 10 de la serie C de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

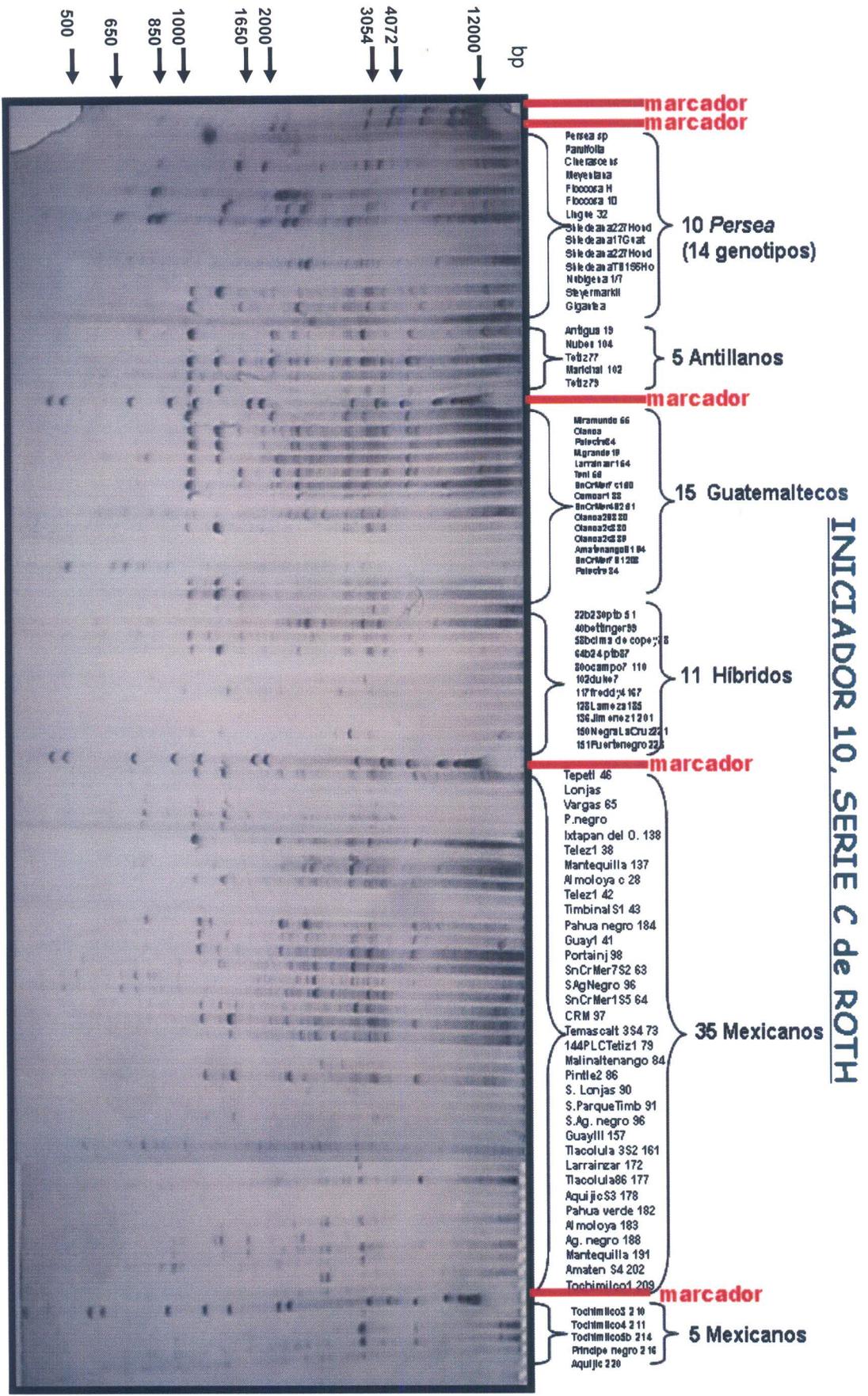


Figura 5.5 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 7 de la serie E de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

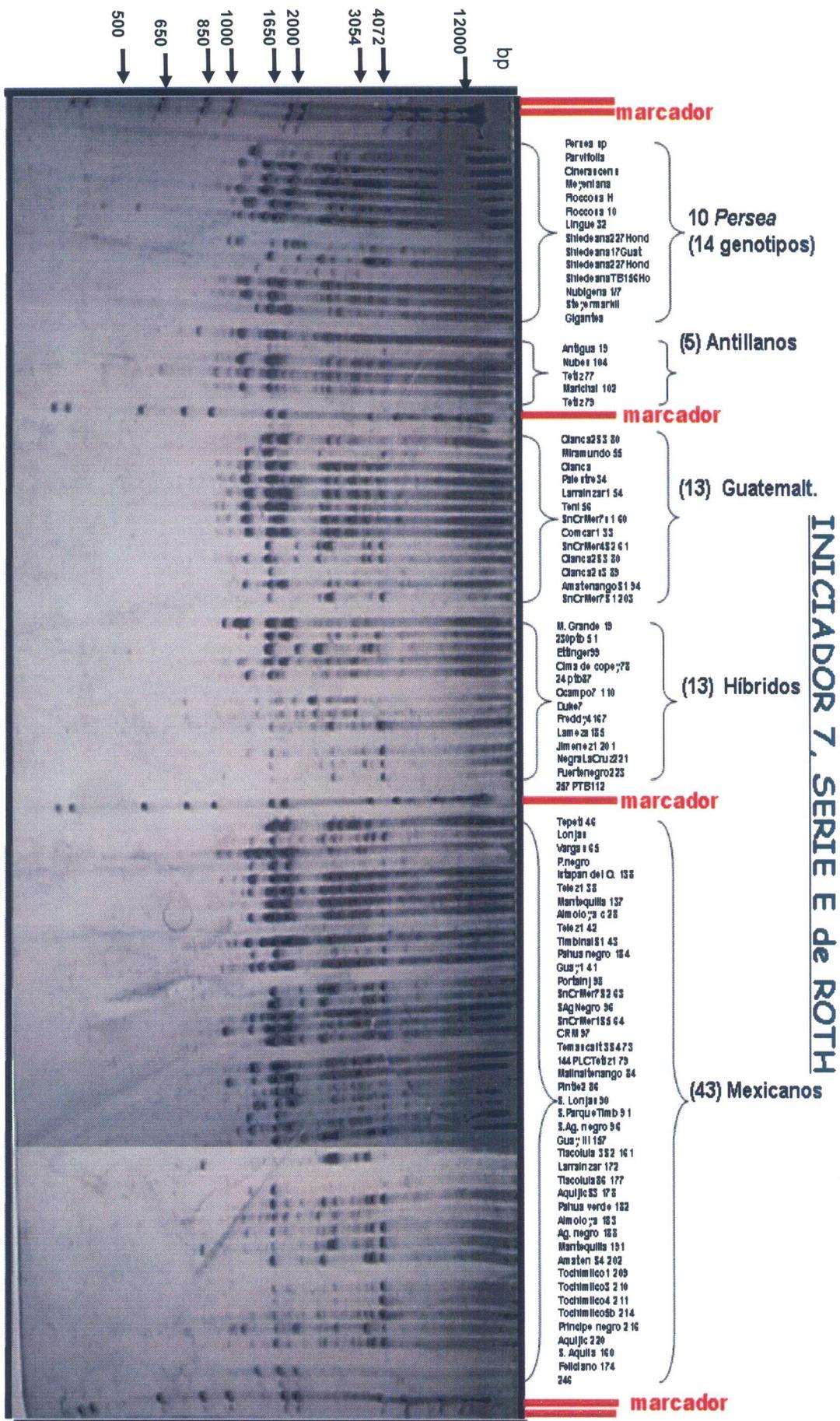
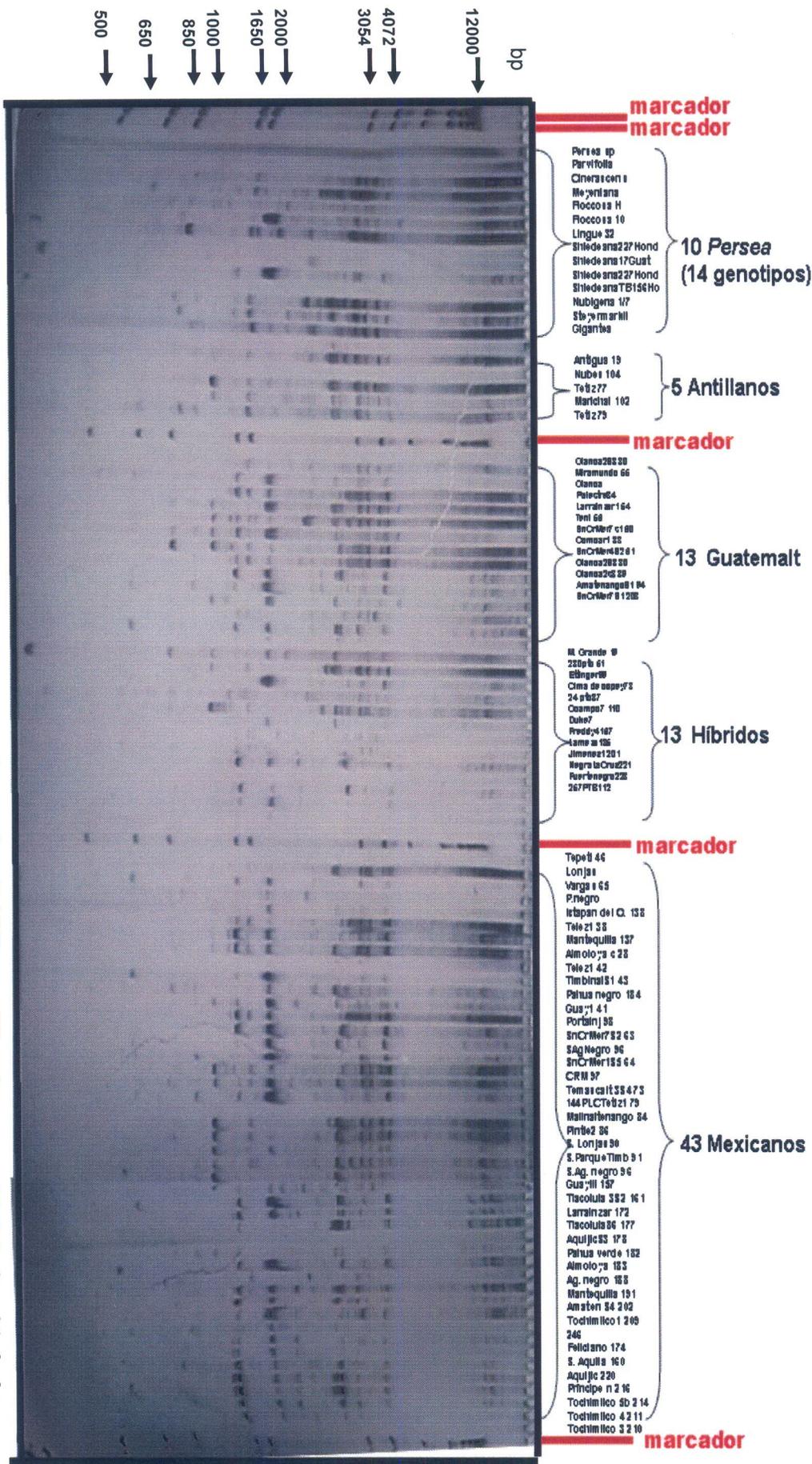


Figura 5.6 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 14 de la serie E de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.



INICIADOR 14, SERIE E de ROTH

Figura 5.7 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 16 de la serie E de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco

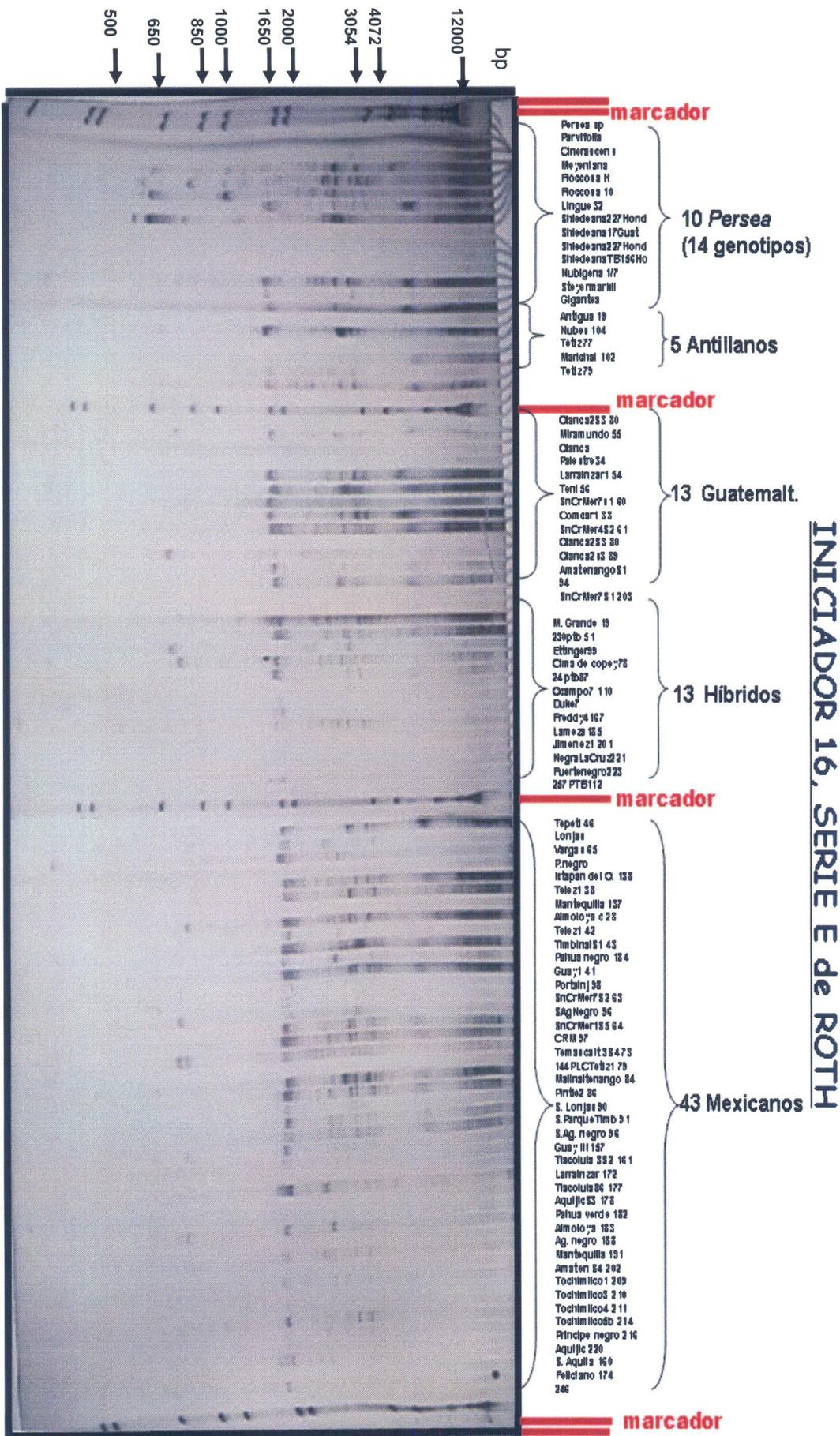


Figura 5.8 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo RAPD amplificados con el iniciador 18 de la serie E de Roth en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco

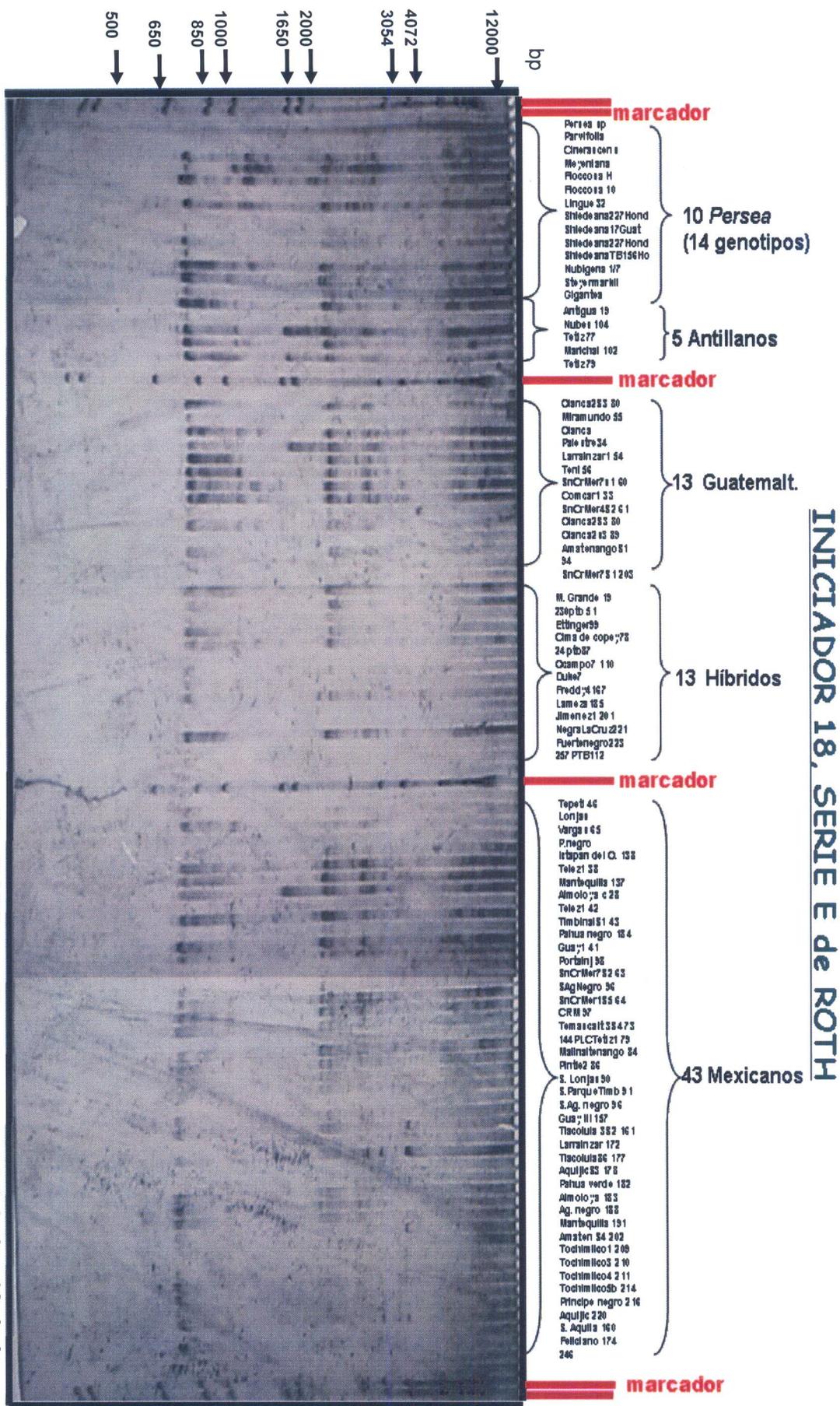


Figura 5.9 Gel de poli(acrilamida 29:1) mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador ANCH-6 en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

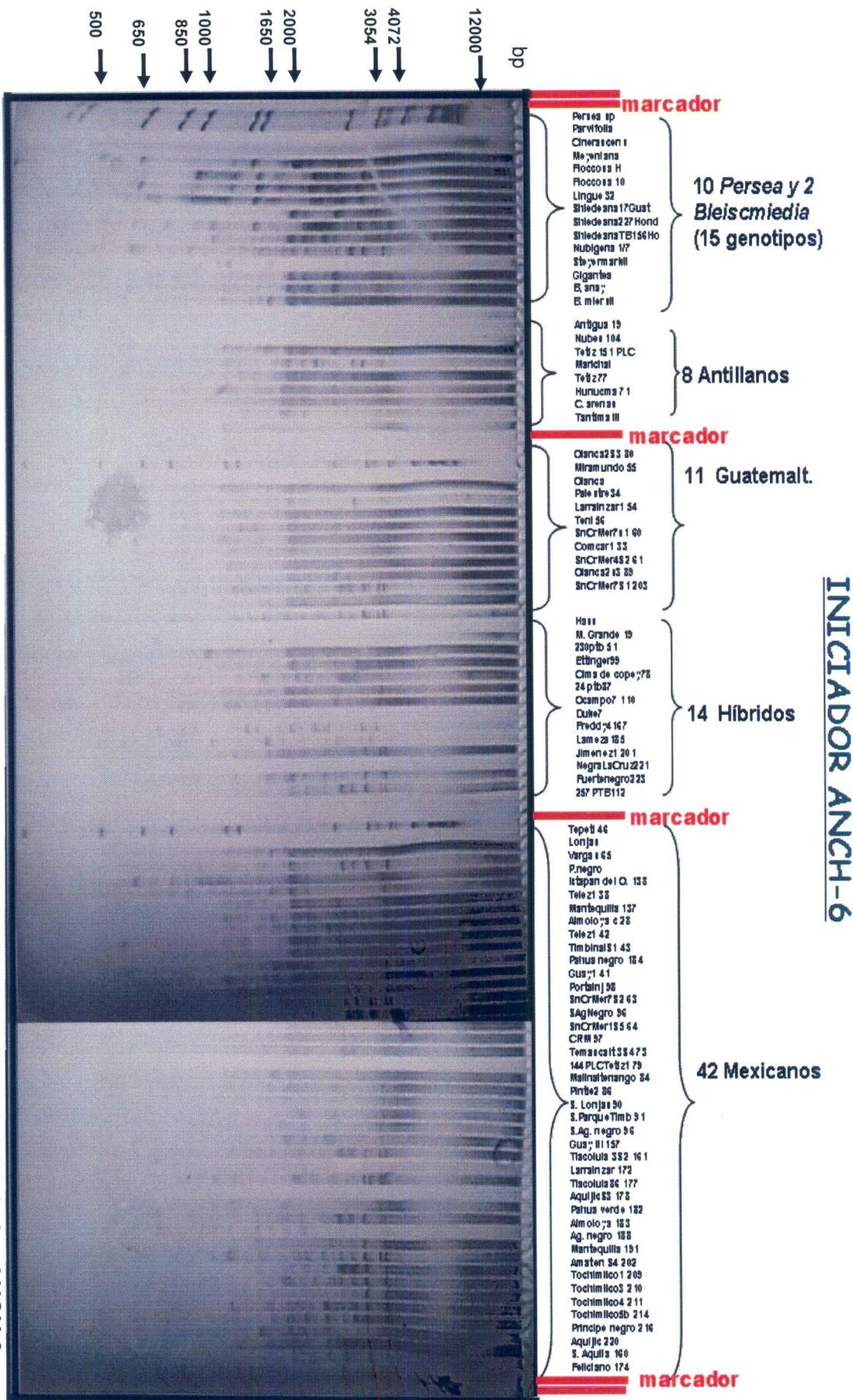


Figura 5.10 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador DBDA(CA)₇ en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

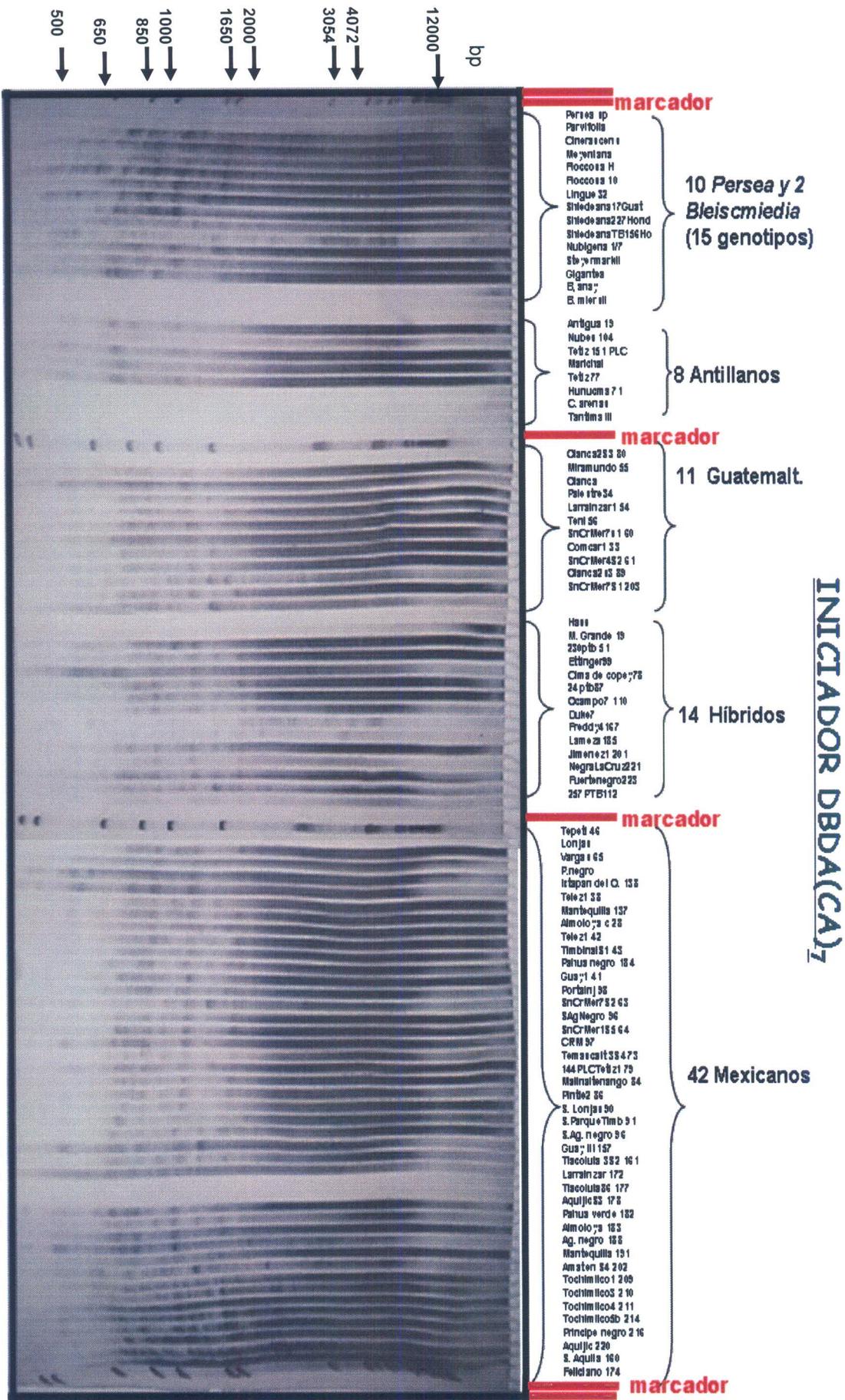


Figura 5.11 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (AC)₈YG en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

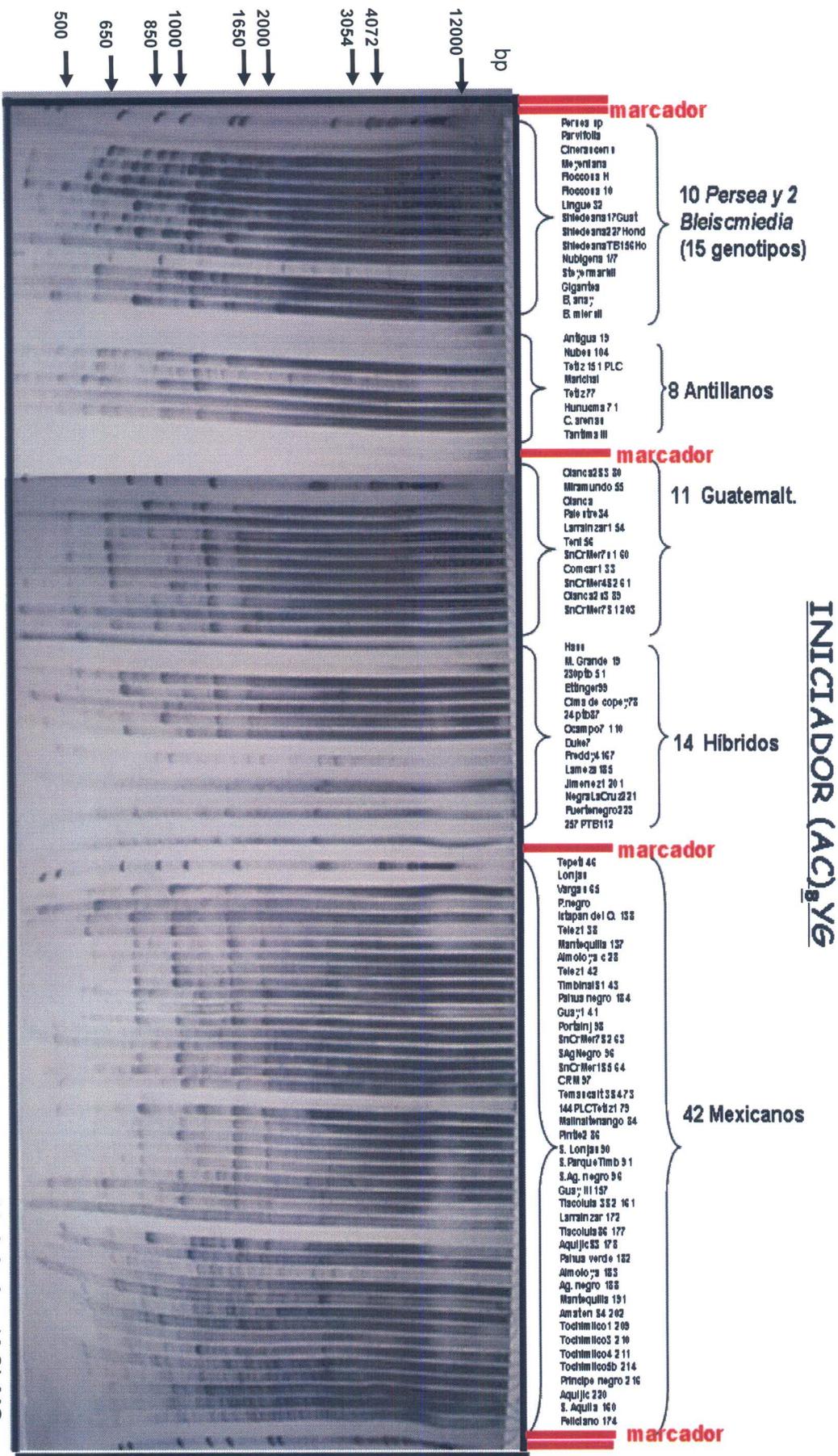


Figura 5.12 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (GA)₈YC en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular es de 1 kb de Gibco.

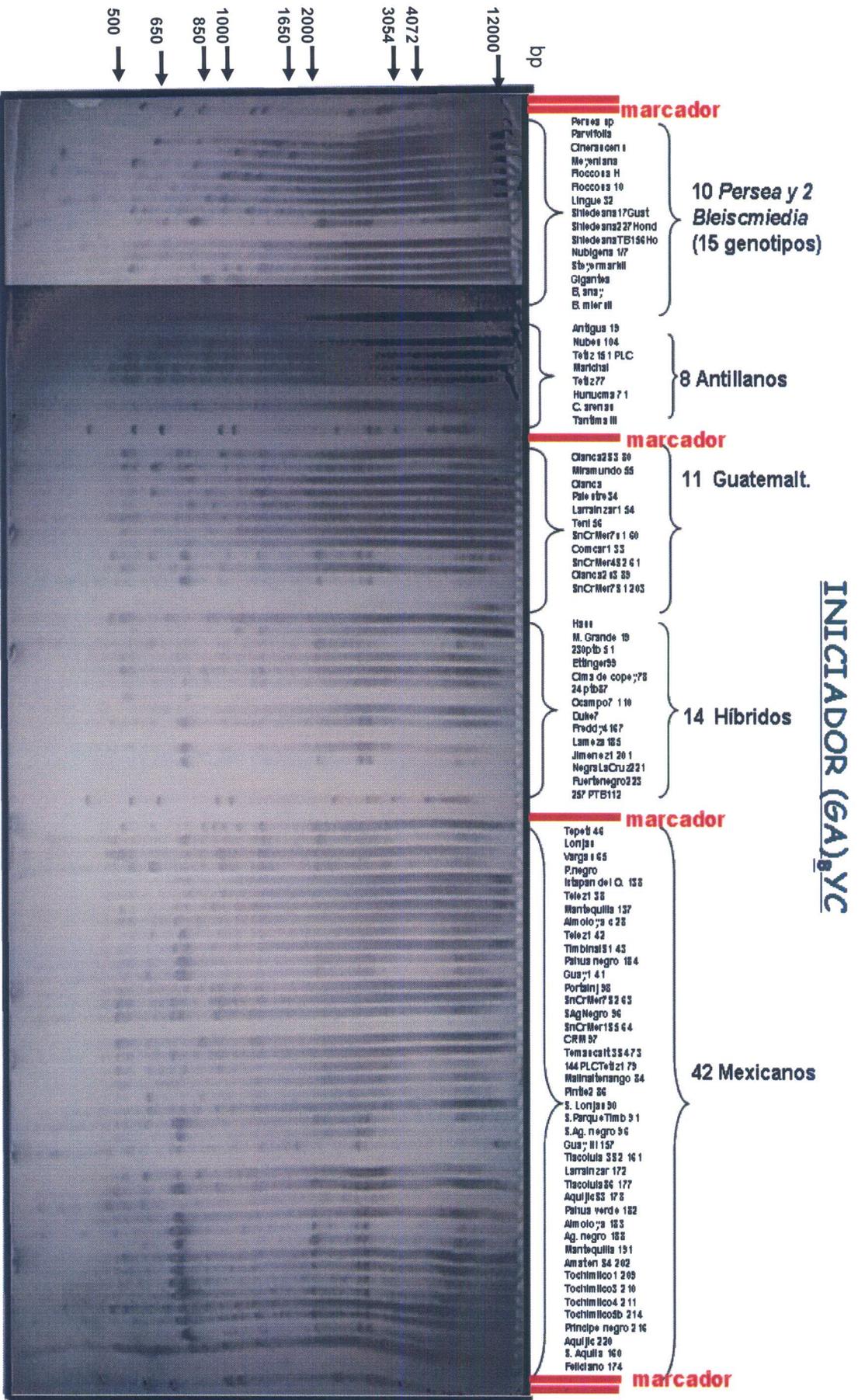


Figura 5.13 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (TCC)₅RY en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular de de 1 kb de Gibco.

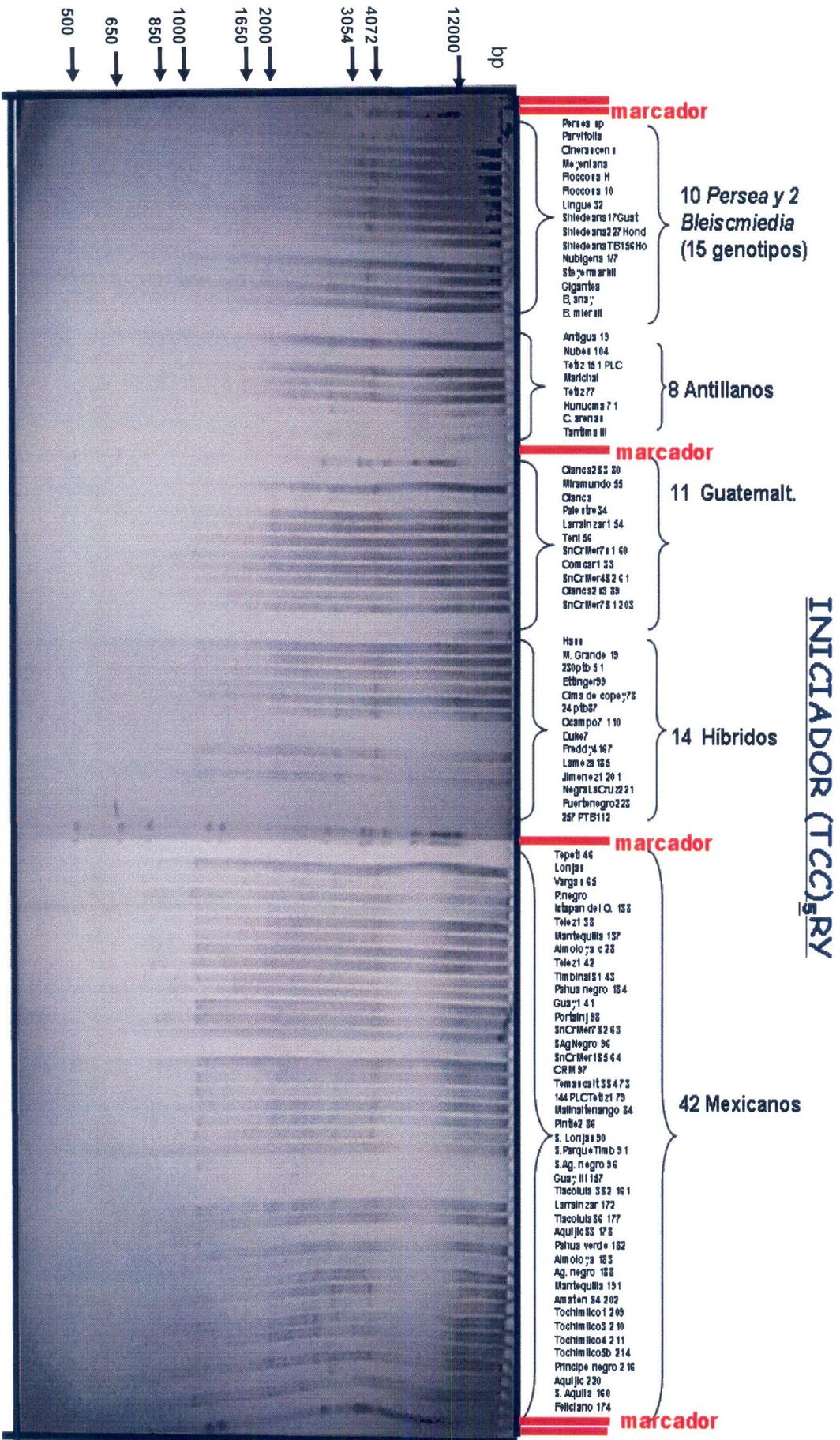
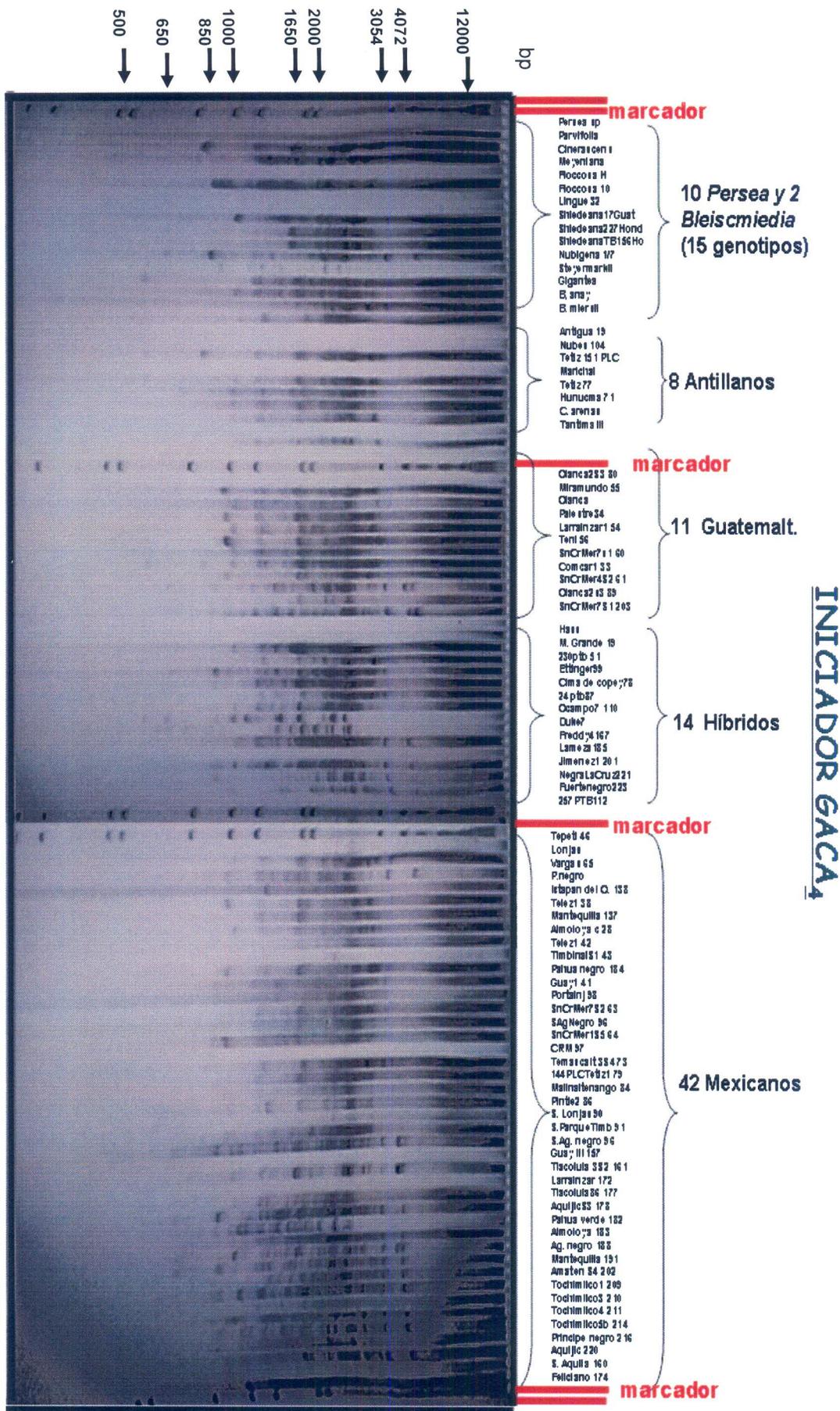


Figura 5.14 Gel de poliacrilamida 29:1 mostrando marcadores tipo ISSR amplificados con el iniciador (GACA)₄ en individuos de *Persea*. El marcador de peso molecular de de 1 kb de Gibco.



**ANEXO 2. Matrices de distancias de similitud obtenidas
mediante RAPD e ISSR**

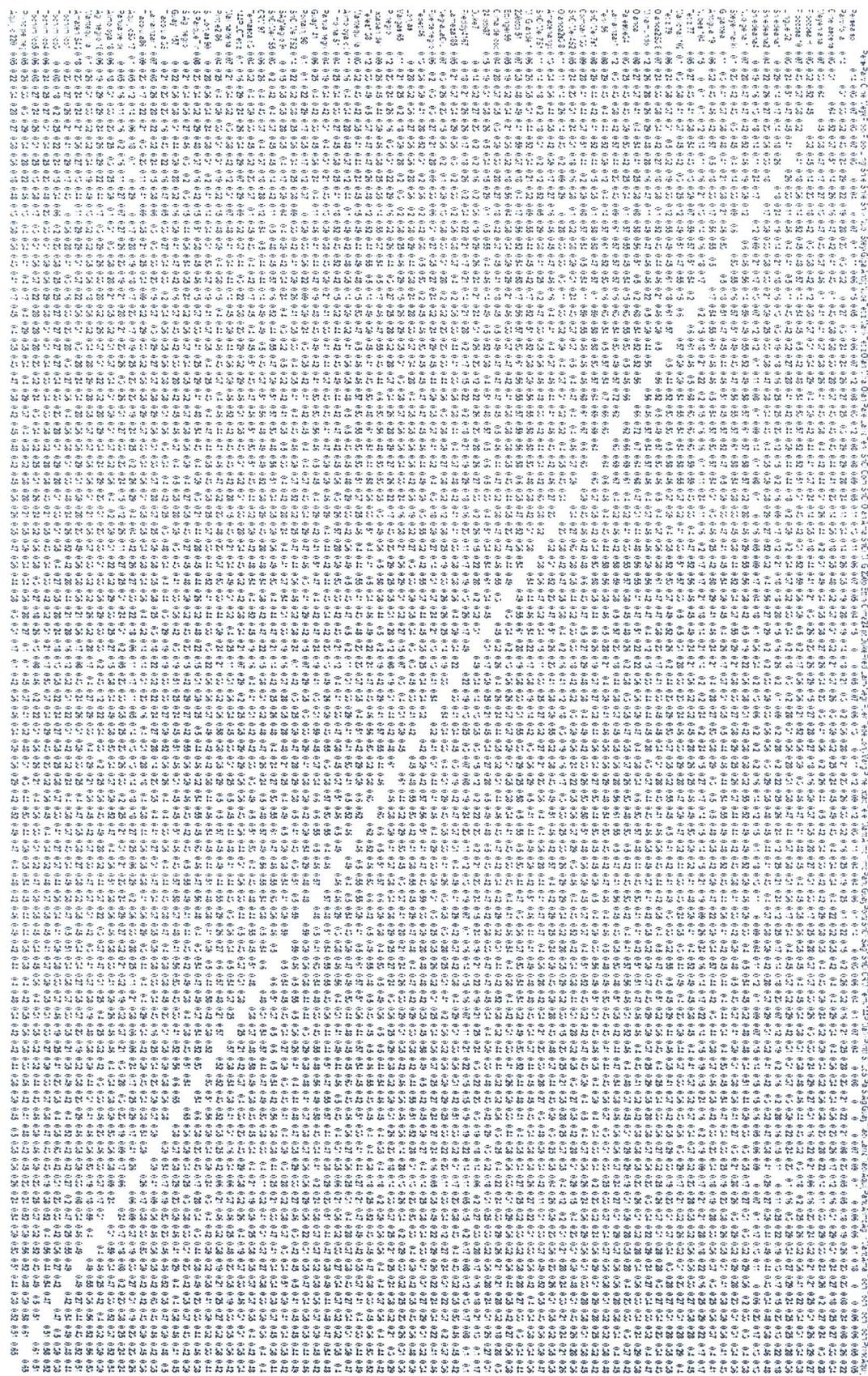


Figura 5.15 Matriz de distancias de similitud de individuos de *Persea*, obtenida mediante RAPD, con el índice Nei and Li (Dice).

