



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍ EN CIENCIA EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NÍSPERO (*Eriobotrya japonica*
L.) EN MÉXICO**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

CECILIA GARCÍA GALLARDO

Bajo la supervisión del: DR. NATANAEL MAGAÑA LIRA



Chapingo, Estado de México, mayo de 2026



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NÍSPERO (*Eriobotrya japonica* L.) EN MÉXICO

Tesis realizada por **CECILIA GARCIA GALLARDO** bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____



DR. NATANAEL MAGAÑA LIRA

CODIRECTOR: _____



DRA. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

ASESOR: _____



DR. JUAN GUILLERMO CRUZ CASTILLO

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	ix
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Origen y distribución	5
2.2. Descripción botánica	5
2.3. Importancia del cultivo y producción	7
2.4. Marcadores moleculares	9
2.4.1. Fragmentos de restricción (RFLP)	12
2.4.2. Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)	12
2.4.3. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP)	13
2.4.4. Minisatélites y Microsatélites	13
2.5. Variabilidad genética en el níspero	14
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. HIPÓTESIS	17
5. METAS	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Sitio experimental	18
6.2. Material Vegetal	18
6.3. Caracterización molecular	20

6.4.	Extracción de ADN-----	21
6.4.1.	Cuantificación del ADN -----	22
6.4.2.	Pruebas de calidad -----	22
6.4.3.	PCR de los iniciadores finales -----	23
6.4.4.	Análisis estadístico -----	25
7.	RESULTADOS Y DISCUSION-----	27
7.1.	Análisis de agrupamiento -----	27
7.2.	Análisis de coordenadas principales -----	30
7.3.	Análisis de varianza molecular -----	32
7.4.	Descriptiva de Marcadores -----	35
8.	CONCLUSIONES -----	38
9.	LITERATURA CITADA -----	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Área y producción de níspero en distintos países	9
Cuadro 2. Comparación de los marcadores más utilizados	11
Cuadro 3. Genotipos de Níspero (<i>Eriobotrya japonica</i>) utilizados en la caracterización molecular con ISSR	19
Cuadro 4. Valores de pureza de ADN (Absorbancia A260/A280)	22
Cuadro 5. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR con 16S.....	23
Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de <i>Eriobotrya japonica</i>	24
Cuadro 7. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR con iniciadores ISSR.	25
Cuadro 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de 65 accesiones de <i>Eriobotrya japonica</i>	35
Cuadro 9. Descriptiva de marcadores para <i>Eriobotrya japonica</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción botánica de <i>Eriobotrya japonica</i> . A) una hoja, B) Base de la hoja que muestra la estípula en vistas ventral y lateral, C) Porción de la rama de la inflorescencia lateral, D) Bráctea de inflorescencia, E) Sección longitudinal de la flor, F) Pétalo, G) Estambre, H) Gineceo, sección longitudinal, I) Infrutescencia, J) Sección longitudinal y visto de ápices. Elaboración propia con base en Zappi y Turner (2001).....	7
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de caracterización molecular.	21
Figura 3. Dendrograma de 65 accesiones de <i>Eriobotrya japonica</i> construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard (1-S).....	30
Figura 4. Análisis de coordenadas principales de 65 accesiones de <i>Eriobotrya japonica</i> utilizando marcadores moleculares ISSR.	32

DEDICATORIA

A mi familia, en especial mis tíos, Baldomero Gallardo García y Diana Alvarado, quienes con su aliento, guía y presencia han sido un componente vital de mi vida. Gracias por su afecto, por tener fe en mí y por estar a mi lado en este viaje, siempre brindándome palabras de apoyo e inspiración para perseverar.

A mis hermanas Patricia García Gallardo y Marisol García Gallardo, por su amor ilimitado, por ser mi pilar en tiempos difíciles y por compartir conmigo cada fase de este proceso. Gracias por estar siempre ahí, por su empatía y por ser una parte indispensable de mi vida.

A mis amigos, por todos los momentos que hemos compartido, por su compañía, por su fe y por demostrar que la auténtica amistad se cultiva a través del tiempo, la lealtad y el respeto mutuo. Gracias por cada experiencia que hemos tenido y por seguir siendo una parte significativa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la formación académica requerida para obtener el título de Maestra en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado para facilitar mis estudios de maestría, mismos que resultaron ser indispensables para la conclusión exitosa de este proyecto.

A mi Comité Asesor, integrado por la doctora Margarita Gisela Peña Ortega, el doctor Juan Guillermo Cruz Castillo, y el doctor Natanael Magaña Lira, por la asistencia prestada a lo largo de las diversas fases de la investigación, así como por su tutoría y tiempo dedicado, que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

Al técnico del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido, Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández, por su valioso apoyo, disposición constante y orientación técnica durante la fase experimental de esta investigación, contribuyendo al desarrollo adecuado de los procedimientos realizados.

A mis profesores de posgrado, por impartir sus conocimientos y hacer aportes significativos a mi desarrollo académico y profesional.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales.

Nombre: Cecilia García Gallardo.

Fecha de nacimiento: 18 de noviembre de 1994.

Profesión: Ingeniero Agrónomo.

Cédula profesional: 13630630



Desarrollo académico.

Licenciatura (2013-2017): Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Posgrado (Maestría) (2024-2025): Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NÍSPERO (*Eriobotrya japonica* L.) EN MÉXICO¹

Eriobotrya japonica, o níspero, es reconocida como una especie frutal de importancia económica, nutracéutica y ornamental, que se cultiva en varios climas templados y subtropicales de todo el mundo. En México existe poca información sobre la variabilidad genética de las poblaciones cultivadas, lo que limita el aprovechamiento, conservación y mejoramiento del germoplasma nacional. El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética de poblaciones cultivadas de níspero provenientes de los estados de México, Oaxaca y Veracruz mediante marcadores moleculares ISSR. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la Universidad Autónoma Chapingo. Se analizaron 67 accesiones colectadas en cuatro localidades. El ADN se extrajo a partir de tejido foliar y posteriormente se amplificó mediante PCR utilizando nueve iniciadores ISSR seleccionados por su capacidad de amplificación y polimorfismo. Los datos obtenidos fueron analizados usando la distancia genética de Jaccard, se realizó un análisis de agrupamiento usando el método de varianza mínima de Ward, un análisis de coordenadas principales (PCoA), análisis de varianza molecular (AMOVA) y la estadística descriptiva de marcadores usando el programa InfoGen®. Se obtuvieron 64 bandas, de las cuales 61 fueron polimórficas, representando un 95.31 % de polimorfismo. El dendrograma y el PCoA evidenciaron una elevada similitud genética entre accesiones de diferentes regiones y ausencia de agrupamientos estrictamente geográficos. El AMOVA indicó que el 100 % de la variación genética se concentró dentro de las poblaciones y no entre ellas. Los iniciadores ISSR mostraron valores moderadamente informativos de PIC y alto poder discriminante. Los resultados demuestran que los marcadores ISSR fueron eficientes para detectar variabilidad genética en poblaciones mexicanas de níspero, evidenciando una alta diversidad intrapoblacional y una baja estructuración genética entre regiones, información relevante para programas de conservación y mejoramiento genético.

Palabras clave: ISSR, diversidad genética, germoplasma.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autora: Cecilia García Gallardo
Director: Dr. Natanael Magaña Lira

GENERAL ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LOQUAT (*Eriobotrya japonica* L.) IN MEXICO²

Eriobotrya japonica, or loquat, is recognized as a fruit species of economic, nutraceutical, and ornamental importance, cultivated in various temperate and subtropical climates around the world. In Mexico, there is limited information on genetic variability of cultivated populations, which limits the utilization, conservation, and improvement of national germplasm. The objective of this study was to determine the genetic variability of cultivated loquat populations from the states of Mexico, Oaxaca, and Veracruz using ISSR molecular markers. The study was conducted at the Assisted Molecular Breeding Lab at Autonomous University of Chapingo. A total of 67 accessions collected from four locations were analyzed. DNA was extracted from leaf tissue and subsequently amplified by PCR using nine ISSR primers selected for their amplification capacity and polymorphism. The data obtained were analyzed using Jaccard genetic distances, clustering using Ward's minimum variance method, principal coordinate analysis (PCoA), molecular analysis of variance (AMOVA), and descriptive statistics of markers using InfoGen® program. A total of 64 bands were obtained, of which 61 were polymorphic, representing 95.31 % polymorphism. Dendrogram and PCoA revealed a high degree of genetic similarity among accessions from different regions and the absence of strictly geographic grouping. AMOVA indicated 100 % of genetic variation was concentrated within the populations and not between them. The ISSR primers showed moderately informative PIC values and high discriminatory power. The results demonstrate that ISSR markers were efficient in detecting genetic variability in Mexican loquat populations, revealing high intrapopulation diversity and low genetic structuring between regions, providing relevant information for conservation and genetic improvement programs.

Keywords: ISSR, genetic diversity, germplasm.

²Thesis of Master of Science in Agriculture Biotechnology, Chapingo Autonomous University
Author: Cecilia Garcia Gallardo
Advisor: Dr. Natanael Magaña Lira

1. INTRODUCCIÓN

El níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.) es una especie frutal perenne clasificada en la familia de las Rosáceas y procedente del Sureste de China, que actualmente se ha extendido ampliamente en regiones templadas y subtropicales del mundo. El cultivo se ha expandido hacia Asia, Europa y América debido a la importancia económica, nutricional y ornamental de sus frutos, así como a su capacidad de aclimatarse a diversas condiciones ambientales (Lin et al., 1998). A escala mundial, las principales regiones responsables de la producción de este cultivo incluyen no sólo las amplias regiones agrícolas de China y Japón, sino también los países mediterráneos, que abarcan España, Turquía e Italia. Es importante tener en cuenta que este cultivo también se produce en países asiáticos como Laos, Nepal, Pakistán, Corea del Sur y Vietnam, además de los territorios de Armenia, Azerbaiyán y Georgia, y extendiéndose al continente americano, donde se puede encontrar en diversas naciones incluidas Estados Unidos, Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela, zonas en las que se mantiene como un cultivo con poca significancia en el entorno (Caballero y Fernández, 2003). En México, el cultivo se produce principalmente en el Estado de México, donde obtienen aproximadamente 80 toneladas por ciclo, representando un 93 % de la producción nacional (SIAP, 2017). La producción de este cultivo en particular es notablemente menor cuando se compara con los rendimientos de otras variedades de árboles frutales, no obstante, proporciona una opción productiva significativa y viable en ciertas zonas geográficas, atribuible al alto valor comercial de sus frutos, así como a su notable capacidad para prosperar tanto en zonas climáticas templadas como subtropicales. Más allá de su considerable influencia económica en diversas industrias, el fruto del níspero exhibe una importante importancia nutracéutica y farmacológica que no debe subestimarse en la investigación científica. Los frutos maduros no sólo se ingieren frescos, sino que también se utilizan en la fabricación de una amplia variedad de productos agroindustriales, que incluyen, entre otros, jaleas, mermeladas, jarabes y diferentes formas de licores, como lo destacan los extensos estudios realizados por (Deluchi & Keller, 2010; Shunquan, 2015).

Además, cabe subrayar que tanto las hojas como las semillas del níspero son ricas en una amplia variedad de compuestos bioactivos, incluidos los flavonoides, los compuestos fenólicos y los triterpenos, que se han examinado rigurosamente y están relacionados con una amplia gama de propiedades benéficas, que abarcan, entre otras, efectos antioxidantes (Muñoz et al., 2024), actividades anticancerígenas, respuestas antiinflamatorias, efectos hipoglucémicos e incluso actividades antitusivas, como se ha documentado en numerosos estudios científicos (Martínez-Calvo et al., 1999; Ju et al., 2003; Cha et al., 2011; Kumar, 2014; Shen et al., 2016). Estos atributos han aumentado el interés científico y comercial por la especie, fomentando la investigación dirigida tanto al aprovechamiento productivo como a la conservación de sus recursos genéticos.

La diversidad genética constituye un elemento crítico en la conservación, manejo y mejora de las especies vegetales. Analizar la variabilidad genética que existe tanto dentro como entre las poblaciones facilita el reconocimiento de especímenes superiores, la formulación de enfoques de conservación, y el inicio de iniciativas de mejora genética dirigidas a características agronómicas deseables (Peña Ortega et al., 2025), adaptabilidad ecológica y resiliencia tanto a factores bióticos como abióticos. En el caso de las especies frutales que se propagan vegetativamente, como los nísperos, la caracterización genética asume particular importancia, ya que la propagación clonal prolongada y el intercambio continuo de materiales vegetales pueden promover una disminución de la variabilidad genética e impedir la identificación de distintas variedades (He et al., 2011; Badenes et al., 2009). En el contexto de la investigación genética, los marcadores moleculares han surgido como instrumentos indispensables para la investigación integral de la diversidad genética, principalmente porque facilitan la evaluación precisa y rápida del polimorfismo del ADN al tiempo que eliminan simultáneamente los posibles efectos de confusión de las variables ambientales. Una multitud de metodologías basadas en ADN, que incluyen, pero no se limitan a RAPD, AFLP, TRAP, ISSR y SSR, se han usado ampliamente en diversas investigaciones académicas centradas en la caracterización molecular, la precisión de relaciones filogenéticas, la identificación de cultivares específicos y

el manejo efectivo del germoplasma a través de una variedad de diferentes especies de plantas, como se señala en los hallazgos de (Reddy et al., 2002). Entre estos marcadores genéticos destacan los ISSR por su notable eficiencia, que se atribuye a su reproducibilidad, el grado sustancial de polimorfismo que exhiben, y el hecho de que no precisan conocimientos preexistentes del genoma, potenciando con ello en gran medida su aplicabilidad en especies para las que se dispone de datos moleculares limitados, como lo demostraron Bornet y Branchard (2001); Lirong et al. (2002) y, Bodo Slotta y Porter (2006). Por lo tanto, el uso de estos marcadores moleculares de vanguardia representa un avance significativo en el área de la genética, ya que otorga a los investigadores la capacidad de realizar estudios meticulosos que antes se veían obstaculizados por la falta de disponibilidad de información genética.

En el contexto específico de los nísperos, numerosas investigaciones realizadas en China, Japón y España han facilitado el establecimiento de colecciones significativas de germoplasma y posibilitado la evaluación de la diversidad genética entre cultivares y especies afines a través de diversos marcadores moleculares (Gisbert et al., 2007; Xie et al., 2007; Gisbert et al., 2009; Wang et al., 2010; He et al., 2011; Xiang et al., 2011; Xiaoying et al., 2011; Zhao et al., 2011; Fan et al., 2012; Fukuda et al., 2013; Wu et al., 2015; Yanchun et al., 2015; Sevindik et al., 2020; Nagano et al., 2022). Estos estudios han mejorado significativamente la comprensión de las relaciones filogenéticas, las conexiones genéticas y la clasificación varietal de la especie, al tiempo que sientan las bases para las iniciativas de conservación y mejora genética. No obstante, en la mayoría de las naciones donde se cultivan los nísperos de manera limitada, la utilización del germoplasma y la caracterización molecular siguen siendo limitadas.

En el contexto de México, es evidente que existe una deficiencia significativa en los datos relativos a la variabilidad genética de los nísperos, lo cual es particularmente preocupante dada la considerable importancia de este cultivo y las prometedoras oportunidades económicas que presenta para el desarrollo agrícola y la sustentabilidad. La ausencia de estudios moleculares detallados

representa una barrera considerable para el avance de nuestra comprensión respecto a las intrincadas relaciones genéticas que existen entre las diversas accesiones cultivadas, dificultando con ello la identificación de materiales que puedan poseer cualidades excepcionales, así como obstruir la formulación de estrategias efectivas dirigidas a la conservación y aprovechamiento óptimo de los recursos nacionales de germoplasma. Además, las prácticas de propagación vegetativa junto con el intercambio de materiales vegetales pueden haber contribuido inadvertidamente al dominio y propagación de genotipos estrechamente relacionados o incluso duplicados, lo que, a su vez, tiene el efecto perjudicial de disminuir el potencial de explotación efectiva de la rica diversidad genética que se encuentra disponible dentro de las especies de nísperos. En consecuencia, es imperativo que se realicen más investigaciones para aclarar estas dinámicas genéticas, ya que tales conocimientos podrían potenciar significativamente tanto los esfuerzos de conservación como el desarrollo sustentable del cultivo en México.

Dado el limitado contexto histórico respecto a la caracterización molecular del germoplasma de níspero en México, el presente estudio se concentró en evaluar la diversidad genética de accesiones cultivadas y no cultivadas de *Eriobotrya japonica* utilizando marcadores moleculares ISSR. El objetivo fue generar datos que potencien la comprensión, preservación y aplicación del germoplasma nacional, además de facilitar el avance de iniciativas prospectivas de mejoramiento genético para la especie.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución

El níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.) es un árbol perenne perteneciente a la familia de las Rosáceas, originario del Sureste de China (Changkui et al., 1995; Almeida et al., 2018; Yang et al., 2020; Nagano et al., 2022). La planta alcanza una altura promedio de 6 metros. Los frutos son pomos que pueden ser redondeados, ovalados o elípticos, con una coloración amarilla a naranja fuerte, conforme la maduración ocurre (Badenes et al., 2000).

Existen diferentes opiniones sobre el número de especies de níspero, pero se estima que hay al menos 22 especies y 10 variedades reconocidas (He et al., 2012). La mayoría de las especies en cuestión pueden rastrear sus orígenes hasta las regiones del sur de China y los diversos países que conforman el sudeste asiático, como lo confirma la investigación realizada por Badenes et al. (2009) e Idrees et al. (2022). En los archivos históricos, esta planta en particular fue cultivada principalmente por su valor ornamental, práctica que derivó de sus características notables, incluyendo su capacidad para retener el follaje durante todo el año, su capacidad de floración invernal, y su producción de frutos pequeños, pero sorprendentemente atractivos que cautivaron la atención de horticultores y jardineros por igual. Tras su introducción a Europa, esta especie se abrió paso a California, y posteriormente, se difundió a regiones como Florida y partes de Sudamérica, con lo que se amplió su huella geográfica de manera significativa. En la actualidad, este cultivo se ubica estratégicamente dentro de los rangos latitudinales de 20 a 35 grados Norte y Sur, floreciendo predominantemente en climas templados y subtropicales, como se ilustra en los hallazgos de Lin et al. (1998) y He et al. (2012).

2.2. Descripción botánica

El níspero, científicamente reconocido como una especie arbórea de hoja perenne, se distingue por su corteza rugosa y texturizada que exhibe una tonalidad gris-marrón, que destaca por su proceso de renovación anual que

contribuye a la resiliencia y vitalidad del árbol en su entorno (Zappi & Turner, 2001).

Las dimensiones de los pecíolos foliares, que sirven como los tallos que fijan las hojas al tallo, típicamente varían de 5 a 10 milímetros de longitud junto a un ancho de 5 a 6 milímetros; estos pecíolos poseen una variedad de formas que pueden describirse meticulosamente como oblanceoladas, obovadas o en forma de cuña, reflejando la intrincada diversidad de morfología botánica (Lin et al., 1998; Zappi & Turner, 2001). Al emerger, la superficie superior de las hojas está cubierta de pelo, pasando gradualmente a un estado glabrescente caracterizado por un tono verde oscuro y brillante, que finalmente evoluciona a un tono verde oliva seco. La parte inferior de las hojas está adornada con pelos suaves de color marrón pálido, que en ocasiones muestran una textura lanosa y mate, junto con venas distintivas. Además, las hojas presentan venas secundarias de entre 12 y 16 (-18) y poseen un margen notoriamente dentado en el ápice (Zappi y Turner, 2001; Deluchi & Keller, 2010). La inflorescencia presenta un arreglo paniculado, con panículas de 5-13 x 5-13 (-15) cm y numerosas flores. Tanto el pedúnculo como las ramas están adornados con delicados pelos de color marrón pálido, acompañados de brácteas triangulares (Lin et al., 1998). Las flores presentan características pentámeras, son melíferas y poseen un diámetro de aproximadamente 10 a 15 mm; el cáliz, que mide 5 mm de longitud, es veloso con lóbulos tan agudos como el cáliz, mientras que los pétalos, de 6 a 8 mm de longitud, tienen garras y varían en forma de orbicular a obovada, en tonos de crema a amarillo pálido. (Zappi & Turner, 2001; Deluchi Keller, 2010). Los estambres dentro de cada flor son numerosos, generalmente alrededor de 20, mejorando así la capacidad de polinización de la flor. El ovario, con 5 lóbulos, está situado más abajo (Zappi & Turner, 2001). Los frutos en forma de pera suelen medir entre 4 y 5 cm de longitud (hasta 8 cm en determinados cultivares), son densamente vellosos en sus primeras etapas, se tornan de color amarillo o naranja pálido y, finalmente, se vuelven glabrescentes al madurar. (Figura 1) (Zappi & Turner, 2001).

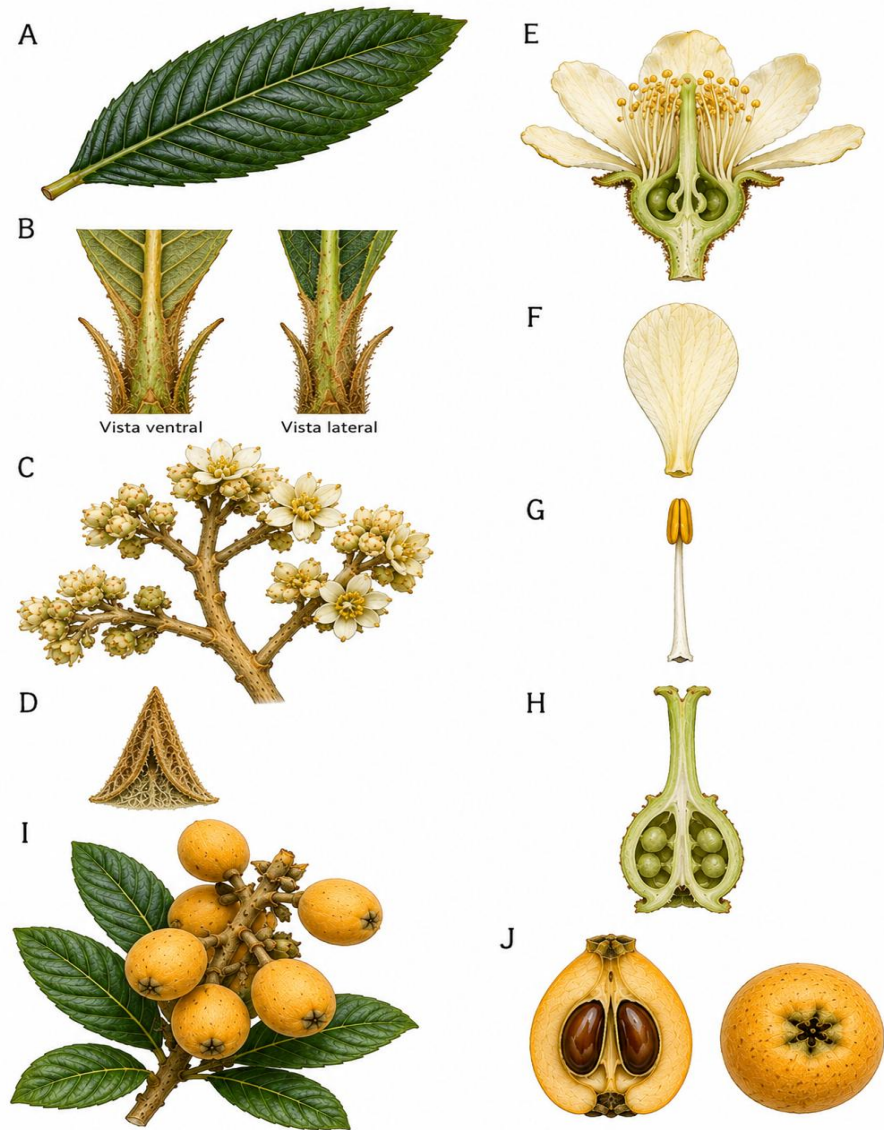


Figura 1. Descripción botánica de *Eriobotrya japonica*. A) una hoja, B) Base de la hoja que muestra la estípula en vistas ventral y lateral, C) Porción de la rama de la inflorescencia lateral, D) Bráctea de inflorescencia, E) Sección longitudinal de la flor, F) Pétalo, G) Estambre, H) Gineceo, sección longitudinal, I) Infrutescencia, J) Sección longitudinal y visto de ápices. Elaboración propia con base en Zappi y Turner (2001).

2.3. Importancia del cultivo y producción

El níspero, reconocido científicamente como una especie significativa, se cultiva predominantemente por su atractivo estético como árbol ornamental, así como

por su capacidad para producir frutos que son muy apreciados en diversas aplicaciones culinarias. Los diversos elementos del árbol, que abarcan sus frutos, semillas y hojas, tienen importancia no sólo por su consumo en estado fresco, sino también en diversas aplicaciones industriales, lo que subraya su utilidad multifacética (Kumar, 2014). Los deliciosos frutos se disfrutan con frecuencia en una variedad de formas, que incluyen, entre otras, la incorporación a jarabes dulces, los procesos de secado, la elaboración de dulces y la transformación en jaleas y mermeladas; además, se pueden utilizar en la creación de postres como pasteles y pudines, mientras que se produce un intrigante alcohol con sabor a almendra a través de la fermentación y destilación del jugo extraído de estas frutas (Deluchi y Keller, 2010; Li et al., 2013). Además, sus hojas contienen una serie de constituyentes fitoquímicos a los que se les atribuyen notables propiedades farmacológicas y medicinales, ya que son particularmente abundantes en compuestos beneficiosos como fenoles y tocoferoles; de igual manera, la fruta en sí se caracteriza por una riqueza de nutrientes, incluyendo azúcares, ácidos orgánicos, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, y vitaminas esenciales (Zhang et al., 2015; Liu et al., 2016; Muñoz et al., 2024). En contraste, las semillas son reconocidas como una valiosa fuente de proteínas, almidón, taninos, y una variedad de minerales (Xu & Chen, 2011) que al ser considerados colectivamente con la presencia de triterpenos, contribuyen a las capacidades antioxidantes de la planta, produciendo una multitud de beneficios para la salud: anticancerígeno, antiinflamatorio, hipoglucémico, astringente, diurético, sedante y efectos tusivos (Martínez-Calvo et al., 1999; Ju et al., 2003; Ahumada et al., 2018; Zhu et al., 2022; Yao et al., 2023).

A nivel mundial, los principales productores de nísperos incluyen China, Japón y la región mediterránea (notablemente España, Turquía e Italia), con cultivos adicionales en diversas naciones asiáticas como Laos, Nepal, Pakistán, Corea del Sur y Vietnam, así como Estados Unidos, Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela (Cuadro 1). A escala nacional, se generan 84 toneladas de nísperos por ciclo, y el Estado de México representa el 93 % de la producción nacional total (SIAP, 2017). No obstante, la diversidad variedad

registrada oficialmente es limitada, ya que únicamente se encuentra inscrita la variedad Guardiola ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS).

Cuadro 1. Área y producción de níspero en distintos países

País	Área (ha)	Producción (t)
China ^b	157,400	919,000
Japón ^b	1,140	3,430
Pakistán ^b	190	1,884
Israel ^b	350	5,000
Egipto	122	1,273
Grecia ^b	60	1,300
Marruecos	385	6,400
Portugal	243	950
Italia ^b	453	5,918
Turquía ^b	809	16,402
Chile ^b	32	220
Brazil	300	2,400
Guatemala		1,500
Chipre ^b	32	220
España ^b	2,250	28,836
Total	163,766	994,733

Elaboración propia con base en datos de (Caballero & Fernández, 2003; Cruz-Castillo et al., 2006; Elsabagh, 2011; Jiang et al., 2022)

^b Estos Datos son de 2019 o 2020.

2.4. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son instrumentos esenciales en la biotecnología agrícola, permitiendo la investigación del genoma para identificar y aislar genes diana a través de diversas metodologías de ADN accesibles. Un marcador se define como una molécula de proteína, ARN o ADN con un tamaño o peso molecular predeterminados que se utiliza para supervisar o estandarizar el proceso de separación mediante electroforesis o cromatografía (Azofeifa-Delgado, 2006). Adicionalmente, un marcador genético se refiere a cualquier gen cuya expresión conduzca a un cambio fenotípico significativo, como conferir resistencia a un antibiótico (Velasco, 2005; Azofeifa-Delgado, 2006).

La mayoría de los marcadores moleculares se pueden clasificar en dos grupos principales de metodologías que se basan en la hibridación o en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Velasco, 2005). Dentro de los primeros, se agrupan los que utilizan sondas para la detección de los marcadores. Las sondas son fragmentos de ADN o ARN que contienen el código para una secuencia específica del genoma. Entre los marcadores de este tipo más utilizados se encuentran los minisátélites (VNTR), Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y los ADNShips (Oligonucleotide arrays) (Velasco, 2005). En el caso de los marcadores que utilizan la amplificación, el polimorfismo se observa debido a la variación en la secuencia del genoma que altera los sitios de reconocimiento de iniciador, y los más reconocidos son los RAPD, SCAR, STS, AFLP Y SSR o microsatélites (Velasco, 2005; Oliveira et al., 2021). En el Cuadro 2, se presentan algunas de las características sobresalientes de los marcadores moleculares.

Cuadro 2. Comparación de los marcadores más utilizados

Característica	RFLP	RAPD	AFLP	SNP	SSR	ISSR
Calidad de ADN requerida	Alta	Moderado	Alto	Alto	Moderado a alto	Moderado a alto
Basado en PCR	No	Si	Si	Si	Si	Si
Número de loci polimórficos por análisis	1.0-3.0	1.5-5.0	20-100	1	1.0-3.0	
Facilidad de uso	No fácil	Fácil	Moderado	Fácil	Fácil	Fácil
Se presta a automatización	Bajo	Moderado	Moderado a Alto	Alto	Alto	Moderado
Reproducibilidad	Alto	Bajo	Alto	Alto	Alto	moderado/alto
Costo por análisis	Alto	Bajo	Moderado	Bajo	Bajo	Bajo a moderado
Dominancia (D) / Codominante (C)	C	D	D	C	C	D
Nivel de polimorfismo	Moderado	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Aplicación primaria	Genética	Diversidad	Diversidad y genética	Todos los propósitos	Todos los propósitos	Diversidad

Elaborado a partir de (Collard et al., 2005; Semagn et al., 2006; Merga, 2025)

2.4.1. Fragmentos de restricción (RFLP)

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) constituyen un enfoque metodológico que permite estudiar el genoma con una gran cobertura ya que evalúa tanto secuencias codificantes (exones) como no codificantes (intrones) (Becerra & Paredes, 2000).

El protocolo se inicia con la digestión enzimática del ADN genómico utilizando endonucleasas de restricción, las cuales producen fragmentos de dimensiones definidas. Posteriormente, estos fragmentos se someten a separación mediante electroforesis en gel de agarosa y, usando la técnica de Southern blot, se transfieren a una membrana de nylon, que luego puede hibridarse con una sonda radiactiva o de otra manera. Los resultados se hacen visibles a través de la autorradiografía (Azofeifa-Delgado, 2006).

Entre las ventajas de usar estos marcadores se encuentran: su codominancia, la ausencia de conocimiento previo con respecto a la secuencia, su herencia mendeliana, y su aplicabilidad a través de cualquier etapa del ciclo de vida de una planta (Becerra y Paredes., 2000; Collard et al., 2005; Semagn et al., 2006; Merga, 2025). Por el contrario, los principales inconvenientes son la clonación de las sondas, la utilización de la radiactividad, y que el procedimiento sea costoso e intensivo en mano de obra (Becerra & Paredes., 2000).

2.4.2. Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)

Esta metodología se basa en el aumento de fragmentos de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores aleatorios que constan de 10 nucleótidos (Azofeifa-Delgado, 2006). Los fragmentos amplificados se separan mediante electroforesis (Becerra y Paredes., 2000). Sus ventajas son la rapidez, viabilidad económica, prerequisites mínimos de ADN, y no requiere aparatos especializados (Becerra & Paredes., 2000; Merga, 2025). No obstante, su limitación primaria reside en la variabilidad de los resultados, que se puede atribuir principalmente a las condiciones de laboratorio (Otero-Arnaiz et al., 1997).

2.4.3. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP)

Se basa en la amplificación selectiva de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de restricción derivados de la digestión integral del ADN. La metodología abarca tres fases: inicialmente, el ADN se escinde enzimáticamente usando endonucleasas de restricción, los adaptadores oligonucleótidos se ligan a cada fragmento, posteriormente la amplificación se ejecuta usando PCR, y en última instancia el gel se somete a análisis (Vos et al., 1995). Entre sus principales ventajas se encuentran: eficiencia temporal y financiera, reproducibilidad, y resolución. Su mérito primario es que producen marcadores dominantes (Vos et al., 1995; Mueller & Wolfenbarger, 1999).

2.4.4. Minisatélites y Microsatélites

Las secuencias repetidas en tándem, como minisatélites (VNTRs) y microsatélites (SSR), se observan ampliamente en organismos eucariotas y se distribuyen por todo el genoma (Azofeifa-Delgado, 2006). Las primeras son secuencias repetitivas que constan de 15-35 pares de bases, que se distinguen por su dominancia y notable reproducibilidad (Becerra y Paredes., 2000; Rentarí Alcántara, 2007). No obstante, su análisis requiere un procedimiento minucioso, incluyendo la clonación preliminar de las sondas, lo que aumenta los gastos experimentales; además, demanda ADN de alta calidad para obtener resultados confiables (Becerra y Paredes., 2000).

Los SSR son secuencias más concisas, que van de 1 a 5 nucleótidos (Condit & Hubbell, 1991), y poseen ventajas como su codominancia y un grado considerable de polimorfismo (Becerra y Paredes., 2000). No obstante, su principal inconveniente reside en las implicaciones financieras y la formulación de los iniciadores requeridos para la amplificación (Becerra & Paredes., 2000; Azofeifa-Delgado, 2006).

1.2.3. Repeticiones simples intercaladas (ISSRs)

La técnica de repetición entre secuencias simples es un método basado en la amplificación entre dos regiones de repetición de microsatélites, la técnica utiliza microsatélites, generalmente de 16 a 25 pb como iniciadores en una reacción de

PCR para amplificar las secuencias inter-SSR de diferentes tamaños (Bornet & Branchard, 2001). La electroforesis de los productos amplificados puede realizarse en geles de agarosa visualizados con bromuro de etidio o en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Los fragmentos obtenidos suelen pesar entre 100 y 2000 pb, y el polimorfismo se determina a partir de la presencia o ausencia de bandas amplificadas. (Rentaría Alcántara, 2007).

En comparación con los iniciadores utilizados en los RAPD, las secuencias de los ISSR son generalmente más largas, lo que mejora la reproducibilidad de las bandas (Rentaría Alcántara, 2007; Reddy et al., 2002).

Una de las principales ventajas de los ISSR es su amplia gama de bandas polimórficas. Por el contrario, la principal restricción de los ISSR es su dominancia. Específicamente, la presencia de una banda no revela si el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto (Rentaría Alcántara, 2007). Además, la diversidad genética viene determinada por el hecho de que cada banda representa un locus con dos alelos, en el que el alelo dominante está en equilibrio con un alelo recesivo según los principios de Hardy-Weinberg (Rentaría Alcántara, 2007; Azofeifa-Delgado, 2006).

2.5. Variabilidad genética en el níspero

La diversidad genética es un parámetro importante para el mejoramiento genético de las distintas características deseadas, la gestión de germoplasma y elaboración de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*. El uso de marcadores moleculares permite determinar de mejor manera la variabilidad genética, ya que no se ve influenciado por los factores ambientales, además de presentar un alto polimorfismo (Badenes et al., 2009).

Al níspero se le describió como especie en 1784 por Thunberg, quien lo incluyó en el género *Mespilus*. Una revisión de su taxonomía por parte de Lindley en 1822 lo refiere como especie del género *Eriobotrya* (Lin et al., 1998; Idrees et al., 2022). Las especies incluidas en este género aún están en discusión (Zhang et al., 2015), por lo que se han estado realizando estudios de cultivares de *E. japonica* desde hace muchos años en el mundo. En China, Japón y España se

han establecido las colecciones más grandes de germoplasma (Zheng, 2007; Martínez-Calvo et al., 2008; Badenes et al., 2013) y muchos otros estudios de cultivares en todos los países donde el cultivo está presente: Pakistán (Hussain et al., 2009, 2011), Turquía (Polat & Caliskan, 2007), y España (Martínez-Calvo et al., 1999). China cuenta con el depósito más grande del germoplasma y mayor diversidad de esta especie con más de 1,000 accesiones descritas en las diversas colecciones (Zheng, 2007). Una proporción considerable de los esfuerzos de investigación que se han llevado a cabo gira principalmente en torno a los procesos de identificación y clasificación de las diversas accesiones que están presentes en las colecciones existentes, con el objetivo de entender cuáles de estas accesiones muestran los rasgos y características más ventajosos que podrían aprovecharse y utilizarse en el desarrollo de mejora genética. Japón es el segundo país en diversidad de esta especie, Fujisaki (1994) caracterizó 40 cultivares que se mantienen en el Instituto Nacional de Ciencia de Árboles Frutales (Badenes et al., 2013). Los países europeos mediterráneos cuentan con la tercer mayor diversidad de esta especie en el mundo, este germoplasma europeo se encuentra en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en Valencia, España (Blasco et al., 2014).

En general, el uso de germoplasma de níspero en el mundo ha sido bajo, por lo que mucho se valoran las investigaciones sobre la diversidad genética y las relaciones entre los diferentes cultivares que se han realizado con germoplasma de los países mayormente productores como China y Japón. Estos resultados son de gran importancia para la conservación de los recursos genéticos y para las iniciativas de mejoramiento e intercambio de materiales a nivel nacional e internacional. (He et al., 2011). En China (Shih, 2007; Zheng, 2007); Japón (Badenes et al., 2013) y recientemente en España (Gisbert et al., 2009) se ha iniciado la mejora del níspero mediante programas de mejoramiento y selección de accesiones a partir del germoplasma disponible. Varios tipos de marcadores moleculares se han utilizado para la caracterización molecular del níspero, como Isoenzimas, RAPDs, AFLPs, TRAP, ISSR y SSRs, secuencias de ITS de ADNr para determinar diversidad genética en cultivares, especies afines y especies

silvestres, identificación de cultivares, análisis de pedigrí y mapeo genético, además de obtener información sobre genética básica como su polimorfismo y filogenia (Soriano et al., 2005; Gisbert et al., 2007; Xie et al., 2007; Martínez-Calvo et al., 2008; Gisbert et al., 2009; Wang et al., 2010; He et al., 2011; Xiang et al., 2011; Xiaoying et al., 2011; Zhao et al., 2011; Fan et al., 2012; Fukuda et al., 2013; Wu et al., 2015; Yanchun et al., 2015; Sevindik et al., 2020; Nagano et al., 2022).

La información sugiere que, aparte de China, Japón y España, la variabilidad del germoplasma de esta especie sigue infrautilizada en la mayoría de las naciones, lo que significa que la diversidad genética como recurso está lista para ser aprovechada en el desarrollo de cultivares; específicamente en México, se ha descuidado la caracterización y utilización de esta diversidad genética, representando una oportunidad para avanzar en la investigación, particularmente en regiones económica y culturalmente significativas para los nísperos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la variabilidad de poblaciones cultivadas de *Eriobotrya japonica* de tres estados de México mediante su caracterización molecular.

3.2. Objetivos específicos

Identificar iniciadores ISSRs que permitan obtener las mejores huellas genómicas para níspero.

Caracterizar molecularmente poblaciones de *Eriobotrya japonica* del Estado de México, Oaxaca y Veracruz mediante marcadores ISSR a partir de tejido foliar.

4. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Eriobotrya japonica* en los estados de Veracruz, Oaxaca y México presentan una variabilidad genética diferenciada debido a las condiciones ambientales y ecológicas particulares de cada región. Esta variabilidad puede ser identificada y caracterizada mediante marcadores ISSR, lo que reflejaría la adaptación local de las poblaciones a sus respectivos ambientes.

5. METAS

Generar una base de datos sobre diversidad genética de poblaciones mexicanas de níspero cultivado en tres entidades de México como referencia para programas de mejoramiento genético.

Obtener un protocolo para la caracterización molecular de poblaciones de esta especie, útil para futuras investigaciones.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitio experimental

Este estudio se realizó en el laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido dentro del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicado a una altitud de 2250 metros sobre la carretera México-Texcoco (km 38.5), con coordenadas geográficas de 19°29'23" N 98°53'37" W, experimentando una temperatura promedio anual de 15 °C y precipitación anual de 645 mm (García, 2004).

6.2. Material Vegetal

La colecta del material vegetal se realizó en el mes de octubre del 2024. Para ello, se colectaron 10 hojas jóvenes y sanas por árbol, considerando tres repeticiones y seleccionando veinte árboles distintos por población. En total se realizaron cuatro muestreos: Dos en el Estado de México, en la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C., localizada en Coatepec Harinas, y en Temascaltepec de González; y dos adicionales en plantaciones rusticas del vivero EL HUERTO "Vegetales naturales" en San Agustín Etla, Oaxaca, y en Huatusco de Chicuellar, Veracruz.

Posteriormente, las muestras recolectadas fueron colocadas cuidadosamente en bolsas plásticas debidamente etiquetadas y almacenadas en una hielera para su conservación y transporte al Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la Universidad Autónoma Chapingo. Aunque inicialmente se colectó un mayor número de muestras, debido a diversos problemas presentados durante el procesamiento y análisis del material vegetal, únicamente se utilizaron 65 accesiones para los análisis finales, las cuales se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Genotipos de Níspero (*Eriobotrya japonica*) utilizados en la caracterización molecular con ISSR

Lugar de colecta	Accesión	Altitud (m.s.n.m.)	Coordenadas	
			Latitud (N) ° ' "	Longitud (O) ° ' "
Temascaltepec, Edo. Méx.	G01	2050	19 02 51.85	99 58 42.91
Temascaltepec, Edo. Méx.	G03	2050	19 02 51.03	99 58 43.60
Temascaltepec, Edo. Méx.	G06	2050	19 02 51.35	99 58 42.44
Temascaltepec, Edo. Méx.	G07	2050	19 02 51.51	99 58 42.14
Temascaltepec, Edo. Méx.	G08	2050	19 02 51.48	99 58 43.13
Temascaltepec, Edo. Méx.	G09	2050	19 02 51.09	99 58 42.41
Temascaltepec, Edo. Méx.	G10	2050	19 02 51.43	99 58 41.98
Temascaltepec, Edo. Méx.	G11	2050	19 02 51.53	99 58 42.55
Temascaltepec, Edo. Méx.	G12	2050	19 02 51.01	99 58 42.20
Temascaltepec, Edo. Méx.	G13	2050	19 02 50.85	99 58 41.78
Temascaltepec, Edo. Méx.	G14	2050	19 02 51.05	99 58 41.20
Temascaltepec, Edo. Méx.	G15	2050	19 02 52.00	99 58 42.35
Temascaltepec, Edo. Méx.	G17	2050	19 02 51.65	99 58 41.70
Temascaltepec, Edo. Méx.	G18	2050	19 02 50.93	99 58 41.30
Temascaltepec, Edo. Méx.	G19	2050	19 02 50.23	99 58 41.37
Temascaltepec, Edo. Méx.	G20	2050	19 02 50.95	99 58 41.35
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G21	2220	18 55 07.43	99 45 30.05
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G22	2220	18 55 07.10	99 45 29.77
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G24	2220	18 55 07.11	99 45 31.01
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G26	2220	18 55 06.42	99 45 32.05
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G27	2220	18 55 06.35	99 45 31.90
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G28	2220	18 55 06.56	99 45 31.77
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G29	2220	18 55 06.66	99 45 33.36
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G30	2220	18 55 06.72	99 45 31.94
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G31	2220	18 55 06.30	99 45 32.72
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G32	2220	18 55 22.49	99 45 43.62
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G33	2220		
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G34	2220	18 55 06.38	99 45 33.45
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G35	2220	18 55 06.44	99 45 33.47
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G36	2220	18 55 22.49	99 45 43.62
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G37	2220	18 55 05.84	99 45 33.85
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G38	2220	18 55 05.77	99 45 33.68
Coatepec de Harinas, Edo. Méx.	G40	2220	18 55 06.72	99 45 37.76
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G41	1823	19 11 37.78	97 02 00.70
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G42	1823	19 11 38.31	97 02 00.40
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G43	1828	19 11 38.13	97 02 00.35
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G44	1824	19 11 38.49	97 02 00.07
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G46	1826	19 11 38.69	97 01 59.67

Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G47	1820	19 11 38.50	97 01 54.52
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G48	1820	19 11 38.88	97 01 59.26
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G51	1814	19 11 38.79	97 01 59.13
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G52	1813	19 11 39.10	97 01 58.72
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G54	1811	19 11 38.31	97 01 59.87
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G56	1831	19 11 38.10	97 02 00.53
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G57	1844	19 11 38.02	97 02 00.49
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G58	1829	19 11 37.80	97 02 00.58
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G59	1817	19 11 37.94	97 02 00.44
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G60	1810	19 11 37.48	97 01 59.62
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G61	1817	19 11 37.78	97 01 58.84
Huatusco de Chicuellar, Veracruz	G62	1818	19 11 37.16	97 01 59.10
San Agustín Etla, Oaxaca	G73	1831	19 11 00.69	97 02 13.18
San Agustín Etla, Oaxaca	G74	1855	19 11 01.00	97 02 13.16
San Agustín Etla, Oaxaca	G76	1861	19 11 00.57	97 02 12.88
San Agustín Etla, Oaxaca	G77	1859	19 11 00.84	97 02 12.72
San Agustín Etla, Oaxaca	G78	1846	19 11 00.99	97 02 12.89
San Agustín Etla, Oaxaca	G79	1857	19 11 01.26	97 02 12.87
San Agustín Etla, Oaxaca	G81	1855	19 11 01.20	97 02 12.67
San Agustín Etla, Oaxaca	G83	1864	19 11 00.97	97 02 12.22
San Agustín Etla, Oaxaca	G85	1851	19 11 00.70	97 02 12.29
San Agustín Etla, Oaxaca	G88	1837	19 11 00.34	97 02 11.52
San Agustín Etla, Oaxaca	G89	1823	19 11 00.26	97 02 11.42
San Agustín Etla, Oaxaca	G90	1835	19 11 00.65	97 02 11.24
San Agustín Etla, Oaxaca	G91	1843	19 11 00.61	97 02 11.48
San Agustín Etla, Oaxaca	G92	1859	19 10 59.63	97 02 11.04
San Agustín Etla, Oaxaca	G93	1858	19 10 59.57	97 02 10.65

6.3. Caracterización molecular

En la Figura 2 se presentan de manera general las principales etapas llevadas a cabo durante el proceso de caracterización molecular de las muestras analizadas.



Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de caracterización molecular.

6.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de Murray y Thompson (1980), la cual permite aislar ADN vegetal de alto peso molecular. Para ello por cada accesión se utilizó 0.3 g de tejido pulverizado en nitrógeno líquido, al cual se le añadió el amortiguador de extracción, se centrifugó y a la pastilla conteniendo los ácidos nucleicos se le agregó ARNasa para desnaturalizar el ARN y conseguir exclusivamente ADN. Se realizaron tres repeticiones por accesión. Para aquellas que no alcanzaron la pureza requerida, se le realizó el proceso de fenolización, el cual consiste en concentrar en un sólo microtubo de 1.5 mL el ADN obtenido en las tres repeticiones. Posteriormente, se añadió un volumen de Fenol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 21,000 xg durante 5 minutos. De las dos fases resultantes, se recuperó la fase superior y se transfirió a un nuevo microtubo, donde se agregó un volumen de cloroformo, la mezcla se agitó por inversión durante dos minutos y se centrifugó nuevamente a 21,000 xg

por 5 minutos. Una vez más se recuperó la fase superior y se transfirió a otro microtubo, en el cual se le añadió un volumen de isopropanol, después se mezcló por inversión y se almacenó a -20 °C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 21,000 xg durante 5 minutos, se descartó cuidadosamente el sobrenadante sin perder la pastilla de ADN, y los microtubos se dejaron escurrir sobre una toalla sanitaria durante aproximadamente 5 minutos. Después las muestras se colocaron en un termobloque a 40 °C durante 15 minutos, con la finalidad de evaporar el alcohol presente en la muestra. Finalmente, la pastilla de ADN se disolvió en 50 mL de TE y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.4.1. Cuantificación del ADN

La concentración del ADN de doble cadena (dsDNA) se midió en un espectrofotómetro Nanodrop™ Lite (Thermo Scientific, DNA Factor: 50), que mide la absorbancia a 260 nm para cuantificar la concentración de ADN (ng mL⁻¹) y evalúa la pureza a partir de la relación A260/A280 (Cuadro 4). Con los rendimientos obtenidos, se seleccionaron las mejores y posteriormente se diluyeron con objeto de obtener una concentración homogénea de 10 ng mL⁻¹.

Cuadro 4. Valores de pureza de ADN (Absorbancia A260/A280)

Valor A260/A280	Pureza
>2.1	Contaminación de ARN
1.8-2	ADN pureza optima
1.6-1.8	ADN pureza aceptable
<1.6	Presencia de compuestos aromáticos
<1.5	Contaminación sales, carbohidratos y fenoles

6.4.2. Pruebas de calidad

Para evaluar la calidad del ADN se utilizaron las muestras previamente diluidas de cada accesión, las cuales fueron amplificadas mediante PCR usando el iniciador 16 S. La mezcla de reacción se conformó por 2.5 µL de ADN (10 ng µL⁻¹) y 22.5 µL de la mezcla de reacción (Cuadro 5). La calidad de los productos amplificados se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 8 %, sumergido en amortiguador TAE 0.25 X (Tris–Acetato–EDTA). La electroforesis se realizó a 100 V durante 80 minutos, deteniendo la corriente cuando las

muestras alcanzaron dos tercios de la longitud del gel. Posteriormente el gel se transfirió a una solución de bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 15 minutos para su tinción. Una vez finalizado este proceso, el gel se colocó en el Transluminador UVP Gel Imaging System – DigiDoc-It 120 y la imagen fue fotodocumentada mediante una cámara Kodak EDAS 290.

Cuadro 5. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR con 16S.

Componentes de la mezcla	Base	Final	1X
H ₂ O grado biología molecular			4.7
DNTPs	500 μM	200 μM	10
Amortiguador	10X	1X	2.5
Mgcl ₂	50 Mm	3mM	3
16 S ₁	10 pmoles μL^{-1}	10 pmoles/ reacción	1
16 S ₂	10 pmoles μL^{-1}	10 pmoles/ reacción	1
Taq polimerasa	5 U μL^{-1}	1.5 U/reacción	0.3
ADN	10 ng μL^{-1}	25 ng/reacción	2.5
			25 L

6.4.3. PCR de los iniciadores finales

El ADN de las diferentes accesiones se amplificó mediante la técnica molecular ISSR. Para seleccionar los mejores iniciadores, se probaron 60 iniciadores aleatorios en una muestra al azar, con el fin de identificar aquéllos capaces de generar patrones de bandas claramente observables y con mayor polimorfismo (Cuadro 6). Una vez seleccionados se procedió a amplificar todas las muestras.

Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de *Eriobotrya japonica*.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Ta (°C)
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	58
ISSR3	(GA) ₈ CTC	45
ISSR5	(AC) ₈ CTA	56
ISSR6	(AC) ₈ CTG	58
ISSR7	(AG) ₈ CTG	54
ISSR8	(AC) ₈ CTT	56
ISSR9	(AG) ₈ C	52
ISSR10	(GA) ₈ T	50
UBC815	(CT) ₈ G	52

Ta: Temperatura de alineamiento, A: adenina, G: guanina, C: citocina, T: timina.

Para las reacciones de PCR, se prepararon 25 µL de una mezcla de reacción con los componentes descritos en el Cuadro 7. Las mezclas de reacción se homogeneizaron por inversión y se colocaron en un termociclador de 96 pocillos Veriti™ HID, de la marca Applied Biosystems™. Las condiciones para llevar a cabo la amplificación fueron las siguientes: Pre-desnaturalización a una temperatura de 93 °C durante 1 minuto (1 ciclo); seguida de una desnaturalización a 93 °C durante 20 segundos (40 ciclos); alineamiento a la temperatura específica de cada iniciador durante 1 minuto con un (40 ciclos); extensión a 72 °C durante 6 minutos (40 ciclos); y una extensión final a 72 °C durante 6 minutos (1 ciclo). Finalmente, los productos se conservaron a 4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.8 %, sumergidos en solución amortiguadora TAE al 0.25 %. Se cargaron 16 µL de ADN previamente mezclados con 4.0 µL de amortiguador de bromofenol (sacarosa 65.0 %, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0.3 %). En los extremos del gel se colocó un marcador de 1 kb (DNA Ladder Thermo Fisher Scientific Tm). La corrida se realizó a 100 V durante 80 minutos, interrumpiéndose cuando el colorante alcanzó aproximadamente dos tercios del gel. Posteriormente, el gel se extrajo y se colocó en una solución de bromuro de

etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 15 minutos y finalmente se documentó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta equipado con cámara fotográfica.

Cuadro 7. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR con iniciadores ISSR.

Componentes de la mezcla	Base	Final	1X
H ₂ O grado biología molecular			3.7
dNTPs	500 μM	200 μM	10
Amortiguador	10X	1X	2.5
Mgcl ₂	50 Mm	3mM	3
Iniciador	10 ng μL^{-1}	30 ng/reacción	3
Taq polimerasa	5 U μL^{-1}	1.5 U/reacción	0.3
ADN	20 ng μL^{-1}	50 ng/reacción	2.5
			25 L

6.4.4. Análisis estadístico

Los patrones ISSR generados por las 65 accesiones se utilizaron para la elaboración de la matriz básica de datos (MBD) en la cual se registró con un valor de 1 la presencia de una determinada banda y con 0 su ausencia. Esta matriz se empleó para calcular las distancias genéticas entre los materiales evaluados y estimar el grado de diversidad genética entre y dentro de las colectas utilizando el programa Infogen® de la Universidad de Córdoba, Argentina. Posteriormente, se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el criterio de varianza mínima de Ward y el coeficiente de similitud de Jaccard (1-S) para la construcción del dendrograma. La altura de corte para definir el número de grupos se definió mediante el criterio cubico de agrupamiento y las pseudo estadísticas T² (Hotelling, 1951).

Asimismo, con el objetivo de explorar la estructura jerárquica de la variación genética, se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado en Infogen® a partir de la matriz de distancias genéticas de Jaccard (1-S) y utilizando como criterio de agrupación las poblaciones.

Adicionalmente, se realizó un análisis descriptivo de los marcadores con el programa Infogen® con el objetivo de identificar los iniciadores que brindaron más información en la comparación entre accesiones. Este programa calcula por

defecto, para cada marcador (o grupo de marcador) las siguientes variables: el número de bandas polimórficas (BP), monomórficas (BM) y totales (BT), la proporción de loci polimórficos (PMF), el contenido de información polimórfica (PIC), el error estándar del PIC (EE), el porcentaje de amplificación (porcentaje de datos iguales a 1) (AMP) y la probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo (PDICMA) calculada como $P_i(X_D)^n$, donde (X_D) representa el índice de similitud promedio para todos los pares de comparaciones, calculado como $X_D = (2N_{AB}) / (N_A + N_B)$, donde N_{AB} representa el número de bandas presentes en ambas muestras, N_A y N_B representan el número total de bandas en las muestras A y B respectivamente, y n representa el número promedio de productos de amplificación por muestra (Wetton et al., 1987).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Análisis de agrupamiento

A partir de la matriz de datos básica (MBD) se calcularon las distancias genéticas utilizando el coeficiente de Jaccard (1-S), ampliamente utilizado para el análisis de datos binarios ya que considera únicamente la presencia compartida de bandas entre individuos y excluye las coincidencias por ausencia de amplificación, evitando sobreestimar la similitud genética en matrices binarias (Batyrrshin & Rudas, 2024). Este coeficiente ha demostrado ser particularmente útil en estudios de diversidad genética vegetal con marcadores ISSR, RAPD Y AFLP (Podani et al., 2018; Chung et al., 2019).

Con base en la matriz de distancias genéticas se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el método de varianza mínima de Ward, el cual permitió generar el dendrograma correspondiente (Figura 3). Al establecerse un punto de corte de 1.35 se identificaron cuatro grupos principales. Sin embargo, las accesiones no se agruparon estrictamente de acuerdo con su origen geográfico. Se observó que materiales provenientes de Huatusco de Chicuellar, Veracruz se asociaron con accesiones de San Agustín Etla, Oaxaca y del Estado de México, lo cual evidencia una alta similitud genética entre accesiones de distintas procedencias.

El grupo I estuvo conformado por 22 accesiones, la mayoría provenientes de las poblaciones pertenecientes al Estado de México, con únicamente dos accesiones pertenecientes a otras procedencias. Este agrupamiento sugiere la existencia de cierto grado de similitud genética regional. El grupo II integró siete accesiones, de las cuales cuatro correspondieron a Huatusco de Chicuellar, Veracruz, dos a San Agustín Etla, Oaxaca y una a la población 1 del Estado de México (Temascaltepec), nuevamente evidenciando relaciones genéticas entre materiales de distintas regiones. El grupo III estuvo constituido por catorce accesiones, incluyendo una accesión de la población uno (Temascaltepec), tres de la población dos (Coatepec de Harinas), dos de San Agustín Etla, Oaxaca, y ocho de Huatusco de Chicuellar, Veracruz, mostrando nuevamente una mezcla

de procedencias geográficas. Finalmente, el grupo IV agrupó veintidós accesiones, integradas por tres individuos provenientes de la población uno, cinco de la población dos, diez de San Agustín Etla, Oaxaca y cuatro de Huatusco de Chicuellar, Veracruz.

La ausencia de agrupamientos geográficos definidos sugiere una reducida estructuración genética poblacional, fenómeno frecuentemente reportado en especies frutales perennes propagadas vegetativamente. En cultivos como el níspero, la movilización de germoplasma entre regiones, el intercambio de material vegetal entre productores y la propagación vegetativa mediante injertos favorecen el flujo génico y contribuyen a la homogenización entre poblaciones geográficamente distantes (Blasco et al., 2014). No obstante, esta reducida diferenciación genética también podría estar asociada a la propagación predominante por semillas en muchas zonas productoras, particularmente en huertos tradicionales, lo que promueve un flujo génico elevado y una amplia variabilidad dentro de las poblaciones, disminuyendo así la diferenciación genética entre regiones (Ennos, 1994; Kamm et al., 2009; Schroeder et al., 2014; Seoane et al., 2019; Cristóbal-Pérez et al., 2020; Xiang et al., 2020).

En este contexto, Nagano et al. (2022) usando marcadores SNP adquiridos a través de RAD-seq, descubrieron que numerosos cultivares de Japón, China, México, Estados Unidos, Grecia e Israel mostraron linajes genéticos similares, lo que ilustra una considerable movilización de germoplasma impulsada por influencias antropogénicas. Los autores observaron que numerosas variedades cultivadas se derivan de recursos genéticos importados de China y posteriormente diseminados en varias regiones.

De manera similar, Wang et al. (2010) , mediante el análisis de una colección de germoplasma de *Eriobotrya japonica* utilizando marcadores ISSR, reportaron una variabilidad genética relativamente limitada entre los materiales analizados y una estrecha relación genética entre diversas accesiones cultivadas. Los autores sugirieron que esta reducida diferenciación genética podría estar asociada al origen común de muchos cultivares.

Patrones comparables han sido reportados en otras especies perennes. Yan et al. (2019) analizaron la estructura genética de *Mallotus oblongifolius* mediante marcadores ISSR y SRAP, reportando una elevada conectividad genética entre poblaciones. Asimismo, Kameyama et al. (2017), en poblaciones de *Cinnamomum camphora*, detectaron que las poblaciones cultivadas presentaban composiciones genéticas diferentes a las poblaciones naturales circundantes, fenómeno atribuido a la transferencia regional de materiales propagativos realizada por actividades humanas. Del mismo modo, Bourguiba et al. (2010), en poblaciones de albaricoque en Túnez, observaron una baja estructuración genética entre grupos geográficos, atribuida al manejo humano y a la propagación de cultivares mediante injerto y semilla.

Asimismo, investigaciones en cultivos clonales como olivo (Koehmstedt et al., 2011; Díez et al., 2016) han demostrado que la propagación vegetativa favorece la conservación de genotipos similares en regiones distantes, produciendo agrupamientos genéticos mixtos y baja diferenciación poblacional.

En conjunto, los patrones observados indicaron que la variabilidad genética presente en las accesiones analizadas no depende exclusivamente de la ubicación geográfica, sino también de factores relacionados con el manejo agronómico, el origen del material propagativo y a la historia de domesticación y dispersión del cultivo (McKey et al., 2010; Allaby, 2019). Estos resultados indicaron que existe una considerable diversidad genética dentro de las accesiones estudiadas, lo cual representa un recurso valioso para futuros programas de conservación, caracterización y mejoramiento genético del níspero en México.

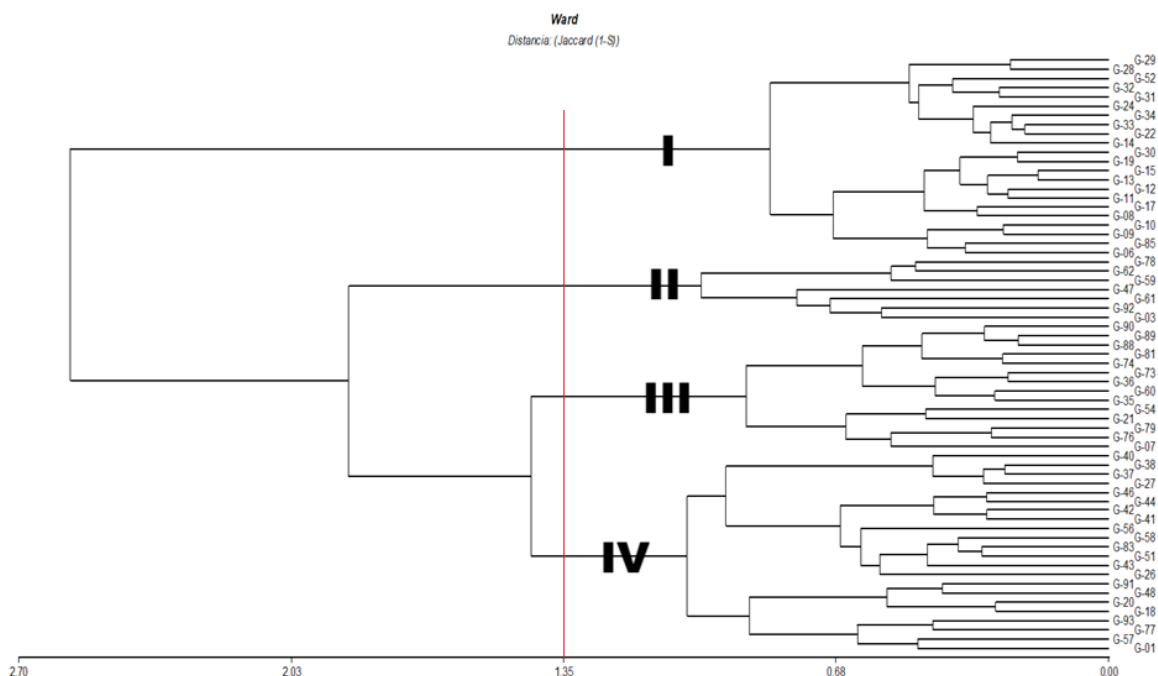


Figura 3. Dendrograma de 65 accesiones de *Eriobotrya japonica* construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard (1-S).

7.2. Análisis de coordenadas principales

La variabilidad genética se visualizó mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando la matriz de distancias genéticas obtenida con el coeficiente de Jaccard (1-S). Este análisis es útil para visualizar datos donde se aplican distancias no euclidianas, para describir la disimilitud de pares entre muestras (Shi et al., 2020). Las gráficas PCoA son representaciones gráficas donde se trazan las coordenadas principales para mostrar el agrupamiento de muestras con base en datos genéticos o ecológicos (Wang et al., 2019). Es crucial para explicar las conformaciones moleculares, predecir el comportamiento molecular y comprender las interacciones de la diversidad genética (Gaydos et al., 2013).

Los dos componentes principales explicaron el 89.7 % de la variación total, indicando que el modelo representa adecuadamente las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones estudiadas (Figura 4).

El primer componente principal explicó el 53.9 % de la variabilidad genética y permitió distinguir principalmente a la población proveniente de Veracruz con respecto de las poblaciones del Estado de México. Por su parte, el segundo componente explicó el 35.8 % de la variación total y separó a la población de San Agustín Etla, Oaxaca del resto de los grupos analizados. Estos resultados evidencian la existencia de diferenciación genética parcial entre algunas poblaciones, aunque sin una separación completamente definida.

Las poblaciones correspondientes al Estado de México se localizaron próximas entre sí en el cuadrante inferior izquierdo del gráfico, lo que sugiere una elevada afinidad genética y posiblemente un origen relacionado o intercambio frecuente de material vegetal entre localidades cercanas. En contraste, la población correspondiente a Huatusco de Chicuellar, Veracruz mostró una marcada separación a lo largo del CP1, indicando una diferenciación genética importante con respecto a las poblaciones del Estado de México. Esta divergencia genética podría estar asociada a diferencias en el origen del germoplasma, procesos de adaptación local o condiciones ambientales particulares de la región.

Por otra parte, la población de San Agustín Etla, Oaxaca presentó una diferenciación principalmente asociada al segundo componente principal, lo que indica la existencia de una composición genética parcialmente independiente de las poblaciones restantes. La separación observada en un eje distinto sugiere que los factores responsables de la variación genética en esta población difieren de aquellos que explican la diferenciación de Huatusco de Chicuellar, Veracruz.

La distribución observada en el análisis de coordenadas principales coincide parcialmente con los patrones detectados en el dendrograma de agrupamiento, donde algunas accesiones mostraron mezclas entre regiones geográficas. No obstante, el análisis de coordenadas principales permitió visualizar de manera más clara las relaciones genéticas entre poblaciones, evidenciando que ciertas regiones conservan características particulares aun cuando existe similitud entre algunas accesiones.

Hallazgos similares han sido documentados en investigaciones de variabilidad genética en *Eriobotrya japonica* usando marcadores moleculares y análisis multivariados. En este contexto, Nagano et al. (2022) reportaron que el análisis de coordenadas principales (PCoA) permitió la identificación de clústeres genéticos claramente clasificado; sin embargo, estos conglomerados no reflejan de manera uniforme una correlación precisa con la procedencia geográfica de las accesiones, la cual se ha adscrito a fenómenos de intercambio de germoplasma, domesticación, y selección intencional en taxones cultivados. De igual manera, Yanchun et al. (2015) indicaron, mediante la aplicación de marcadores SSR y SRAP, una variabilidad genética significativa dentro del germoplasma de esta especie, así como la formación de grupos genéticos que no son rigurosamente congruentes con la procedencia geográfica de las accesiones. Colectivamente, estos contextos refuerzan la arquitectura genética discernida en la investigación actual, afirmando la uniformidad de los patrones de agrupamiento observados.

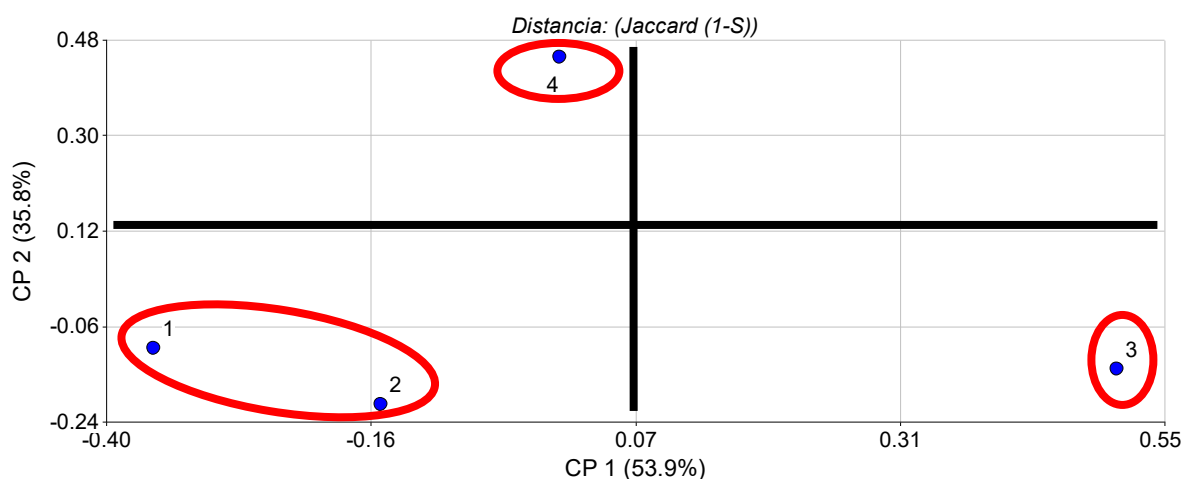


Figura 4. Análisis de coordenadas principales de 65 accesiones de *Eriobotrya japonica* utilizando marcadores moleculares ISSR.

7.3. Análisis de varianza molecular

El Cuadro AMOVA (Cuadro 8) mostró que la totalidad de la variación genética se concentró dentro de las poblaciones analizadas. Los resultados indicaron que el 100 % de la variación molecular correspondió a la variación intrapoblacional, mientras que la variación entre poblaciones fue nula (0 %). Asimismo, el componente de varianza entre poblaciones presento un valor de 0.00 y un valor

de significancia no significativo ($p > 0.9999$), lo que evidencia la ausencia de diferenciación genética estadísticamente detectable entre las poblaciones evaluadas.

De acuerdo con Excoffier et al. (1992); Huang et al. (2019, 2021), el análisis de varianza molecular, comúnmente abreviado como AMOVA, es una técnica estadística que se usa en el ámbito de la genética de poblaciones para dividir sistemáticamente la variación genética tanto dentro de poblaciones individuales como entre poblaciones distintas. Cuando la mayor proporción de variación se concentra dentro de las poblaciones, este patrón se interpreta como evidencia de una baja estructuración genética y de una elevada similitud genética entre grupos (Kuznetsov, 2021). En este sentido, los resultados obtenidos indican que la diversidad genética presente en las accesiones evaluadas se distribuye principalmente entre individuos pertenecientes a una misma población, más que entre poblaciones geográficamente diferenciadas.

No obstante, la interpretación de los resultados requiere precaución debido a las limitaciones de AMOVA en la detección de la diferenciación genética basada en el tamaño de la muestra y el número de población. Fitzpatrick (2009) observó que las evaluaciones con menos de seis poblaciones debilitan la capacidad de las pruebas de permutación para revelar diferencias significativas a pesar de alguna diferenciación genética. De esta manera, la replicación limitada disminuye el poder estadístico y complica la evaluación precisa de la dinámica genética entre poblaciones.

Asimismo, Hedrick (2005) indicó que los índices clásicos de diferenciación genética pueden verse influenciados por los niveles de diversidad genética intrapoblacional, particularmente cuando se usan marcadores altamente polimórficos. Bajo estas condiciones, valores bajos de diferenciación obtenidos mediante AMOVA no necesariamente implican ausencia total de estructura genética, sino que pueden reflejar una elevada variabilidad genética dentro de las poblaciones analizadas.

En estudios realizados con marcadores moleculares ISSR y RAPD, se ha reportado que especies cultivadas presentan repetidamente una mayor proporción de variabilidad genética dentro de las poblaciones que entre ellas. En el estudio de Marsafari y Mehrabi (2013), en la especie *Phoenix dactylifera* mostró una variabilidad genética del 95 % y el 97 % dentro de las poblaciones a través de los marcadores ISSR y RAPD, respectivamente. Esto indica una similitud genética sustancial entre los individuos de la misma población, probablemente atribuida a un origen compartido y a prácticas de reproducción comunes. De igual manera Ayangla et al. (2026) en su investigación de *Glycyrrhiza glabra*, documentaron que 85 % de la variación genética general adquirida a través de RAPD y 81 % a través de ISSR se concentró dentro de las poblaciones, demostrando además una elevada variabilidad intrapoblacional y mínima diferenciación entre poblaciones. En conjunto, estos resultados respaldan la idea de que la diversidad genética en las especies cultivadas generalmente se sostiene predominantemente dentro de las poblaciones, promovida por la ascendencia común, el intercambio de material vegetal y el flujo de genes entre regiones.

Esto se alinea con lo que fue señalado por Nybom et al. (2014) quienes articularon que la dinámica de la diversidad genética y la diferenciación poblacional en taxones vegetales están moduladas por diversos determinantes biológicos y metodológicos, abarcando el sistema reproductivo, flujo de genes, linaje evolutivo, magnitud poblacional, y la categoría de marcador molecular usado. Los autores subrayan que las especies alógamas y perennes tienden a sostener una mayor proporción de variación genética dentro de sus poblaciones, mientras que las especies autógamas exhiben una diferenciación más pronunciada entre poblaciones. También enfatizan que el flujo de genes promueve la homogeneización genética y disminuye la estructuración poblacional. En última instancia, aseveran que la utilización de diversos marcadores moleculares puede producir estimaciones dispares de diversidad genética y diferenciación debido a sus características inherentes y niveles de

polimorfismo, lo que dilucida las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos con ISSR y RAPD en las indagaciones antes mencionadas.

Cuadro 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de 65 accesiones de *Eriobotrya japonica* utilizando marcadores ISSR.

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Comp. varianza	Variación (%)
Entre poblaciones	0.90	3	0.30	>0.9999	0.00	0.00
Dentro de las poblaciones	8.52	61	0.14	>0.9999	0.14	100.00
Total	7.62	64	0.12		0.14	100.00

F.V: Fuentes de variación; SC: Suma de cuadrados; gl: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios

7.4. Descriptiva de Marcadores

El Cuadro 9 presenta la estadística descriptiva de los marcadores. En el análisis de las 65 accesiones de níspero (*Eriobotrya japonica*) no se detectaron genotipos duplicados. En total, se amplificaron 64 bandas, sin registrarse bandas repetidas, de las cuales 61 fueron polimórficas, lo que representa un 95.31 % de polimorfismo. Esto es consistente con lo reportado en diversos estudios previos, donde porcentajes de polimorfismo superiores a 70 % reflejan una elevada capacidad discriminante y una adecuada cobertura del genoma por parte de los iniciadores ISSR (Xie et al., 2007; Wang et al., 2010; Fan et al., 2012; Li, 2012).

El iniciador con mayor cantidad de bandas amplificadas fue el ISSR-8, con 12 bandas, y un 33.08 % de amplificación a través de las 65 muestras. Estos resultados sugieren que los iniciadores utilizados poseen una moderada capacidad para detectar variación genética dentro del germoplasma evaluado.

Estudios previos en níspero han reportado altos porcentajes de polimorfismo mediante ISSR, atribuyendo este comportamiento a la elevada sensibilidad de estos marcadores para detectar variación intraespecífica. En este contexto, Wang et al. (2010) reportaron un elevado nivel de variabilidad genética en una colección de germoplasma de níspero evaluada con marcadores ISSR, al registrar una tasa de polimorfismo de 89.9 % entre 41 accesiones de nísperos, mientras que, Fan

et al. (2012), demostraron la efectividad de los marcadores ISSR para la identificación y diferenciación de nuevos germoplasmas de níspero en la región de Guizhou, China, al reportar una alta tasa de polimorfismo (91.3 %) en 18 cultivares de níspero y líneas recién desarrolladas, con 157 bandas polimórficas de un total de 172, lo que evidencia una amplia diversidad genética, dentro del material examinado y confirma la eficacia de los marcadores ISSR para la caracterización molecular y diferenciación de genotipos dentro de esta especie.

En cuanto al contenido de información polimórfica (PIC), los valores oscilaron entre 0.26 y 0.31, valores considerados moderadamente informativos para marcadores dominantes según Botstein et al. (1980), donde valores de PIC inferiores a 0.25 se consideran poco informativos, mientras que valores entre 0.25 y 0.50 indican marcadores moderadamente informativos y útiles para estudios de diversidad genética (Kumar et al., 2021).

El marcador ISSR-3, presentó el mayor valor de PIC, seguido de ISSR-6, ISSR-8, ISSR-9, UBC-815, todos ellos con valores cercanos a 0.30. Estos resultados indican que dichos iniciadores poseen una elevada eficiencia para distinguir genotipos y detectar variabilidad genética entre accesiones.

Los bajos valores de error estándar del PIC (0.01 - 0.05) sugieren una alta precisión en la estimación del PIC, así como consistencia en los datos obtenidos. Asimismo, el porcentaje de amplificación (AMP) varió entre 33.08 % y 61.28 %, con un promedio general de 49.59 %, indicando una adecuada frecuencia de amplificación de bandas entre las muestras evaluadas. El iniciador ISSR3 presentó el mayor porcentaje de amplificación (61.28 %), lo que sugiere una amplia distribución de sus loci entre las accesiones analizadas.

Finalmente, los valores extremadamente bajos de PDICMA (Probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar) evidencian un elevado poder discriminante de los iniciadores ISSR utilizados. Valores del orden de 10^{-5} hasta 10^{-15} indican una probabilidad muy reducida de que dos individuos presenten perfiles genéticos idénticos de manera aleatoria. Esto demuestra que los marcadores utilizados son altamente eficientes para diferenciar accesiones,

incluso entre individuos genéticamente relacionados. La probabilidad acumulada total (3.2E-100) confirma la gran capacidad de discriminación conjunta del sistema de marcadores utilizado.

Cuadro 9. Descriptiva de marcadores ISSR para *Eriobotrya japonica*.

Primer	BP	BM	BT	PMF (95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR1	4	2	6	0.67	0.26	0.04	48.72	1.4E-05
ISSR3	6	0	6	1.00	0.31	0.02	61.28	2.8E-15
ISSR5	7	0	7	0.86	0.28	0.05	56.04	1.5E-11
ISSR6	7	0	7	1.00	0.30	0.03	42.20	4.1E-13
ISSR7	7	0	7	1.00	0.29	0.03	59.78	1.9E-13
ISSR8	12	0	12	1.00	0.30	0.02	33.08	1.5E-15
ISSR9	7	0	7	1.00	0.30	0.01	49.89	6.9E-12
ISSR10	5	0	5	1.00	0.26	0.02	55.08	3.1E-10
UBC815	6	1	7	0.86	0.30	0.01	55.16	2.1E-09
Total	61	3	64				49.59	3.2E-100

BP (Número de bandas polimórficas); BM (número de bandas monomórficas); BT (Bandas totales); PMF (95) (Proporción de loci polimórficos); PIC (Contenido de información polimórfica promedio); E.E. (Error estándar del PIC); AMP (Porcentaje de amplificación) (Porcentaje de datos iguales a 1); PDICMA (Probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo por azar).

8. CONCLUSIONES

Los marcadores ISSR permitieron identificar variabilidad genética en poblaciones cultivadas de *Eriobotrya japonica* de México, evidenciando una mayor diversidad dentro de las poblaciones que entre ellas.

Los resultados sugieren una elevada similitud genética entre regiones, posiblemente asociada al intercambio de germoplasma y al manejo del cultivo, lo que aporta información útil para la conservación y mejoramiento genético del níspero.

9. LITERATURA CITADA

- Ahumada, J., Fuentealba, C., Olaeta, J. A., Undurraga, P., Pedreschi, R., Shetty, K., Chirinos, R., Campos, D., & Gálvez-Ranilla, L. (2017). Bioactive compounds of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Golden Nugget and analysis of the *in vitro* functionality for hyperglycemia management. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(3), 272-284. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1816>.
- Allaby, R. (2019). Clonal crops show structural variation role in domestication. *Nature Plants*, 5(9), 915-916. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0515-8>.
- Ayangla, N. W., Das, T., Malik, T., & Pandey, D. K. (2026). Assessment of the genetic diversity of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) populations by RAPD and ISSR markers. *BMC Plant Biology*, 26, Article 76. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-07892-x>.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas: Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–241. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>.
- Badenes, M. L., Janick, J., Lin, S., Zhang, Z., Liang, G. L., & Wang, W. (2013). Breeding loquat. In J. Janick (Ed.), *Plant breeding reviews* (Vol. 37, pp. 259–296). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118497869.ch5>.
- Badenes, M. L., Martínez-Calvo, J., & Llácer, G. (2000). Analysis of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Euphytica*, 114(3), 187–194. <https://doi.org/10.1023/A:1003950215426>.
- Badenes, M. L., Lin, S., Yang, X., Liu, C., & Huang, X. (2009). Loquat (*Eriobotrya* Lindl.). In K. M. Foltá & S. E. Gardiner (Eds.), *Genetics and genomics of Rosaceae* (Vol. 6, pp. 525–538). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_25.
- Batyrshin, I., & Rudas, I. (2024). New similarity correlation functions for sets and binary data based on Jaccard similarity measure. In *2024 IEEE 18th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI)* (pp. 145–150). IEEE. <https://doi.org/10.1109/SACI60582.2024.10619901>.
- Becerra V., V., & Paredes C., M. (2000). Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270–281.
- Blasco, M., Naval, M. D. M., Zuriaga, E., & Badenes, M. L. (2014). Genetic variation and diversity among loquat accessions. *Tree Genetics and Genomes*, 10(5), 1387–1398. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0768-3>.
- Bodo Slotta, T. A., & Porter, D. M. (2006). Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): Implications for species delimitation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(3), 345–354. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00514.x>.
- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting.

- Plant Molecular Biology Reports*, 19(3), 209–215. <https://doi.org/10.1007/BF02772892>.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- Bourguiba, H., Khadari, B., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Santoni, S., & Audergon, J. M. (2010). Grafting versus seed propagated apricot populations: Two main gene pools in Tunisia evidenced by SSR markers and model-based Bayesian clustering. *Genetica*, 138(9), 1023–1032. <https://doi.org/10.1007/s10709-010-9488-2>.
- Caballero, P., & Fernández-Zamudio, M. A. (2003). Loquat, production and market. In G. Llácer & M. L. Badenes (Eds.), *First international symposium on loquat* (pp. 11–20). CIHEAM. <http://om.ciheam.org/om/pdf/a58/03600128.pdf>.
- Cristóbal-Perez, E. J., Fuchs, E. J., Fuchs, E. J., Olivares-Pinto, U., & Quesada, M. (2020). Janzen-Connell effects shape gene flow patterns and realized fitness in the tropical dioecious tree *Spondias purpurea* (ANACARDIACEAE). *Scientific Reports*, 10(1), Article 4584. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-61394-4>
- Cha, D. S., Eun, J. S., & Jeon, H. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(2), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.017>.
- Changkui, D., Qifeng, C., Tianlin, S., & Qizhou, X. (1995). Germplasm resources and breeding of *Eriobotrya japonica* Lindl. in China. *Acta Horticulturae*, (403), 121–126. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.403.26>.
- Chung, N. C., Miasojedow, B. Z., Startek, M., & Gambin, A. (2019). Jaccard/Tanimoto similarity test and estimation methods for biological presence-absence data. *BMC Bioinformatics*, 20(Suppl 15), Article 644. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3118-5>.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1–2), 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>.
- Condit, R., & Hubbell, S. P. (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34(1), 66–71. <https://doi.org/10.1139/g91-011>.
- de Almeida Lopes, M. M., Sanches, A. G., de Souza, K. O., & de Oliveira Silva, E. (2018). Loquat/Nispero—*Eriobotrya japonica* Lindl. In S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, & E. de Brito (Eds.), *Exotic fruits* (pp. 285–292). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00037-X>.

- Deluchi, G., & Keller, H. (2010). La naturalización del “níspero”, *Eriobotrya japonica* (Rosaceae, Maloideae), en la Argentina. *Bonplandia*, 19(1), 71–77. <https://doi.org/10.30972/bon.1911335>.
- Díez, C. M., Moral, J., Barranco, D., & Rallo, L. (2016). Genetic diversity and conservation of olive genetic resources. In M. R. Ahuja & S. M. Jain (Eds.), *Genetic diversity and erosion in plants: Case histories* (Sustainable development and biodiversity, Vol. 8, pp. 337–356). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25954-3_10.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>.
- Fan, F. H., Yang, Y. S., Li, Q. H., Deng, Y., & Wen, X. P. (2012). Identification of new germplasms of Guizhou loquat using ISSR markers. *Journal of Beijing Forestry University*, 34(4), 52–57.
- Fitzpatrick, B. M. (2009). Power and sample size for nested analysis of molecular variance. *Molecular Ecology*, 18(19), 3961–3966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04314.x>.
- Fukuda, S., Nishitani, C., Hiehata, N., Tominaga, Y., Nesumi, H., & Yamamoto, T. (2013). Genetic diversity of loquat accessions in Japan as assessed by SSR markers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 82(2), 131–137. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.82.131>.
- Gaydos, T. L., Heckman, N. E., Kirkpatrick, M., Stinchcombe, J. R., Schmitt, J., Kingsolver, J., & Marron, J. S. (2013). Visualizing genetic constraints. *The Annals of Applied Statistics*, 7(2), 860–882. <https://doi.org/10.1214/12-AOAS603>.
- Gisbert, A. D., Guillem, A., J. Martínez-Calvo, Llácer, G., & Badenes, M. L. (2007). Development of microsatellite markers of loquat (*Eriobotrya Japonica*) and its application on genetic diversity studies. *Acta Horticulturae*, 750, 107–112. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.750.14>.
- Gisbert, A. D., Lopez-Capuz, I., Soriano, J. M., Llacer, G., Romero, C., & Badenes, M. L. (2009). Development of microsatellite markers from loquat, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), 803–805. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02211.x>.
- Gisbert, A. D., Romero, C., Martínez-Calvo, J., Leida, C., Llácer, G., & Badenes, M. L. (2009). Genetic diversity evaluation of a loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) germplasm collection by SSRs and S-allele fragments. *Euphytica*, 168(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9901-z>.

- He, Q., Li, X. W., Liang, G. L., Ji, K., Guo, Q. G., Yuan, W. M., Zhou, G. Z., Chen, K. S., van de Weg, W. E., & Gao, Z. S. (2011). Genetic diversity and identity of Chinese loquat cultivars/accessions (*Eriobotrya japonica*) using apple SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(1), 197–208. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0218-9>.
- He, Q., Wang, W., Guo, Q., Xiang, S., Li, X., & Liang, G. (2012). genetic diversity and utilization of triploid loquats (*E. japonica* Lindl). In M. M. A. Lopes, A. G. Sanches, & G. Liang (Eds.), *Genetic diversity in plants*. InTech. <https://doi.org/10.5772/34155>.
- Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(8), 1633–1638. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01814.x>.
- Hotelling, H. (1951). The impact of R. A. Fisher on Statistics. *Journal of the American Statistical Association*, 46(253), 35–46. <https://doi.org/10.1080/01621459.1951.10500765>.
- Huang, K., Li, Y., Dunn, D. W., Zhang, P., & Li, B. (2019). A generalized framework of AMOVA with any number of hierarchies and any level of ploidies. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/608117>.
- Huang, K., Wang, T., Dunn, D. W., Zhang, P., Sun, H., & Baoguo, L. I. (2021). A generalized framework for AMOVA with multiple hierarchies and ploidies. *Integrative Zoology*, 16(1), 33–52. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12460>.
- Hussain, A., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A., & Akhtar, A. (2009). Morpho-physical characteristics of eight loquat genotypes cultivated in Chakwal district, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), 2841–2849.
- Hussain, A., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A., & ul Hasan, S. Z. (2011). A comparison among five loquat genotypes cultivated at Hasan Abdal and Wah. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 48(2), 103–107.
- Idrees, M., Li, M., Pathak, M. L., Qaiser, M., Zhang, Z., & Gao, X. F. (2022). A taxonomic revision of the genus *Eriobotrya* lindl. (Rosaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 54(3), 985–1017. <https://doi.org/10.30848/PJB2022-3>.
- Ju, J. H., Zhou, L., Lin, G., Liu, D., Wang, L. W., & Yang, J. S. (2003). Studies on constituents of triterpene acids from *Eriobotrya japonica* and their anti-inflammatory and antitussive effects. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 38(10), 752–757.
- Kamm, U., Rotach, P., Gugerli, F., Siroky, M., Edwards, P. J., & Holderegger, R. (2009). Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. *Heredity*, 103(6), 476–482. <https://doi.org/10.1038/HDY.2009.70>
- Kameyama, Y., Furumichi, J., Li, J., & Tseng, Y. H. (2017). Natural genetic differentiation and human-mediated gene flow: the spatiotemporal tendency observed in a long-lived *Cinnamomum camphora* (Lauraceae) tree. *Tree Genetics and Genomes*, 13(2), Article 38. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1119-y>.

- Koehmstedt, A. M., Aradhya, M. K., Soleri, D., Smith, J. L., & Polito, V. S. (2011). Molecular characterization of genetic diversity, structure, and differentiation in the olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection of the United States Department of Agriculture. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(4), 519–531. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9595-z>.
- Kumar, S., Ritu, R., & Pallavi, G. (2014). A critical review on loquat (*Eriobotrya japonica* Thunb/ Lindl). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 5(2), 1–7.
- Kumar, S. P. J., Susmita, C., Agarwal, D. K., Pal, G., Rai, A. K., & Simal-Gandara, J. (2021). Assessment of genetic purity in rice using polymorphic SSR markers and its economic analysis with grow-out-test. *Food Analytical Methods*, 14(5), 856–864. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01927-9>.
- Kuznetsov, V. M. (2021). Assessment of genetic differentiation of populations by analysis of molecular variance (analytical review). *Agricultural Science Euro-North-East*, 22(2), 167–187. <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2021.22.2.167-187>.
- Xie, L.-X., Xu, J.-H., Zhang, L.-J., Zhang, X.-Y., Zheng, S., & Li, T. (2012). Genetic relationship analysis of 24 white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) germplasm by ISSR. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 27(3), 261–266.
- Li, X. Y., Xu, H. X., & Chen, J. W. (2013). Genetic diversity and relationships among 47 loquat varieties revealed by EST-SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 160, 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.033>.
- Lin, S., Sharpe, R. H., & Janick, J. (1998). Loquat: Botany and Horticulture. In J. Janick (Ed.), *Horticultural reviews* (Vol. 22, pp. 233–276). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470650752.ch5>.
- Lirong, Z., Daqing, X., & Daqun, L. (2002). SSR marker, ISSR marker and their application to plant genetics and breeding. *Journal of Hebei Agricultural University*, 25(1), 90–94.
- Marsafari, M., & Mehrabi, A. A. (2013). Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars using ISSR and RAPD markers. *Australian Journal of Crop Science*, 7(8), 1160–1166.
- Martínez-Calvo, J., Badenes, M. L., Llácer, G., Bleiholder, H., Hack, H., & Meier, U. (1999). Phenological growth stages of loquat tree (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Annals of Applied Biology*, 134(3), 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1999.tb05276.x>.
- Martínez-Calvo, J., Gisbert, A. D., Alamar, M. C., Hernandorena, R., Romero, C., Llácer, G., & Badenes, M. L. (2008). Study of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by multivariate analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(5), 695–703. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9276-8>.
- McKey, D., Elias, M., Pujol, M. E., & Duputié, A. (2010). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist*, 186(2), 318–332. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03210.x>.

- Merga, D. (2025). Application and advantage of marker assisted selection in plant breeding: review. *Journal of Food Technology & Nutrition Sciences*, 7(2), 1–7. [https://doi.org/10.47363/jftns/2025\(7\)209](https://doi.org/10.47363/jftns/2025(7)209).
- Mueller, U. G., & Wolfenbarger, L. L. R. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(10), 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01659-6).
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Muñoz, L. X. P., Guerra-Ramírez, D., Cruz-Castillo, J. G., Martínez-Solis, J., & Peña-Ortega, M. G. (2024). Bioactive compounds and physicochemical attributes of loquat fruits in Mexico. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 77(2), 10789–10796. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v77n2.105976>.
- Nagano, Y., Tashiro, H., Nishi, S., Hiehata, N., Nagano, A. J., & Fukuda, S. (2022). Genetic diversity of loquat (*Eriobotrya japonica*) revealed using RAD-Seq SNP markers. *Scientific Reports*, 12(1), Article 10200. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14358-9>.
- Nybom, H., Weising, K., & Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: Past, present, future. *Investigative*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-5-1>.
- Oliveira, A. J., Oliveira, T. C. de, Santos, A. A. C. dos, Siqueira, T. A., Duarte, W. M., Caldeira, D. S. A., Vilarinho, M. K. C., Almici, M. da S., Silva, G. F. da, Barelli, M. A. A., & Karsburg, I. V. (2021). Principais marcadores moleculares. *Research, Society and Development*, 10(15), Article e562101523633. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23633>.
- Otero-Arnaiz, A., De la Cruz, M., & Oyama, K. (1997). El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Botanical Sciences*, (60), 85–117. <https://doi.org/10.17129/botsci.1523>.
- Peña-Ortega, M. G., Castillo-Gil, M. J., Martínez-Solís, J., Morillo-Coronado, A. C., & Cruz-Castillo, J. G. (2025). Molecular characterization of *Zantedeschia aethiopica* using ISSR markers in Mexico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 109(1), 15–33. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v109i1.22144>.
- Podani, J., Pavoine, S., & Ricotta, C. (2018). A generalized framework for analyzing taxonomic, phylogenetic, and functional community structure based on presence-absence data. *Mathematics*, 6(11), Article 250. <https://doi.org/10.3390/math6110250>.
- Polat, A. A., & Caliskan, O. (2007). Loquat production in turkey. *Acta Horticulturae*, 750, 49–54. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2007.750.4>.
- Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9–17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>.

- Rentaría-Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (pp. 541–566). SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO.
- Schroeder, J. W., Tran, H. T., & Dick, C. W. (2014). Fine scale spatial genetic structure in *Pouteria reticulata* (Engl.) Eyma (Sapotaceae), a dioecious, vertebrate dispersed tropical rain forest tree species. *Global Ecology and Conservation*, 1, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2014.07.002>
- Seoane, C. E. S., Diaz, V. S., Kageyama, P. Y., Moreno, M. A., Tambarussi, E. V., de Aguiar, A. V., & Sebbenn, A. M. (2019). The Neotropical tree *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae): pollen and seed dispersal in a fragmented landscape. *Annals of Forest Research*, 62(2), 157–171. <https://doi.org/10.15287/AFR.2019.1427>
- Semagn, K., Bjørnstad, Å, & Ndjioudjop, M. N. (2006). Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2588–2603.
- Sevinç, E., Okan, K., & Efe, F. (2020). Analysis of genetic diversity between *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (Rosaceae) Populations Growing in the Aegean Region of Turkey. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 77(2), Article 2020.0012. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:2020.0012>.
- Shen, L., Guan, Q., Amin, A., Zhu, W., Li, M., Li, X., Zhang, L., & Tian, J. (2016). Complete plastid genome of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl and comparative analysis in Rosaceae. *SpringerPlus*, 5(1), Article 2036. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3702-3>.
- Shi, Y., Zhang, L., Do, K. A., Peterson, C. B., & Jenq, R. R. (2020). APCoA: Covariate adjusted principal coordinates analysis. *Bioinformatics*, 36(13), 4099–4101. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa276>.
- Shih, J. C. (2007). Loquat production in Taiwan. *Acta Horticulturae*, 55–60, Article 750_5. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2007.750.5>.
- Shunquan Lin. (2015). The number of loquat species in *Eriobotrya*. *Acta Horticulturae*, 119–121, Article 1092_18. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1092.18>.
- Soriano, J. M., Romero, C., Vilanova, S., Llácer, G., & Badenes, M. L. (2005). Genetic diversity of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) assessed by SSR markers. *Genome*, 48(1), 108–114. <https://doi.org/10.1139/g04-101>.
- Velasco Mosquera, R. (2005b). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 3(1), 14–18. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/619>.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. Van De, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique

- for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>.
- Wang, Y. Q., Fu, Y., Yang, Q., Deng, Q. X., Lu, X. L., Luo, N., & Yan, J. (2010). Analysis of a germplasm collection of loquat using ISSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(2), 113–118. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512640>.
- Wang, Y., Randolph, T. W., Shojaie, A., & Ma, J. (2019). The GMD-biplot and its application to microbiome data. *BioRxiv*, 4(6). <https://doi.org/10.1101/814269>.
- Wetton, J. H., Carter, R. E., Parkin, D. T., & Walters, D. (1987). Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327(6118), 147–149. <https://doi.org/10.1038/327147a0>.
- Wu, D., Fan, W. guo, He, Q., Guo, Q. gao, Spano, A. J., Wang, Y., Timko, M. P., & Liang, G. lu. (2015). Genetic Diversity of Loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] Native to Guizhou Province (China) and Its Potential in the Genetic Improvement of Domesticated Cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(4), 952–961. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0809-y>.
- Xiang, S. Q., Wang, W. X., He, B., Liang, G. L., Quan, Z. W., & Ding, Y. (2011). Development and characterization of new polymorphic microsatellite markers in loquat. *Acta Horticulturae*, 75–78, Article 887_10. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.887.10>.
- Xiaoying, Z., Qian, J., Wang, H., Yuan, W., & Fang, J. (2011). A novel strategy employed in identification of 25 important loquat cultivars using rapd marker. *Caryologia*, 64(3), 265–271. <https://doi.org/10.1080/00087114.2011.10589792>.
- Xie, J. H., Wang, W., Yang, X. H., & Lin, S. Q. (2007). Analysis of genetic relationships among *Eriobotrya* germplasm in China using ISSR markers. *Acta Horticulturae*, 203–208, Article 750_31. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.750.31>.
- Xu, H. X., & Chen, J. W. (2011). (2011). Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1057–1063. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4282>.
- Yan, W., Li, J., Zheng, D., Friedman, C., & Wang, H. (2019). Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers. *PeerJ*, 7, Article e7173. <https://doi.org/10.7717/peerj.7173>.
- Qiao, Y., Zhang, Z., Gao, Y., Liu, C., Lin, S., Hong, Y., & Guo, D. (2015). Genetic diversity in loquat germplasm using SRAP and SSR markers. *Acta Horticulturae*, Article 1092_16, 105–113. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1092.16>.
- Yang, J., Liu, N., Zheng, X. L., Wu, J. C., Lin, X. J., & Zheng, G. H. (2020). Phylogenetic relationships and characterization of the complete

- mitochondrial genome of *Eriobotrya japonica* in southeast of China. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 5(1), 269–270. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1692709>.
- Yao, Z., Cheng, F., Ming, T., Sun, C., Ran, Q., Zhang, C., Shen, C., Zhang, R., & Peng, C. (2023). *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl leaves: Reviewing their specialized metabolites and pharmacology. *Biochemical Systematics and Ecology*, 110, Article 104707. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104707>.
- Zappi, D., & Turner, J. (2001). Plate 419. *Eriobotrya japonica*. *Curtis's Botanical Magazine*, 18(2), 108–113. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1467-8748.00298](https://doi.org/10.1111/1467-8748.00298).
- Zhang, W., Zhao, X., Sun, C., Li, X., & Chen, K. (2015). Phenolic composition from different loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars grown in China and their antioxidant properties. *Molecules*, 20(1), 542–555. <https://doi.org/10.3390/molecules20010542>.
- Zhao, G. J., Yang, Z. Q., Chen, X. P., & Guo, Y. H. (2011). Genetic relationships among loquat cultivars and some wild species of the genus *Eriobotrya* based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 913–918. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.007>.
- Zheng, S. Q. (2007). Achievement and prospect of loquat breeding in China. *Acta Horticulturae*, 750, 85–92. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2007.750.10>.
- Zhu, X., Wang, L., Zhao, T., & Jiang, Q. (2022). Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicity of *Eriobotrya japonica* leaves: A summary. *Journal of Ethnopharmacology*, 298, Article 115566. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115566>.