



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**



**“Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de  
aguacate cascarudo”**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**P R E S E N T A:**

**JUAN CARLOS JAIME DÁVILA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN**

**CODIRECTORES**

**DR. JAIME MEJÍA CARRANZA**

**DR. LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA**

**FEBRERO, 2020**

**TENANCINGO, ESTADO DE MÉXICO**

## ABSTRACT

The *Persea* genus is composed of two subgenus; *Persea* and *Eriodaphne*, the *Persea* subgenus to which avocado belongs, is considered the largest of the genetic variability and the most complex in evolutionary terms of the Lauraceae Family. In the State of Mexico in the municipalities of Ixtapan del Oro and Zumpahuacán, avocados have been identified as “cascarudos” with morphological attributes different from those of known species of the *Persea* subgenus, however they have similarities in pubescence on the underside of the leaf to *Persea floccosa* and thickness of the fruit shell to *Persea tolimanensis*, additionally are distributed in a habitat where *Persea americana* var *drymifolia* grows, this last known as Mexican race distinguishable by its thin skinned. Thus, in order to have more knowledge about their description and distribution, the objective of this study was to differentiate morphologically and molecularly the “cascarudo” individuals from two regions of the State of Mexico and establish relationships with species and races from subgenus *Persea*. The morphological characterization was carried out through the use of 64 characters of which 19 were quantitative and 45 qualitative obtained from the guidelines of IPGRI (1995) and UPOV (2006). Molecular characterization was performed using the RAPD and ISSR markers, the CTAB method was used for DNA extraction and through columns with the commercial kit FAST (ID) ®. The DNA was amplified by PCR with 8 RAPD markers and 6 ISSR markers and the products obtained were visualized on agarose gels. Through the discriminant and cluster analysis, it was found that the pubescence density, shape and undulation of the leaf grouped the individuals of the study close to reference species while shell thickness, anise smell, sepal width and density of the leaf Leaf pubescence effects a separated them. The dendograms obtained with molecular markers generated clusters by means of Neighbor-joining construction method and distance of similarity using the Jaccard index with a resampling of 1000 repetitions for RAPD, for ISSR was used the UPGMA clustering method and the Jaccard index. It was generated a 99% of polymorphisms, 1417 bands of 250 to 900 bp with RAPD and 917 bands of 200 to 1000 bp for ISSR with a polymorphic information content (PIC) of 0.45 and 0.49 and a resolution power of 8.8 and 5.81 respectively. Morphological and molecular characterization provided evidence that avocado “cascarudo” could represent

a natural hybrid between regional old genotypes with *P. floccosa*, *P. americana* var. *drymifolia* and *P. americana* var. *guatemalensis*.

**Key words:** Morphological characterization, Molecular characterization, avocado, RAPD, ISSR, *Persea*.

## CONTENIDO

Índice de Cuadros .....	x
Índice de Figuras.....	x
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisión de literatura.....</b>	<b>3</b>
2.1 Origen y domesticación del aguacate .....	3
2.2. Taxonomía de la Familia Lauraceae .....	4
2.3 Aspectos taxonómicos del Género <i>Persea</i> . .....	5
2.4 Descripción de algunas especies del género <i>Persea</i> , subgénero <i>Persea</i> involucradas en el estudio. ....	8
2.4.1 <i>Persea Schiedeana</i> Nees Syst. Laurin. 130 (1836) .....	8
2.4.2 <i>Persea floccosa</i> Mez, 1889.....	8
2.4.3 <i>Persea tolimanensis</i> (Schieber & Zentmyer, 1972).....	9
2.4.4 <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> (Schlechtendal & Chamisso) Blake Linnaea 6: 365. 1831 .....	11
2.4.5 <i>Persea cinerascens</i> S.F. Blake (1920) especie que pertenece al Subgénero <i>Eriodaphne</i> ,.....	12
2.5 <i>Beilschmiedia anay</i> S.F. Blake, 1938 (Genero afín a <i>Persea</i> ) .....	13
<b>3. Caracterización vegetal y sus aplicaciones .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Caracterización molecular .....</b>	<b>15</b>
4.1 Fundamentos de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ....	16
4.2 Electroforesis. Una técnica de verificación de la calidad del ADN .....	17
4.3 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) .....	18
4.4 Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs).....	20
4.5 Secuencia de repeticiones en tandem de motivos simples, ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat) .....	20

4.6 Generalidades de los ITS (Internal Transcribed Spacer) .....	21
4.7 El ADN de cloroplastos como marcador molecular .....	23
<b>5. Planteamiento del problema.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Hipótesis.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Justificación .....</b>	<b>25</b>
<b>8. Objetivo general .....</b>	<b>26</b>
8.1 Objetivos específicos .....	26
<b>9. Materiales y métodos.....</b>	<b>26</b>
9.1 Material Vegetal .....	26
9.2 Metodología del análisis morfológico .....	28
9.3 Metodología de la caracterización molecular .....	30
Proceso de extracción de ADN. ....	30
9.4 Caracterización molecular.....	33
9.4.1 Calidad y concentración de ADN .....	33
<b>10. Resultados .....</b>	<b>37</b>
10.1 Caracterización morfológica.....	37
10.1.1 Descripción de los individuos "cascarudos <i>Persea</i> sp." del Estado de México. .....	37
10.1.2 Análisis morfológico .....	42
10.2 Caracterización molecular .....	48
10.2.1 Marcadores moleculares RAPD y Marcadores moleculares ISSR.....	48
10.2.2 Relaciones genéticas y similitudes entre colectas. ....	51
<b>11. Discusión .....</b>	<b>53</b>
<b>12. Conclusión .....</b>	<b>58</b>
<b>13. Bibliografía.....</b>	<b>58</b>
<b>14. Anexos .....</b>	<b>74</b>

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Colectas consideradas en el estudio. _____	28
Cuadro 2. Caracteres morfológicos de aguacate bajo directrices UPOV (2006) e IPGRI (1995) y el Manual Grafico para la Descripción Varietal de Aguacate (2010). _____	29
Cuadro 3. 8 Iniciadores RAPD y su secuencia utilizados en la amplificación de ADN de aguacate. _____	33
Cuadro 4. Componentes de reacción para el análisis tipo RAPD colocados en tubos eppendorf de 500 µL. _____	34
Cuadro 5. 6 Iniciadores ISSR y su secuencia utilizados en la amplificación de ADN de aguacate. _____	35
Cuadro 6. Componentes de reacción para el análisis tipo ISSR colocados en tubos eppendorf de 500 µL. _____	35
Cuadro 7. Características morfológicas y ambientales distintivas entre las especies de estudio. _____	39
Cuadro 8. Cantidad de ADN obtenido mediante espectrofotometría. _____	48
Cuadro 9. Iniciadores usados para el ADN de colectas del género <i>Persea</i> . _____	50

## Índice de Figuras

Figura 1. A) Ejemplo de una inflorescencia de <i>Persea americana</i> Mill. Fotografía de © Roció Rojas CC-BY-NC-SA. Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard-Saint Louis, Missouri 63110 Consultado 09-15-2019 en <a href="http://www.tropicos.org/Image/100341316">http://www.tropicos.org/Image/100341316</a> B) Taxonomía de <i>Persea americana</i> Mill. Consultado en 09-16-2019 <a href="http://www.tropicos.org/Name/40005008">http://www.tropicos.org/Name/40005008</a> © 2020 Missouri Botanical .....	6
Figura 2. Aguacates no identificados provenientes de; a) Ixtapan del Oro. b) Zumpahuacán (Autor: 12 de Marzo de 2018). .....	7
Figura 3. Frutos de la especie <i>Persea schiedeana</i> .....	8
Figura 4. Frutos de la especie <i>P. floccosa</i> (material proporcionado por CICTAMEX S.C., Coatepec Harinas tomada por autor, Febrero, 2019) .....	9

Figura 5. Fruto de <i>Persea tolimanensis</i> conservado ex situ en CICTAMEX, Coatepec Harinas por Reyes-Alemán en 2018. ....	10
Figura 6. <i>Persea tolimanensis</i> (Aguacate de Mico), árbol en laderas del Volcán Santa Ana, El Salvador, Zentmyer & Schieber, 1990. ....	11
Figura 7. <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ; Autor, 23 de Febrero de 2019. ....	12
Figura 8. Fruto de <i>P. cinerances</i> árbol ex-situ en el Campo del Centro Universitario UAEM Tenancingo; Autor, 4 Diciembre de 2018). ....	13
Figura 9. Frutos de la especie <i>Beilschmiedia anay</i> , fotos de Barrientos-Priego, 2015. ....	13
Figura 10. Estructura de alelos homocigotos y heterocigotos, tomada de National Human Genome Research Institute, Diciembre, 2019 en <a href="https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Alelo">https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Alelo</a> . ....	19
Figura 11. Organización de la región ITS del ADN modificada de Buckler et al., 1997. ....	22
Figura 12. Distribución de colectas en el Estado de México. Modificado de INEGI. Marco Geo estadístico Municipal 2010. Versión 5.0. a) <i>Persea</i> sp. Ixtapan del Oro, b) <i>Persea</i> sp. Zumpahuacán, c) <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> , CUT, d) <i>Persea floccosa</i> , e) <i>Persea tolimanensis</i> ....	27
Figura 13. Programa de PCR de iniciadores RAPD para la amplificación de ADN. ....	34
Figura 14. Programa de PCR de iniciadores ISSR para la amplificación de ADN. ....	35
Figura 15. Pubescencia blanquecina en brote tierno del individuo "cascarudo", proveniente de Ixtapan el Oro, Reyes- Alemán, 2018. ....	40
Figura 16. Pubescencia en las venas de la hoja del individuo "cascarudo", proveniente de Ixtapan el Oro, Reyes- Alemán, 2018. ....	40
Figura 17. Estructura floral del individuo "cascarudo", proveniente de Zumpahuacán; Autor, Marzo 2019. ....	41
Figura 18. Fruto del individuo "cascarudo", proveniente de Zumpahuacán; Autor, 8 de Diciembre, 2018. ....	41
Figura 19. Acercamiento de fruto de imagen anterior. Permite observar el grosor aproximado de la cascara y la separación de la cavidad de la semilla y su pulpa. ....	42
Figura 20. Análisis discriminante de hoja de 22 colectas con 13 variables requiriendo 5 agrupaciones de acuerdo las poblaciones determinadas. ....	43
Figura 21. Análisis discriminante de inflorescencias de 14 colectas con 19 variables requiriendo 5 agrupaciones de acuerdo las poblaciones determinadas. ....	44
Figura 22. Análisis discriminante de fruto de 12 colectas con 32 variables con base en 5 agrupaciones de acuerdo con las poblaciones determinadas. ....	45
Figura 23. Análisis de conglomerados delimitado por 5 agrupamientos. a) Hoja, b) Flor y c) Fruto de 22, 14 y 12 colectas respectivamente. ....	47
Figura 24. Ejemplo de fragmentos derivados de ADN genómico de colectas del género <i>Persea</i> mediante RAPD del iniciador C-10. ....	49
Figura 25. Ejemplo de fragmentos derivados de ADN genómico de colectas del género <i>Persea</i> mediante ISSR del iniciador TCC-5RY. ....	50

Figura 26. Dendograma de 18 colectas de *Persea americana* obtenido con RAPD, con un análisis estadístico combinado de ocho iniciadores, utilizando el índice de Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”) ..... 51

Figura 27. Dendograma de 18 colectas de *Persea americana* obtenido con ISSR, con un análisis estadístico combinado de seis iniciadores, utilizando el índice Jaccard y el método UPGMA con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”) ..... 53



## 1. Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) se ha clasificado como uno de los cultivos más importantes producido en México y que lo ubican como país productor líder a nivel mundial. La región de centro-occidente aporta 562 mil 768 toneladas lo que representa el 96.5 % del total nacional siendo Michoacán el principal productor. El Estado de México es el tercer productor nacional después de Michoacán y Jalisco con 10,266 ha establecidas hasta 2019, sin embargo se reporta una reducción en su producción en comparación con el año anterior del 14.1 %, siendo los estados que más reportan un incremento son Puebla y Yucatán con el 139.9 % (3,771 toneladas) y 117.5 % (1,142 toneladas) respectivamente (SIAP, 2019).

La producción nacional de aguacate a Julio de 2019, fue de un millón 207 mil 194 toneladas; 0.4 % superior a lo cosechado el mismo mes del año pasado, así entonces, el aguacate es considerado como un frutal económicamente importante a nivel nacional por ser un fruto que logra una derrama económica importante, además de su alto valor dietético por contener altos niveles de aceite (12-30 %), proteína (3-4 %), incluyendo carbohidratos, vitaminas y minerales (Medina et al., 2009; Damián-Nava, Palemón-Alberto & Moreno-Juárez, 2017).

Taxonómicamente el aguacate se clasifica dentro de la familia Lauraceae, comprende árboles dominantes en los bosques montañosos de niebla, trópicos del viejo y nuevo mundo y algunas zonas templadas como Uruguay, Madagascar y Asia (Rohwer, 1993). Contiene alrededor de 20 especies en peligro de extinción como *Persea bullata* Kopp y *Persea campii* Kopp entre otras (Muriel, 2017), amenazadas por actividad del hombre como deforestación, minería, pozos petroleros causando una pérdida importante de especies pertenecientes al género *Persea*.

La parte central de México concentra una amplia diversidad de especies relacionadas con el aguacate, existen diversos documentos que infieren sobre su origen en la región central de México, por evidencias arqueológicas que demuestran su uso por culturas Mesoamericanas antiguas como los Moncayo y los Mayas que habitaron dichas zonas

(Barrientos-Priego et al., 2010; Galindo-Tovar, Arzate-Fernández, Ogata-Aguilar, & Landero-Torres, 2007).

La taxonomía del género *Persea*, es poco conocida en comparación con géneros de otras familias, debido a la dificultad para su identificación (Pereira, 2012; Pérez Álvarez, Ávila Quezada & Coto Arbelo, 2015), además de escasas investigaciones taxonómicas. Sin embargo, el reciente interés en la familia, ha logrado aumentar su conocimiento sobre sus relaciones filogenéticas y sistemáticas mediante el uso de técnicas de carácter morfológico y molecular (Coy & Cuca, 2007).

Se reconocen dos subgéneros dentro del género *Persea*: el subgénero *Persea* que contiene pocas especies estrechamente relacionadas entre sí, conformado por los aguacates comunes o verdaderos por ser de tamaño mayor del subgénero *Eriodaphne* y parten de la especie *P. americana* formada por las 3 razas descritas en la actualidad (Mexicana, Antillana y Guatemalteca) y otras especies como *P. floccosa*, *P. tolimanensis*, *P. nubigena*, *P. steyermarki* entre otras (Bergh & Ellstrand, 1986). El subgénero *Persea* tiene ambas caras de su estructura floral pubescentes, en tanto que el subgénero *Eriodaphne*, es claramente diferenciado por sus características particulares en las inflorescencias como la ausente pubescencia de la cara interior de sus sépalos y su menor tamaño en frutos conocidos como aguacatillos (Kopp, 1966).

México concentra una gran riqueza genética del aguacate ya que las diferentes especies se adaptan a las diversas condiciones naturales propias del país desde bosques montañosos hasta zonas tropicales (Challenger & Soberón, 2008; Caballero-Martínez, Rivas-Manzano & Aguilera-Gómez, 2009), estas especies son amenazadas por la reducción y alteración de ecosistemas, cambio del uso de suelo, plagas, enfermedades, sequías, entre otras. Por lo anterior es importante realizar trabajos de conservación y estudios de diversidad genética su conocimiento y aprovechamiento sustentable del germoplasma en México y el mundo, antes de que desaparezca en su totalidad (Barrientos et al., 2010).

En el Estado de México se han realizado estudios morfológicos y moleculares sobre la diversidad genética existente, se ha enfocado a individuos conocidos y otros poco

comunes, tal es el caso de los individuos denominados “cascarudos”, que se distinguen por sus características morfológicas diferentes a las razas conocidas (Flores-Ayala, 2014; Ramírez-Mendoza, 2015; Serrano-Hernández, 2017), dichos estudios han permitido inferir relaciones genéticas entre los genotipos mediante marcadores morfológicos y moleculares. Se han utilizado los descriptores de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2006), el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 1995) y el manual gráfico para la descripción varietal del aguacate (Barrientos-Priego, Reyes-Alemán, & Aguilar-Melchor, 2010). Además de la caracterización molecular con marcadores moleculares RAPD e ISSR. El propósito de esta investigación consistió en establecer relaciones morfológicas y moleculares de los “aguacates cascarudos” provenientes de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro, Estado de México con especies y razas conocidas del subgénero *Persea*.

## **2. Revisión de literatura**

### **2.1 Origen y domesticación del aguacate**

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es nativo de América específicamente de la región de Mesoamérica, donde el aguacate fue un cultivo reconocido por el hombre en diversos escritos; así mismo se encontraron evidencias muy antiguas sobre su origen en una cueva de Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México, entre los años 8000-7000 A.C. (Smith, 1966), no obstante Teliz-Ortíz; Mora-Aguilera, & Morales-García (2000), mencionan que es un árbol que se ha cultivado por lo menos 10,000 años atrás en el Centro de México y que se extendió hacia el sur por intercambio comercial entre culturas prehispánicas (Storey, Bergh & Zentmyer, 1986; Storey, Bergh, Platt & Miller, 1987). Así entonces, se dio inicio a un proceso de domesticación del aguacate, que consistió en extraer plantas silvestres, seleccionarlas y fijarlas en otro entorno, para crecer y reproducirse (Galindo-Tovar et al., 2007).

Debido a sus centros de domesticación se distinguen tres variedades o razas botánicas del subgénero *Persea*, especie *Persea americana* Mill: Antillana, Guatemalteca y

Mexicana, como hace referencia el código florentino: “aoacatl” para referirse a *P. americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana), “tlacacolaoacatl” *Persea americana* var. *americana* (raza Antillana) y “quilaoacatl” *P.americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca) (Barrientos-Priego & López, 2000).

Por otro lado, Ben-Ya’acov, Bufler, Barrientos-Priego, de la Cruz-Torres & López-López (1992), indicaron que en Costa Rica no hay aguacate de la raza Mexicana ni Guatemalteca, pero sí de la raza Antillana encontrada en las partes bajas. No obstante, existe un tipo endémico del país conocido como “Aguacate de Monte”, se trata de una variante primitiva de la especie *Persea americana* el cual el investigador Ben-Ya’acov sugería considerarlo como una cuarta raza, la raza Costaricensis (*P. americana* var. *costaricensis*).

Dicha afirmación se basó en análisis molecular de secuencias de ADN genómico ribosomal 5S ADN<sub>r</sub> que separó a las razas Antillana y Guatemalteca, y, por otra parte, con la utilización de marcadores moleculares tipo RAPD, Bufler, & Fiedler (1996), concluyeron que las tres razas previamente denominadas, son genéticamente equidistantes entre sí.

En la historia del aguacate se observa la importancia de la hibridación natural entre plantas, representada por complejos patrones evolutivos y común en muchas plantas perennes (Smith 1966; Smith 1969), por lo que también se han utilizado zonas del ADN de cloroplastos y ribosomal de regiones genómicas altamente conservadas, para conocer más sus relaciones filogenéticas, a partir de ITS (Internal Transcribed Spacers) específicos para esta familia (Rohwer, 2009).

## **2.2. Taxonomía de la Familia Lauraceae**

La familia Lauraceae consta de 55 géneros y cerca de 3500 especies, distribuidas por los trópicos del Viejo y Nuevo Mundo y, algunas en zonas templadas, que está representada por árboles y arbustos (Gomes-Bezerra, Soares-Silva & Gomes, 2011). Todas las especies de la familia Lauraceae se consideran taxonómicamente complejas, debido a

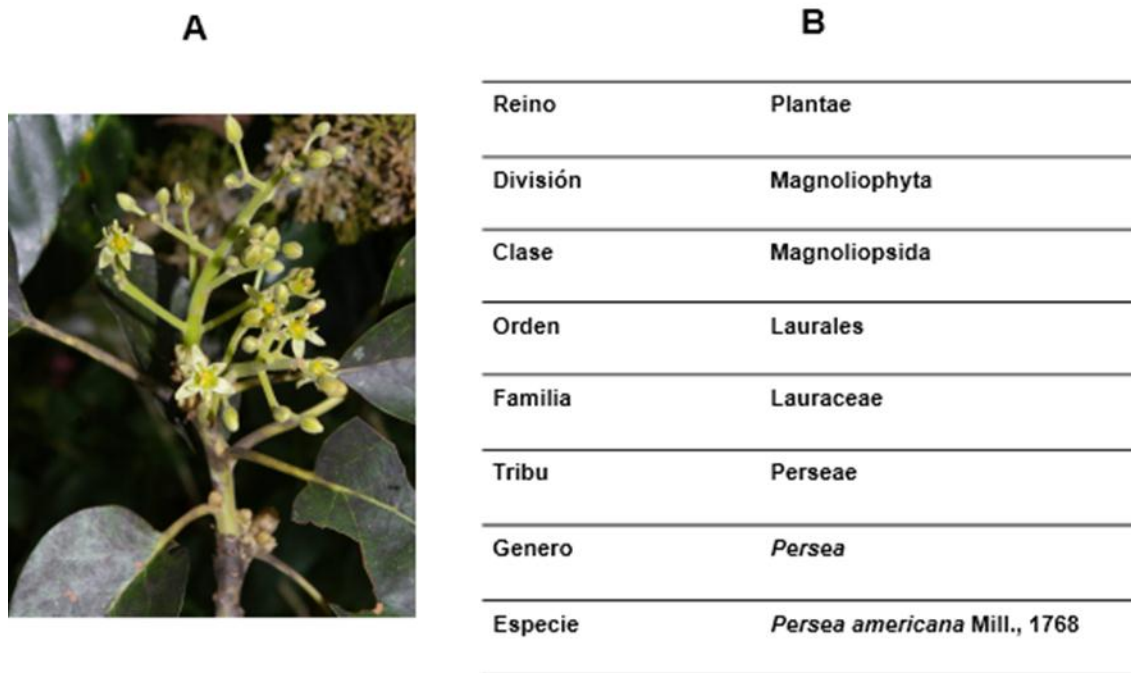
que las diferentes circunscripciones de los géneros requieren gran cantidad de caracteres reproductivos, morfológicos y vegetativos para determinar correctamente su clasificación.

La familia Lauraceae consiste de árboles que alcanzan hasta 50 metros de altura y arbustos usualmente perennifolios. Las hojas se presentan de forma alterna, opuestas o verticiladas y de un color verde brillante, el tallo tiene características leñosas, con ramas frecuentemente aquilladas y una corteza generalmente lisa, los frutos de algunas Lauraceas sirven como fuente de alimento para aves y son altamente dependientes del mismo en su ciclo de vida como *P. donell-smithii* y el quetzal de Guatemala. Las flores son de forma actinomorfa, perfecta, polígama o diclino-dioticas, dispuestas en inflorescencias cimosas o racimosas, el fruto es como una drupa o baya y la semilla en caso de la palta es ovoide, con dos cotiledones carnosos, embrión pequeño y sin endospermo (Pereira, 2012; Gomes-Bezerra et al., 2011).

Además, los árboles pertenecientes a esta familia, son componentes de suma importancia para los bosques y selvas de todo el planeta, sin embargo el producto más apreciado proveniente de esta familia, es el aguacate (*Persea americana* Mill.), fuente primaria de alimento y derivados, pero actualmente su madera se ha explotado para diferentes usos representando una problemática de conservación ambiental (Bost, Smith, & Crane, 2013).

### **2.3 Aspectos taxonómicos del Género *Persea*.**

El género *Persea* (**Figura 1**) contempla dentro de su clasificación taxonómica dos subgéneros, el primero denominado *Persea que* contempla alrededor de 10 especies mientras que el otro subgénero *Eriodhapne* contiene aproximadamente 75 especies (Bergh, 1992).



**Figura 1. A) Ejemplo de una inflorescencia de *Persea americana* Mill. Fotografía de © Roció Rojas CC-BY-NC-SA. Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard-Saint Louis, Missouri 63110 Consultado 09-15-2019 en <http://www.tropicos.org/Image/100341316> B) Taxonomía de *Persea americana* Mill. Consultado en 09-162019 <http://www.tropicos.org/Name/40005008> © 2020 Missouri Botanical**

Los subgéneros son diferenciables por la pubescencia de la cara interior de los sépalos; *Persea* tiene ambas caras pubescentes mientras que *Eriodaphne* tiene la cara interna sin pubescencia, a excepción de *Persea pallida*, *Persea rigens* y *Persea cinerances* (Kopp, 1966). Por otro lado, van der Werff en 2002, planteaba un carácter de diagnóstico basado en el tamaño igual y casi igual de los tépalos a partir de la morfología floral para el subgénero *Persea* y de lo contrario para el caso del subgénero *Eriodaphne* los tépalos eran desiguales.

Las especies del género *Persea* se distribuyen desde el sureste de los Estados Unidos, Norte de México, las Antillas hasta el Centro y Sudamérica. Sin embargo, en las Islas Canarias, en la región denominada como Macaronesia, existe la especie de *P. indica*,

ejemplar único del género *Persea* fuera de América y se ha reportado la presencia de especies potenciales al Sudeste de Asia del subgénero *Eriodhapne* (Jardon-Barbolla et., al 2011).

Por otro lado, el subgénero *Persea* es considerado como el grupo de los verdaderos aguacates, debido al tamaño y propiedades de su fruto, abarca varias especies como: *P. floccosa*, *P. nubigena*, *P. schiedeana* (Williams, 1977a). El otro subgénero conocido como *Eriodhapne*, incluye a las especies con aguacates pequeños o aguacatillos, con tamaño similar al de una aceituna o tan pequeños como un chícharo, teniendo como característica muy importante la inmunidad al patógeno fungoso altamente destructivo de *phytophthora cinnamomi*, causante de la tristeza o marchitamiento del aguacate (Ben-Ya'acov et al., 1992).

La diversidad de especies y razas del género *Persea* son fundamentales para enfrentar problemas potenciales de la industria de este fruto causadas por factores bióticos y abióticos (Cruz-Maya, Barrientos-Priego, Zelaya-Molina, & Reyes-Alemán, 2018), sus usos pueden tener aplicaciones potenciales coadyuvando al mejoramiento y aprovechamiento de las diferentes especies tal es el caso del aguacate en estudio denominado “el cascarudo” con probable uso como portainjerto o producto comestible **(Figura 2)**.



**Figura 2. Aguacates no identificados provenientes de; a) Ixtapan del Oro. b) Zumpahuacán (Autor: 12 de Marzo de 2018).**

## 2.4 Descripción de algunas especies del género *Persea*, subgénero *Persea* involucradas en el estudio.

### 2.4.1 *Persea Schiedeana* Nees Syst. Laurin. 130 (1836)

Es un árbol nativo de México y Centroamérica, distribuido hasta Colombia (Kopp, 1966), normalmente crece en selvas y montañas tropicales; aunque en México se encuentra en zonas de pastizales, específicamente con altitudes que van de los 90 hasta 2000 msnm (Schieber & Zentmyer, 1972) como en los Estados de Veracruz, Chiapas y Tabasco. Este tipo de aguacate (**Figura 3**), también se conoció con el nombre de chinini, chinin, aguacate de manteca o pagua, dialecto utilizado por diferentes culturas antiguas como los Mayas, Chontales y los Tzontziles, de acuerdo Gama-Campillo & Gómez-Pompa en 1992. La especie *schiedeana* pertenece al subgénero *Persea* y presenta variaciones morfológicas en su fruto (Scora & Bergh, 1990).



**Figura 3. Frutos de la especie *Persea schiedeana***

### 2.4.2 *Persea floccosa* Mez, 1889

Especie relacionada con los genotipos pertenecientes a la especie *P. americana* var. *drymifolia* y *P. nubigena*, sin embargo se diferencia de ambas por la



pubescencia que se aloja en los brotes y hojas nuevas, o bien por los frutos pequeños y más subglobosos que miden cerca de 5 cm de largo, con un exocarpio delgado y verde (Whiley, Schaffer & Wolstenholme, 2007)

Los arboles de esta especie son enormes, ya que llegan a medir hasta 30 m de altura, el tronco y las ramas presentan pubescencia fina áspera, con numerosas lenticelas; las láminas foliares pueden ser ovadas cuando miden de 6 a 16 cm y elípticas cuando miden de 6 a 30 cm de longitud. Las flores son de color marrón, generalmente miden de 4 a 6 mm de longitud. Los frutos son globosos de color verde oscuro (**Figura 4**), con cascara muy gruesa en la que se alojan numerosas lenticelas de apariencia corchosa (Schroeder, 1951).



**Figura 4. Frutos de la especie *P. floccosa* (material proporcionado por CICTAMEX S.C., Coatepec Harinas tomada por autor, Febrero, 2019)**

#### **2.4.3 *Persea tolimanensis* (Schieber & Zentmyer, 1972)**

Especie proveniente de América Central, colectado por primera vez en el País del Salvador en 1954, ubicado cerca de las laderas del Volcán conocido como El Boquerón durante exploraciones realizadas con el objetivo de encontrar genotipos resistentes a la pudrición de la raíz del aguacate causada por el hongo *Phytophthora cinnanomi* que por algunas razones desconocidas era ignorado por los pobladores de esa Región.

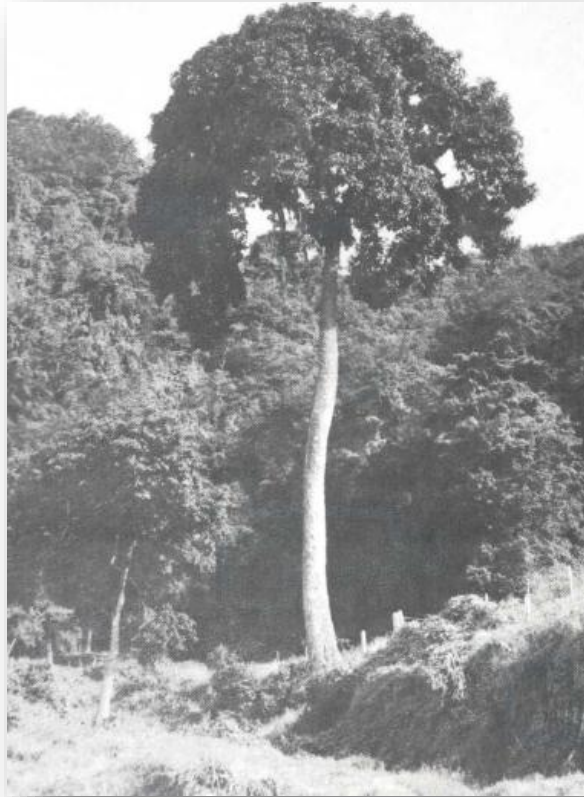
Este genotipo, fue reconocido como aguacate de “mico” por las poblaciones nativas de esa región, debido a que en unos inicios era alimento propio de los monos, posiblemente por su sabor semi amargo, con cascara muy gruesa, con olor a anís en la pulpa (Schieber,

1981). El crecimiento de este aguacate se ha presentado en laderas de otros volcanes como en la cordillera Dariense de Nicaragua y en el Oeste de Guatemala, regiones con características cálidas de la cadena volcánica de América Latina **(Figura 5)**.



**Figura 5. Fruto de *Persea tolimanensis* conservado ex situ en CICTAMEX, Coatepec Harinas por Reyes- Alemán en 2018.**

*P. tolimanensis*, se ramificaba muy alto en el dosel, siendo más un árbol erecto que un árbol que se extiende a los laterales, con una capacidad vigorosa importante, un tronco blanquecino que puede alcanzar una altura hasta de 20 m de la tierra a la copa (Zentmyer & Schieber, 1990) **(Figura 6)**.



**Figura 6. *Persea tolimanensis* (Aguacate de Mico), árbol en laderas del Volcán Santa Ana, El Salvador, Zentmyer & Schieber, 1990.**

**2.4.4 *Persea americana* var. *drymifolia* (Schlechtendal & Chamisso) Blake Linnaea 6: 365. 1831**

Especie conocida como aguacate criollo, que se encuentra en forma silvestre en los bosques mesófilos de montaña como el Estado de Veracruz, Puebla, el Valle de México entre otros, cuyo estado de conservación es precario (Lorea-Hernández, 2002) y por lo común esta variedad se utiliza como porta injerto en huertos de aguacate Hass, además de ser considerada como una fuente que contiene genes con resistencia a plagas, patógenos y malezas. Sin embargo, este cultivar está siendo sustituido por otras especies

comerciales y es afectada por la deforestación de los ecosistemas (Rincón-Hernández, Sánchez Pérez & Espinosa-García, 2011)

Sus frutos se desarrollan en climas subtropicales o templados y su precipitación pluvial debe ser un mínimo de 800 mm por año (**Figura 7**). Además necesita de un ambiente semi seco para su desarrollo. En invierno la temperatura no debe descender a intervalos de -4 °C ya que sus frutos se verán dañados de manera irreversible.



**Figura 7. *Persea americana* var. *drymifolia*; Autor, 23 de Febrero de 2019.**

#### **2.4.5 *Persea cinerascens* S.F. Blake (1920) especie que pertenece al Subgénero *Eriodaphne***

Especie localizada de forma silvestre en los estados de México y Michoacán; se caracteriza por poseer un porte relativamente alto que va de 6 a 8 metros de alto, sin embargo, en Tacámbaro Michoacán, se han localizado ejemplares que miden hasta de 20 metros de altura. Por otra parte, es posible identificar ejemplares de esta especie mediante el frotamiento de la madera del tronco y de las ramas, ya que al frotarla se desprende un aroma a canela característico de esta especie (Campos, Espíndola, & Mijares, 2008) (**Figura 8**).



**Figura 8. Fruto de *P. cinerances* árbol ex-situ en el Campo del Centro Universitario UAEM Tenancingo; Autor, 4 Diciembre de 2018).**

### **2.5 *Beilschmiedia anay* S.F. Blake, 1938 (Genero afín a *Persea*)**

Por otra parte existe una especie distribuida en Países como Guatemala, Honduras, Costa Rica, Ecuador, Chile, Nueva Zelanda y México, tal es el caso de *Beilschmiedia anay* donde su origen ha sido el Estado de Veracruz (López-López, Rubí-Arriaga, Ben-Ya'acov, & Barrientos-Priego, 1997). De acuerdo con Borys, Leszczyńska-Borys, Marañen, Castro & del Campo (1993) los frutos de esta especie son pequeños y comestibles pero de forma obovada; no obstante la forma del fruto depende de la proporción existente entre la pulpa y la semilla. La epidermis es delgada, lisa y brillante aunque normalmente de color negro oscuro; el color de la pulpa es de color verde claro a verde medio, cambiando cerca de la semilla, a verde claro o amarillo claro. La textura de la pulpa tiende a ser acuosa o cremosa (**Figura 9**).



**Figura 9. Frutos de la especie *Beilschmiedia anay*, fotos de Barrientos-Priego, 2015.**

### 3. Caracterización vegetal y sus aplicaciones

La caracterización vegetal, Hernández-Villareal (2013) la define como la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que ayudan a diferenciar taxonómicamente a las plantas. Así entonces la caracterización tiene diversas finalidades de estudio; Identificación o determinación, Sistemática, Análisis de la diversidad genética, Gestión de bancos de germoplasma, definición de nuevas variedades y la búsqueda de marcadores de caracteres agronómicos (González-Andrés, 2001a).

La aplicación de estos marcadores va en función de tipificar y conocer los atributos destacables o no, que contribuyan a diferenciar o particularizar una especie en términos biológicos. Por otra parte coadyuva a medir la variabilidad genética de una colección detectada visualmente haciendo referencia a las características responsables de la morfología y la arquitectura de la planta (Franco, 2003).

Los marcadores morfológicos (fenotipos de fácil identificación visual) han pasado a ser un método poco aplicable en la actualidad pero no menospreciado, aunque a diferencia de los marcadores moleculares, estos no revelan sitios de variación natural en la secuencia de ADN (Velasco, 2005). Sin embargo, las primeras aplicaciones de estos marcadores contribuyeron de manera sustancial a los análisis del ligamiento genético y sirvieron para estructurar las primeras versiones de mapas genéticos con la aplicación de técnicas del análisis multivariante como el análisis clúster y análisis discriminante (Hair, Anderson, Tatham & Black, 1999).

El conocimiento de la diversidad tanto interpoblacional como intrapoblacional se asocia a la conservación vegetal para estructurar estrategias de la supervivencia de la especie, y por otra parte la integración del término de la domesticación de especies silvestres para la utilización en beneficio del ser humano. En este sentido, el hacer uso y extracción racional de una especie específica de un entorno ambiental, puede evitar una erosión genética irreversible que pudiera causar una pérdida importante de recursos fitogenéticos



de un ecosistema (Piña-Escutia, Vences-Contreras, Gutiérrez-Martínez, Vázquez-García, & Arzate-Fernández, 2010).

En la actualidad, el uso de los marcadores morfológicos presenta limitantes debido a que su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, además que la planta a evaluar debe estar en un estado de madurez completo siendo esta una de sus desventajas de aplicación (Azofeifa-Delgado, 2006, como citó en Rallo, 2002). No obstante, para un estudio de caracterización de plantas es recomendable la combinación de otro tipo de marcadores como son los genéticos (Azofeifa-Delgado, 2006), es decir los avances de la biología molecular han permitido el desarrollo de métodos y protocolos de identificación y caracterización, basados en el uso de marcadores moleculares. Este tipo de marcadores basan sus estudios en la identificación del ADN y presentan mayores ventajas que los marcadores morfológicos además se pueden evaluar planta en edad temprana (Tanksley, 1983; Phillips, Fritz, & Rodríguez, 1995).

#### **4. Caracterización molecular**

Desde hace décadas se ha utilizado la caracterización molecular, como una herramienta para distinguir entre variedades e individuos, así como en la evaluación de la diversidad y variabilidad genética, además de lograr la identificación de secuencia o genes específicos (Hidalgo, 2003). Por otro lado, la aplicación de este tipo de marcadores no es afectada o dependiente del ciclo de vida en el que se encuentren los individuos a analizar, así como las condiciones de su entorno en que estos se encuentren y son libres de efectos epistáticos, es decir que la acción de un gen no es afectada por la interacción con otro gen (Azofeifa-Delgado, 2006).

Los marcadores moleculares de ADN son secuencias existentes de forma alternativa en un organismo y se utiliza para marcar una posición en un mapa genético, físico o integrado (Rentarías, 2007). Sin embargo para Valadez & Kahl (2000) un marcador genético, es cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de peso molecular conocido que sirve para monitorear la separación de las mismas mediante electroforesis. Además que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homologas del ADN de

organismos que coadyuvan a describir genotipos de interés, detectando variaciones en las secuencias de ADN al comparar distintos individuos (Torres & Moreno, 2001).

Desde otro punto de vista, los marcadores moleculares pueden expresar por su naturaleza un efecto dominante o codominante, y pueden contener una capacidad diversa de detectar polimorfismos en sitios únicos o múltiples (Rentarúa, 2007), así mismo existen dos tipos en términos de funcionalidad específica: los marcadores de ADN e Isoenzimas, y en este último caso los diferentes individuos en estudio pueden tener formas moleculares diferentes en las cuales se expresa la proteína que pudiera deberse a factores genéticos (Azofeifa- Delgado, 2006), teniendo como ventaja la distinción entre individuos homocigotos y heterocigotos de acuerdo con Weising, Nybom, Wolff & Kahl en 2005.

En la caracterización molecular son fundamentales las técnicas de la PCR como herramienta básica y la electroforesis para visualizar los fragmentos generados por lo que se describen a continuación.

#### **4.1 Fundamentos de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica de biología molecular diseñada por el bioquímico de origen estadounidense, Kary Mullis en 1983, la cual tenía como objetivo principal la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN (Mullis, 1986), utilizando secuencias de oligonucleótidos o moléculas complejas conformadas por nucleótidos, siendo este una secuencia corta de ADN o ARN conocida que inicia la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables (Mullis, 1990; Valadez & Kahl, 2000). El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (altas y bajas de temperaturas alternadas) que se lleva a cabo en tres etapas, y que como resultado se obtiene una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN.

Por otro lado, el proceso de la PCR, es automatizado por un aparato llamado termociclador que permite enfriar y calentar rápidamente fracciones pequeñas (mL) de reacción a temperaturas requeridas. La enzima empleada para este proceso es la *Taq polimerasa*, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, la cual es resistente a temperaturas elevadas (Espinosa, 2007).



De acuerdo con Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo (2013) cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión las cuales se describen enseguida:

- a) **Desnaturalización:** En esta etapa las cadenas de ADN son calentadas y separadas a 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, las bases nitrogenadas G-C (Guanina y Citosina) requieren de mayor tiempo para su separación debido a su unión por un triple enlace de hidrogeno en comparación de A-T (Adenina y Tiamina) que está unida por un doble enlace. Otra variable dependiente para su desnaturalización es la velocidad en la que el termociclador aumente la temperatura.
- b) **Hibridación:** Los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria, para que se forme el complejo templado-primers donde la temperatura de hibridación óptima oscila entre 50-60 °C.
- c) **Extensión:** En esta etapa, la *Taq. polimerasa* actúa sobre el complejo templado-primers e inicia su función catalítica y agrega dNTP's (deoxinucleósido trifosfato) complementarios para crear las cadenas completas del ADN, y su extensión se da en dirección de 5' a 3'. La temperatura óptima para la elongación es de 72 °C y al término del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño determinado por el número total de pares de bases (pb) que debe ser conocido por el investigador.

#### **4.2 Electroforesis. Una técnica de verificación de la calidad del ADN**

La electroforesis es una técnica que fue desarrollada en el año 1937 por el bioquímico sueco Arne Tiselius, empleada con el objetivo de separar moléculas como proteínas, aminoácido e iones inorgánicos, en un campo magnético que actúa sobre las partículas causando sus movimientos a través de una matriz en geles de agarosa o poliacrilamida (Tiselius, 1937).

La electroforesis es la migración de los solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico hacia un electrodo positivo o negativo a consecuencia de su carga propia, peso molecular y estructura tridimensional (García-Pérez, 2000). Otro aspecto de esta técnica, es analizar fragmentos de ADN obtenidos en la PCR, para su visualización es necesario el uso de geles de agarosa o acrilamida, donde la elección del tipo del gel depende del tamaño de los fragmentos utilizados. El gel de agarosa se visualiza añadiendo entre otros bromuro de etidio, reactivo que se intercala con el ADN y proporciona fluorescencia cuando se expone en la luz UV, no obstante, en el uso de acrilamida la tinción se realiza con Nitrato de plata, que por interacciones electroestáticas se liga al ADN (Somma & Querci, 2007b).

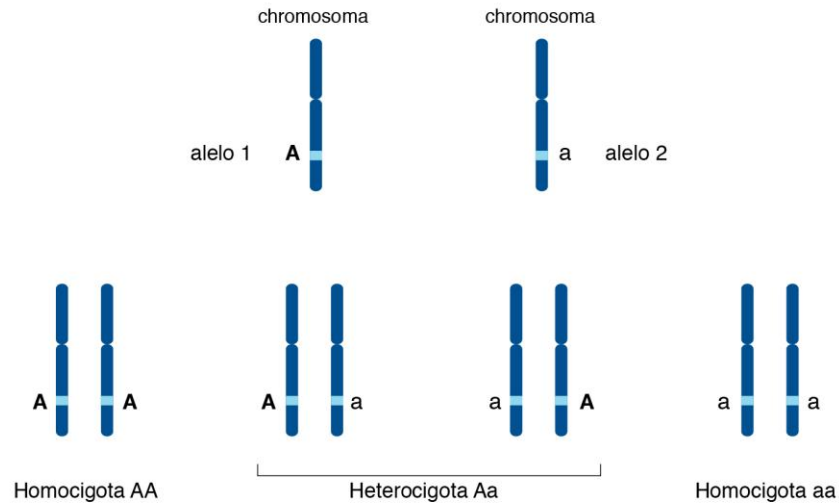
#### **4.3 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)**

Las primeras técnicas desarrolladas para el análisis de genomas se agruparon en tres categorías (Valadez, Kahl, Hüttel & Rubluo-Islas, 2001). La primera basada en la hibridación donde es necesario la aplicación de sondas específicas marcadas como son los RFLP, de las cuales se habla sobre sus características principales a continuación.

Valadez y Kahl (2000), definen los RFLPs como la variación en la longitud de los fragmentos de ADN que se producen por una endonucleasa de restricción específica, a partir de los segmentos de ADN genómico de dos o más individuos de una especie. Las variaciones de los sitios de reconocimientos específicos de las endonucleasas, se deben a la presencia de ADN repetido con diferente cantidad de copias sobre un espacio cromosómico, estas “enzimas de restricción” actúan como “tijeras moleculares”, reconocen y cortan el ADN en zonas específicas (Azofeifa-Delgado, 2006 como citó en Paterson, 1966).

Los marcadores RFLP, son del tipo codominante, patrones de bandas distinguibles en homocigotos y heterocigotos, donde en el primer caso si el organismo diploide, tiene sus dos alelos idénticos, uno de cada progenitor, el organismo es homocigoto para ese gen

en particular, caso contrario el haber heredado dos formas de un gen en particular, una de cada progenitor, el organismo es heterocigoto (**Figura 10**).



**Figura 10. Estructura de alelos homocigotos y heterocigotos, tomada de National Human Genome Research Institute, Diciembre, 2019 en <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Alelo>.**

Este tipo de marcadores moleculares no se basan en la técnica PCR (Reacción en Cadena de polimerasa). En cambio los marcadores moleculares que actúan de manera dominante o recesiva (patrón de bandas ausentes o presentes en geles de agarosa o poliacrilamida para la construcción de una matriz binaria) dependen de esta técnica y tienen relativa importancia en las plantas por su alta capacidad reproducible, es decir, que cuando se realizan repeticiones con la misma cantidad de combinaciones entre sus reactivos su resultado será el mismo (Valadez, Kahl, Hüttel & Rubluo-Islas, 2001).

No obstante, los marcadores RFLP requieren de grandes cantidades de ADN para utilizarse y el proceso para obtenerlos tiene diversas limitantes, como el alto costo y su detección es laboriosa, lo cual condujo a la implementaciones de nuevas técnicas basadas en la técnica de la PCR (Torres & Moreno, 2001), por lo que es necesario hacer una breve revisión de éstas.

#### **4.4 Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs)**

Técnica molecular basada en la PCR más utilizada por su sencillez que permite la síntesis de diferentes fragmentos de ADN, los dos iniciadores que contiene, son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y el iniciador se utiliza para amplificar secuencia al azar de un patrón complejo de ADN (Philips et al., 1995). Por otro lado es un marcador de tipo dominante, ya que los polimorfismos son detectados mediante presencia o ausencia de bandas, que son resultado de inserciones en las regiones amplificadas o cambios de bases en el ADN que alteran la unión del iniciador (Valdez & Kahl, 2000).

De acuerdo con Becerra & Paredes (2000) los marcadores moleculares tipo RAPD, se basan en la amplificación al azar de fragmentos usando un cortador, ADN genómico, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa. Dicha reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde; los productos obtenidos presentan gran variación polimórfica cuando se ha producido la pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la misma (ADN genómico). Esta técnica utiliza iniciadores cortos (usualmente de 10 pares de bases) y la síntesis genera cantidades específicas de ADN.

#### **4.5 Secuencia de repeticiones en tandem de motivos simples, ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat)**

Técnica muy similar a los marcadores RAPDs a excepción que el primer, es un di o tri nucleótido repetido (Rentarúa, 2007). Es un marcador de tipo dominante, donde la variación alélica consiste en la presencia o ausencia de los elementos amplificados, las bandas obtenidas, van de 100 a 2000 pares de bases y en comparación con los RAPDs es larga, derivando en la alta reproducibilidad de bandeo en las muestras. Recientemente se ha utilizado en estudios de variación poblacional en especies silvestres, incluyendo estimaciones de la tasa de fecundación cruzada (que tradicionalmente se hace con marcadores codominante) (Culley & Wolf, 2001).

Entre sus limitaciones, es que las bandas generadas para analizar la variación poblacional no muestran si el individuo tiene un alelo paterno dominante (homocigótico o heterocigótico) en un locus específico, sino que cada banda representa un locus con dos alelos donde el alelo dominante está en equilibrio con uno recesivo además de ser una técnica relativamente costosa ya que necesita el uso de geles de acrilamida con el uso de nitrato de plata para su visualización (Rentarúa, 2007).

#### **4.6 Generalidades de los ITS (Internal Transcribed Spacer)**

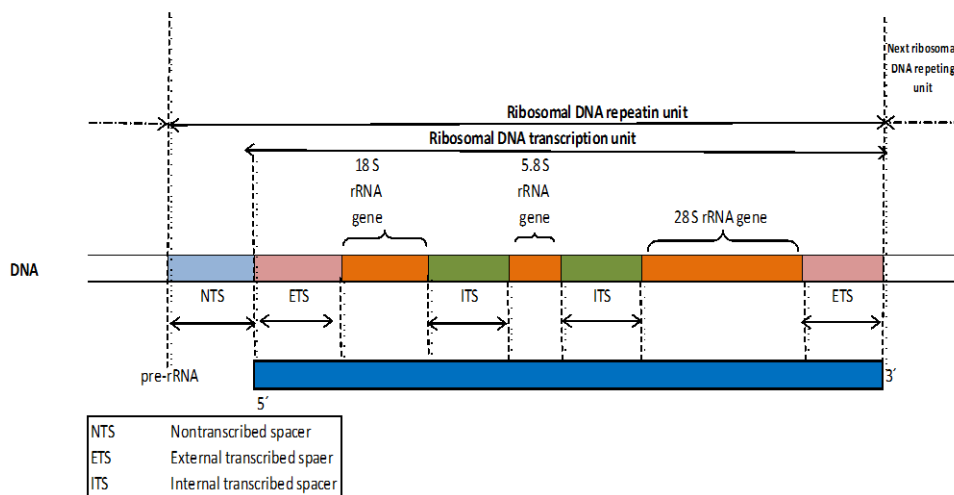
Las regiones de ADN nuclear que codifican la síntesis de ribosomas, está organizado en bloques y en una o más regiones cromosómicas. Cada bloque o arreglo consiste en cientos o miles de copias de unidades individuales de ADNn, compuestas por las secuencias contiguas 18S, ITS1, 5.8S, ITS 2, 26S e IGS. Los arreglos más grandes y activos son llamados regiones nucleolares organizadoras (NORs) (Buckler et al., 1997).

Los espacios ITS (**Figura 11**), forman parte de la unidad de transcripción, sin embargo no se incluyen al final en el ARN ribosomal. Generalmente la diversidad del ADN ribosomal intragenómico es baja, pero algunas especies muestran alta heterogeneidad en esta región, esto ocurre si el proceso no es suficientemente rápido para alcanzar homogenización para las diferentes copias. Con híbridos generados recientemente, al ser secuenciados de manera directa, se manifestó una aditividad paterna (señal de dos diferentes nucleótidos) en el material estudiado (Fuertes & Nieto, 2003).

Los marcadores moleculares ITS, son fragmentos de ADN precursores de ARN no funcional, situados en secciones cromosómicas no codificables entre los exones que codifican las estructuras de ARNs ribosomales (rARN) en un transcrito precursor y que se leen de 5' a 3' (Marín-Gallegos, 2011). En bacterias, arqueas los ITS se encuentran entre los genes 16S y 23S en comparación con las células eucariotas existen dos tipos de ITS, el ITS1 se encuentra entre los genes 18S y 5.8S mientras que el tipo ITS2 está entre 5.8S y 26S, los cuales ocurren en secuencias consecutivas repetidas en miles de copias (Gardes & Bruns, 1993).

Durante la maduración del ARN, los ETS (External Transcribed Spacers) e ITS son removidos como productos colaterales de maduración no funcionales, los cuales se degradan rápidamente (Chen et al. 2001; Chen, Morrell, De la Cruz, & Clegg, 2008). Cada uno de los genes que codifican el ARN ribosomal está separado por regiones de ADN no transcrito que se denominan IGS ó NTS (siglas que provienen del inglés y que significan “intergenic spacer ó non-transcribed spacer, NTS). Estas zonas del ADN están contenidas en organelos como el cloroplasto y mitocondrial (Chanderbali et al., 2008)

La utilización de este tipo de marcadores es usado ampliamente en taxonomía y filogenia molecular en uno inicio en la identificación de hongos (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990; Gardes & Bruns, 1993), debido a que amplifica las secuencias que rodean las regiones altamente conservadas de una especie. Posteriormente el diseño de estos marcadores comienza a obtener resultados prometedores en plantas y otras especies (López, Garcés de Granada, & Díaz, 2004; Pasini, Funk, de Souza-Chies & Miotto, 2016; Cruz-Maya, Barrientos-Priego, Zelaya-Molina, Rodríguez de la O. & Reyes-Alemán, 2018



**Figura 11. Organización de la región ITS del ADN modificada de Buckler et al., 1997.**

#### **4.7 El ADN de cloroplastos como marcador molecular**

Los marcadores moleculares de ADN tienen un impacto relevante por proveer estudios directos en secuencias de nucleótidos de ADN, ya que analizan genes estructurales y secuencias no codificantes, las cuales acumulan mutaciones de manera neutral, sin una presión de selección tan fuerte como los genes estructurales. No obstante, el ADN de, organelos o también llamados ADN extra nuclear, como: ADNmt (mitocondrial) y ADNcp (cloroplastos), facilitan diferentes estudios con relación con la filogenia de diferentes organismos (Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1995; Soltis, 1998).

El ADN de cloroplasto, permite el estudio sistemático y análisis filogenético entre especies de un género, debido a que su tipo de herencia impide la recombinación génica, porque las secuencias de este ADN se mantienen en un linaje uniparental o de un solo sucesor. Esta característica las hace especialmente útiles en procesos evolutivos dentro de una especie. La estructura del ADN de cloroplasto es circular, con un tamaño que varía entre 120 y 170 Kilo bases (Kb), posee un relativo alto grado de conservación en tamaño, estructura y contenido de genes en plantas terrestres (Erguiarte, 2003)

El genoma de cloroplasto contiene dos regiones repetidas que son invertidas (aproximadamente 25 kb cada una), que son como dos imágenes en un espejo, en términos de complementación de genes. Estas regiones están separadas por una región larga y otra pequeña de una sola copia (LSC y SSC, respectivamente) y se sugiere que esta región acumula mutaciones puntuales más lentas que las regiones de una sola copia (Buckler, 1997).

Estas son las características que hacen que el ADN de cloroplastos sea de interés en estudios de inferencias filogenéticas, además que su tasa de mutación es lenta y detectan variación intraespecífica en la mayoría de los estudios entre poblaciones, y ocasionalmente dentro de ellas (Saghai-Maroo, Soliman, Jorgensen & Allard, 1984). En especies arbóreas los casos más frecuentes encontrados son de variación entre una especie. El genoma del cloroplasto se utiliza en estudios de evolución molecular en plantas. La combinación de las características de su genoma y el progreso eficiente de

caracterización y codificación de genes, facilitan las investigaciones sobre la ruta de evolución en términos genéticos de una especie (Buckler, 1997).

## 5. Planteamiento del problema

El aguacate (*Persea americana* Mill.) ha estado bajo cultivo en el centro de México desde por lo menos 10, 000 años (Smith, 1966; Storey et al. 1986; Galindo-Tovar et al., 2007) asimismo ha pasado por un proceso de selección, propagación adaptación y domesticación por diferentes culturas, tanto que la variabilidad de especies del género *Persea*, son abundantes y sus individuos se encuentran distribuidos a lo largo de México (Gama-Campillo & Gómez-Pompa, 1992; Barrientos-Priego et al., 2007).

En el Estado de México se han desarrollado estudios morfológicos y moleculares (RAPD e ISSR) previos sobre la diversidad genética de especies del género *Persea* presentes en la región que han revelado su variabilidad. Los marcadores RAPD e ISSR han sido herramientas útiles que han permitido inferir relaciones genéticas de parentesco, que se expresan mediante agrupamientos, estos estudios permitieron identificar el caso particular de un nuevo grupo de aguacates con características diferentes a las razas reconocidas dentro de la especie *Persea americana* Mill por su morfología, referente a la pubescencia en el envés de sus hojas y cáscara gruesa de su fruto distintas a la raza Mexicana con quien conviven en el mismo hábitat, este grupo de individuos no había sido descrito antes, asimismo se desconoce su origen.

Los aguacates cascarudos como ha sido llamado a este grupo de individuos se encuentran disperso en poblaciones de la raza Mexicana variedad *drymifolia* en Zumpahuacán e Ixtapan del Oro, municipios que pertenecen al Estado de México. Los resultados generados por Ramírez-Mendoza, (2015) y Serrano-Hernández (2017) relacionan su parentesco con la raza Mexicana, pero es necesario complementar su estudio y compararlo morfológica y molecularmente con otras especies afines como es el caso de otras dos especies del subgénero *Persea*: *P. floccosa* y *P. tolimanensis* por su semejanza morfológica.



## 6. Hipótesis

La caracterización morfológica y molecular mediante marcadores RAPD e ISSR robustece la descripción e identificación de los aguacates “cascarudos” y permiten reducir los sesgos de la descripción morfológica afectada por ambiente.

## 7. Justificación

En el sur del Estado de México se conoce sobre la prevalencia de especies del género *Persea*; subgénero *Persea*: *P. americana* var. *drymifolia* (raza mexicana) y del subgénero *Eriodaphne*: *P. hintoni* y *P. cinerascens* (aguacatillos silvestres), estos últimos localizados en la región sur del Estado en los municipios de Tejupilco, Temascaltepec y Oztoloapan, sin embargo hasta este estudio no había sido reportada la presencia de los individuos de aguacate denominados regionalmente “cascarudos” por su morfología, que conviven comúnmente entre poblaciones nativas de la raza Mexicana.

Mediante la caracterización morfológica y molecular descrita en la revisión, se considera que es posible describir al grupo de aguacates tipo cascarudos del Estado de México y compararlo con individuos semejantes de la misma especie o especies afines con la finalidad de establecer relaciones de parentesco entre ellos. Lo anterior con la finalidad de conocer su origen e identidad y sobre todo robustecer la descripción mediante los marcadores moleculares RAPD e ISSR y morfológicos basados en los descriptores UPOV (2006), IPGRI (1995) y el Manual Grafico para la Descripción Varietal de Aguacate (2010).

## 8. Objetivo general

Caracterizar morfológica y molecularmente colectas de aguacate (cascarudos) de la región sur del Estado de México, mediante RAPD e ISSR para conocer sus relaciones de parentesco dentro del género *Persea*.

### 8.1 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar morfológicamente colectas de aguacate cascarudo con base en directrices UPOV (2006), IPGRI (1995) y el Manual Grafico para la Descripción Varietal de Aguacate (2010).
- ✓ Identificar similitudes y distinciones de los cascarudos con especies e individuos del género *Persea*, mediante marcadores RAPD e ISSR.

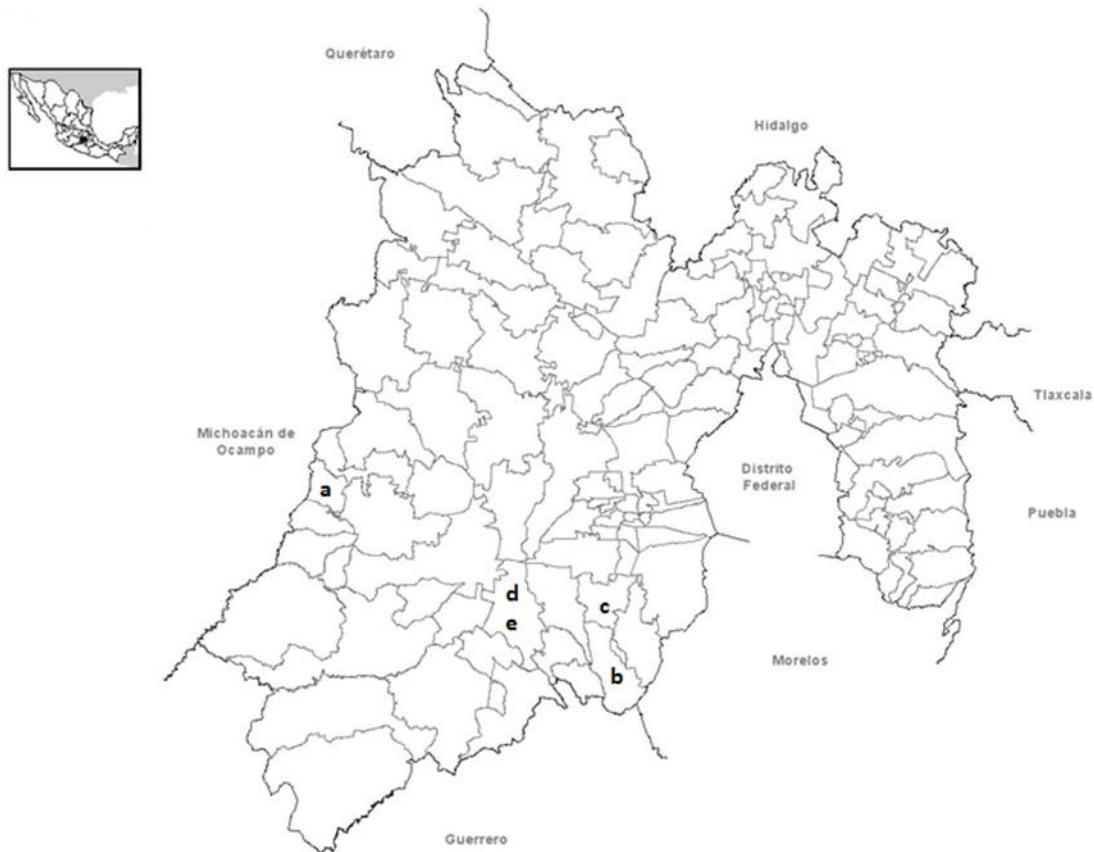
## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Material Vegetal

Es común encontrar a los individuos “cascarudos” en ambientes de clima templado semicálido subhúmedo particularmente en los municipios del Estado de México como Zumpahuacán e Ixtapan del oro, en el primer caso en un intervalo altitudinal de 1900 a 2500 m.s.n.m. que se caracteriza por una topografía accidentada que proporcionan condiciones ecológicas favorables para el desarrollo de diferentes tipos de vegetación como selva baja caducifolia y pastizales (Emeterio-Lara et al., 2016), en el segundo caso, Ixtapan del Oro cuenta con un clima semejante a una altitud de 1705 m.s.n.m. y una vegetación de bosques de pino-encino con selva baja caducifolia en partes bajas de la cañada (Caballero- Martínez et al., 2009).

El material vegetal consistió de 22 individuos colectados en cuatro sitios del Estado de México (**Figura 12**): 6 ejemplares de Zumpahuacán (*Persea* sp.), 6 de Ixtapan del Oro

(*Persea* sp.) y 7 del Centro Universitario UAEM Tenancingo (*P. americana* var. *drymifolia*) localizados *in situ*, 2 ejemplares de *P. tolimanensis* y uno de *P. floccosa* como especies de referencia conservadas *ex situ* en el banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C ubicado en Coatepec Harinas, Méx. **(Cuadro 1)**. Para el análisis morfológico de hoja se utilizaron 22 colectas, para flor 14 colectas, para fruto 12 colectas, esto debido a la disponibilidad de estructuras en los individuos, en cada caso se contó con diez réplicas. Para realizar el análisis molecular se utilizaron muestras de hojas de 5 individuos de Zumpahuacán, 5 de Ixtapan del Oro, 5 del Centro Universitario UAEM Tenancingo (CUT), más 3 individuos de las especies de referencia; dos de *P. tolimanensis* y un individuo de *P. floccosa*.



**Figura 12. Distribución de colectas en el Estado de México. Modificado de INEGI. Marco Geo estadístico Municipal 2010. Versión 5.0. a) *Persea* sp. Ixtapan del Oro, b) *Persea* sp. Zumpahuacán, c) *Persea americana* var. *drymifolia*, CUT, d) *Persea floccosa*, e) *Persea tolimanensis***

**Cuadro 1. Colectas consideradas en el estudio.**

Clave de colecta	Sitio de Colecta	Coordenadas y metros sobre el nivel el mar (msnm)	Atributo principal	Subgénero/ Especie/ Raza	
CUT-M 1	Tenancingo, Méx.	18°58'6.43"N, 99°36'46.92"O, 2067	Fruto pequeño, cascara delgada	<i>Persea americana/ var. drymifolia</i>	
CUT-M 2		18°58'5.89"N, 99°36'45.12"O, 2067	Semilla grande, escasa inflorescencia		
CUT-M 3		18°58'6.27"N, 99°36'46.52"O, 2066	Fruto mediano, semilla ovada		
CUT-M 5		18°58'6.44"N, 99°36'47.02"O, 2066	Fruto grande, pulpa cremosa		
CUT-M 7		18°58'6.44"N, 99°36'46.45"O, 2066	Fruto pequeño brillante		
CUT-M 10		18°58'6.06"N, 99°36'45.31"O, 2066	Brote juvenil muy pubescente		
PERLA- 1		Zumpahuacán, Méx.	18°48'25.66"N, 99°33'14.05"O, 1849		Hoja pubescencia intermedia
PERLA- 2	18°48'21.80"N, 99°33'15.21"O, 1833		Fruto pequeño, hoja pubescente		
SANPEGU	18°49'16.36"N, 99°32'19.01"O, 1790		Hoja grande ligero olor a anís		
SANPEGU- 2	18°49'16.16"N, 99°32'18.52"O, 1789		Hoja grande, ligero olor a anís		
SANDESP	18°48'18.71"N, 99°32'12.17"O, 1836		Fruto cáscara gruesa, hojas grandes		
ZUMP- IGLESIA	18°49'24.05"N, 99°32'14.39"O, 1745		Hoja muy oscura, ligero olor a anís		
BARR	Ixtapan del Oro, Méx.		19°16'12.35"N, 100°15'21.47"O, 1698	Fruto cáscara gruesa, hojas grandes pubescentes	
BARR- 2			19°16'3.11"N, 100°15'17.68"O, 1725	Hojas muy grandes pubescentes	
BARR- 3			19°16'1.44"N, 100°15'18.85"O, 1722	Hojas muy grandes, ligero olor a anís	
SANMAN			19°16'23.23"N, 100°15'34.90"O, 1759	Fruto mediano de cascara ligeramente delgada	
CASV	CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, Méx.	19°16'20.10"N, 100°15'21.10"O, 1702	Hojas grandes pubescentes		
CASTI- 1		19°16'25.53"N, 100°15'57.12"O, 1810	Hojas grandes ligeramente torcidas		
CASTI- 2		19°16'25.86"N, 100°15'56.15"O, 1815	Hojas intermedias, ligero olor a anís		
<i>P. floccosa</i>		18°55'12.23"N, 99°45'33.45"O, 2214	Fruto mediano, cascara delgada, hoja pequeña muy pubescente	<i>Persea/ Persea floccosa</i>	
<i>P. tolimanensis</i> -1	"	18°55'14.00"N, 99°45'31.91"O, 2206	Fruto redondo, cascara muy gruesa, sabor semi amargo	<i>Persea / Persea tolimanensis</i>	
<i>P. tolimanensis</i> -2		18°55'14.03"N, 99°45'32.04"O, 2206	Fruto redondo, cascara muy gruesa, sabor semi amargo		

## 9.2 Metodología del análisis morfológico

Se emplearon los descriptores morfológicos del International Plant Genetic Resources Institute, (IPGRI 1995), la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, (UPOV 2006) y el Manual Grafico para la Descripción Varietal de Aguacate (2010).

Se integró una matriz básica de datos mediante 19 caracteres cuantitativos y 45 cualitativos (**Cuadro 2**), los caracteres de hoja se evaluaron en 22 colectas, de fruto en 12 e inflorescencias en 14 colectas de acuerdo a su disponibilidad. La

información generada se analizó en el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017) mediante estadística descriptiva y multivariada.

El análisis de la información se realizó a partir de una matriz básica de datos integrada por 64 caracteres morfológicos mediante los métodos de conglomerados y discriminante de la estadística multivariada (Hair et al., 1992); que permitieron identificar similitudes y diferencias entre colectas y especies de referencia.

**Cuadro 2. Caracteres morfológicos de aguacate bajo directrices UPOV (2006) e IPGRI (1995) y el Manual Grafico para la Descripción Varietal de Aguacate (2010).**

Tipo de carácter	Hoja	Flor	Fruto
<b>Cuantitativos</b>	Longitud de hoja (cm) Ancho de hoja (cm) Relación longitud/ancho de hoja (cm) Longitud de peciolo (cm) Número de venas secundarias (número)	Longitud de eje floral Numero de ramificaciones por inflorescencia Número de flores por inflorescencia Longitud de pedicelo Longitud de pétalos Ancho de pétalos Longitud de sépalos Ancho de sépalos	Longitud de fruto Diámetro de fruto Relación longitud/diámetro de fruto Diámetro de inserción de pedicelo Longitud de pedicelo Grosor de la cascara

<b>Cualitativos</b>	Forma de la hoja	Color de lenticelas	Forma del extremo peduncular
	Forma del ápice	Tipo de floración	Presencia de cuello
	Torcedura de la hoja	Tipo de nectario	Depresión del extremo peduncular
	Torcedura del ápice	Estilo de flor	Posición de pedicelo
	Ondulación de la hoja	Presencia de polen	Cabeza de clavo
	Relieve de las venas superiores	Pubescencia del sépalo interno	Forma de la parte estilar
	Densidad de pubescencia	Densidad de pubescencia el sépalo interno	Conspicuidad de lenticelas
	Olor a anís	Pubescencia del pétalo	Tamaño de lenticelas
		Densidad de pubescencia del pétalo	Color de lenticelas
		Abundancia de la floración	Brillantes de fruto
		Posición de la inflorescencia	Superficie de fruto
			Persistencia de perianto
			Grosor en comparación del pedúnculo
			Forma de pedicelo
		Color de pedicelo	
		Superficie de pedicelo	
		Color de fruto maduro	
		Consistencia de la cascara	
		Adherencia de la cascara a la pulpa	
		Color principal de la pulpa	
		Color junto a la cascara	
		Ancho de la capa junto a la cascara	
		Conspicuidad de fibras en la pulpa	
		Consistencia de la pulpa	
		Aroma a anís de la pulpa	
		Relación longitud de fruto/semilla	

### 9.3 Metodología de la caracterización molecular

#### Proceso de extracción de ADN

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario UAEM Tenancingo, empleando el protocolo de Extracción en plantas con alto contenido de fenoles (basado en bromuro de cetil trimetil amonio, CTAB (Saghai-Marroof et al., 1984) y el Kit FAST ID Genomic ADN Extraction®.

#### Pasos para la extracción de ADN con el método CTAB

1. Se etiquetaron tubos eppendorf de 1.5 mL.
2. Se precalentó el CTAB 2 % (Tris-HCl 10 mM P.H. 8.0 CTAB NaCl 1.4 M a 60 °C) en agitador magnético ®Labnet.
3. Se preparó el material necesario: morteros, pistilos, espátulas, muestras y hielo.

4. Se seleccionó la muestra (tejido asintomático) y desinfecto con hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 minuto y se enjuagó con agua destilada por 2 minutos.
5. Se dejó secar y se agregó un mL de CTAB al 2 % al mortero con la muestra.
6. Se agregó 0.1 g de PVP (Polyvinylpyrrolidone) hasta obtener una mezcla fina y homogénea. Después se pasó la mezcla a tubos eppendorf y se agitó con el aparato agitador @Clever.
7. Se incubó a baño María a 65 °C por 30 minutos, agitando cada 10 minutos. Se centrifugó a 11,500 g (~12,000 rpm) por 10 minutos.
8. Se pasó la fase acuosa (750 µl) a tubos de 1.5 ml nuevos y se agregaron 790 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24: 1) y se agitó por inversión durante 10 minutos.
9. Se centrifugó a 8000 g (~10, 000) durante 10 minutos. Se repitió el paso 8 extrayendo 600 µl de solución acuosa y agregaron 800 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) en tubos de 1.5 nuevos dentro de la cámara de extracción de gases.
10. Se agitaron por inversión durante 10 minutos y centrifugó a 11,500 g (~12,000) por 10 minutos.
11. Se transfirió la solución acuosa a tubos nuevos de 1.5 ml.
12. Se agregó 20 ml de Acetato de sodio y 400 µl de etanol al 70 % (Mezclar suavemente).
13. Se almacenó a temperatura de – 20 °C por 2 horas.
14. Se centrifugó a 11,500 g (~12,000 agitación ligera) durante 20 minutos y se decantó (o sacar el líquido con una punta y dejar el pellet de ADN).
15. Se agregó un ml de Isopropanol al 70 %, y se centrifugo a 8000 g (~10,000) por 5 minutos.
16. Se decantó (o sacar el líquido con una punta y dejar el pellet de ADN) y se agregaron 400 ml de agua HPLC e incubo a 55 °C por 15 minutos.
17. Se añadió 34 µl de acetato de sodio (NaO Ac 3M) y ml de Etanol 95 %. Se almacenó a 20 °C por 1 h.
18. Se centrifugó a 11,500 g (~12,000) por 10 minutos y se decantó el sobrenadante.

19. Lavado 1: Se Lavó con 600 µl de Isopropanol al 70 % y se centrifugó a 11,500 g (↪ 12,000) por 5 minutos (Decantar).  
Lavado 2: Se lavó con 600 µl de Isopropanol al 70 % y se centrifugo a 11,500 g (↪ 12,000) por 5 minutos (Decantar). El número de lavados dependerá del color de la pastilla y al término dejarla secar por 30 minutos.
20. Se re suspendió la pastilla en 100 a 200 µl de agua HPLC, de acuerdo al tamaño de la pastilla y se incubó a 60°C por 10 minutos.
21. Se extrajo solo la parte superior del ADN, dejando de 10 a 20 µl (solución sucia).
22. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **Extracción de ADN por columnas, Kit Comercial Fast (ID) ®**

1. Se preparó un tubo eppendorf de 200 µl de muestra homogeneizada en Nitrógeno líquido y PVP.
2. Se agregó 1000 µl de Genomic Lyse Buffer con 5 µl de Proteinasa K.
3. Se dio una ligera agitación y se incubó a baño María a 65 °C por 30 minutos en agitación cada 10 minutos.
4. Después de los 30 minutos se centrifugó la muestra a 10,000 rpm a 5 minutos.
5. Se tomaron 500 µl del sobrenadante, pasándolo a un tubo nuevo y se agregó 500 µl de Genomic Bind Buffer (pipetear) y después se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos.
6. Se tomaron 650 µl de sobrenadante y se transfirió a un filtro con la columna receptor. Posteriormente se centrifugo a 12, 000 rpm por 2 minutos.
7. Se desechó el sobrenadante y se pasó el filtro a un receptor nuevo.
8. Se adicionaron 650 µl de Genomic Wash Buffer y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos.
9. Se retiró el sobrenadante y colocar el filtro en un tubo colector nuevo.
10. Se lavó 3 veces con etanol al 75 % agregando 650 µl y se centrifugaron a 12,000 rpm por 2 minutos.
11. Se centrifugaron a máxima velocidad por 2 minutos.



12. Se transfirió el filtro a un tubo eppendorf nuevo, colocando 200 µl de 1xTE.
13. Se incubó de 5 a 10 minutos por 65 °C.
14. Por último se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto en la columna receptora final.

## 9.4 Caracterización molecular

### 9.4.1 Calidad y concentración de ADN

La concentración de ADN se midió mediante un espectrofotómetro ND- 1000 Nano Drop (®Thermo Fisher Scientific), con parámetros establecidos de 260 y 280 nm que indican que considera los valores de 1.6 y 2.0 ng/µl como muestra de buena calidad, Además se evaluó La presencia de los productos de PCR mediante electroforesis de agarosa al 1.2 %.

Se corrieron por electroforesis en una Celda MS CREEN Cleaver Scientific® con geles de agarosa entre 0.9 % a 1. 2 %, corriendo de 90 a 120 V con buffer tris-borato-EDTA (TBE) concentrado 0.5 x, con tiempos estimados de 2 a 3 horas. Los geles fueron revelados en un foto documentador UVITEC® ULTRA VIOLET-RADIATION 115V-60 Hz. De igual manera se empleó 1.2 µl de un agente de visualización en los geles (Red Gel®) y 2 µl de un Ladder de de 100- 3000pb para determinar el peso molecular de la muestras de ADN.

Para los marcadores moleculares RAPD e ISSR utilizados, se describen sus programas de PCR y cantidades de reactivos utilizados (**Cuadro 3, 4,5 y 6**).

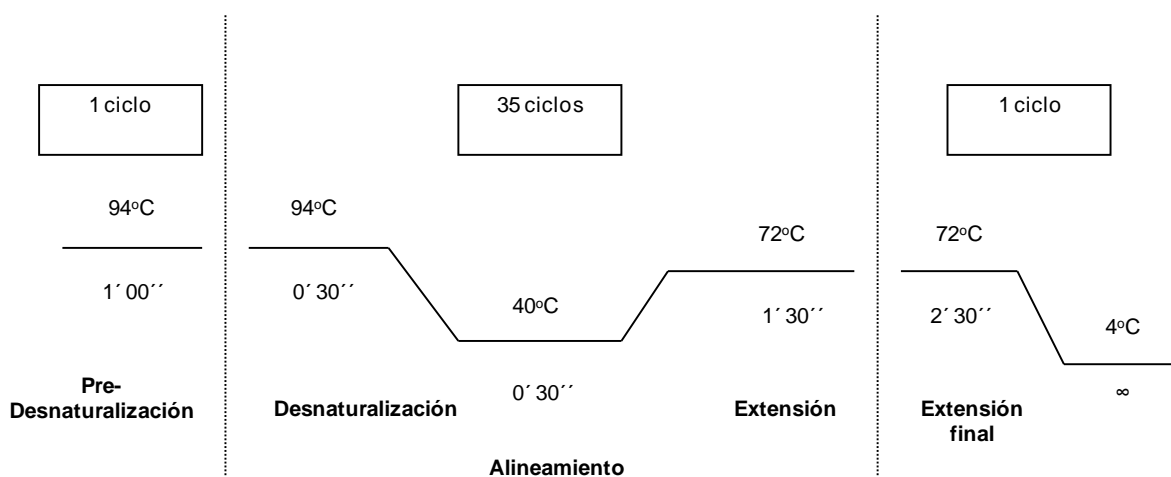
#### **Cuadro 3. 8 Iniciadores RAPD y su secuencia utilizados en la amplificación de ADN de aguacate.**

Iniciadores	Secuencia
A-15 <sup>z</sup>	5'- TTC CGA ACC C-3'
C-08 <sup>z</sup>	5'- TGG ACC GGT G-3'
C-10 <sup>z</sup>	5'-TGT CTG GGT G-3'

C-13 <sup>z</sup>	5'-AAG CCT CGT C-3'
E-07 <sup>z</sup>	5'- AGA TGC AGC C-3'
E-14 <sup>z</sup>	5'-TGC GGC TGA G-3'
E-16 <sup>z</sup>	5'-GGT GAC TGT G-3'
E-18 <sup>z</sup>	5'-GGA CTG CAG A-3'

<sup>z</sup> Iniciadores de Sigma-Aldrich ®

Se utilizó el equipo Gene Amp ® PCR System 2700 AB Applied Biosystems para el programa de termociclaje (**Figura 13 y Figura 14**).



**Figura 13. Programa de PCR de iniciadores RAPD para la amplificación de ADN.**

**Cuadro 4. Componentes de reacción para el análisis tipo RAPD colocados en tubos eppendorf de 500 µL.**

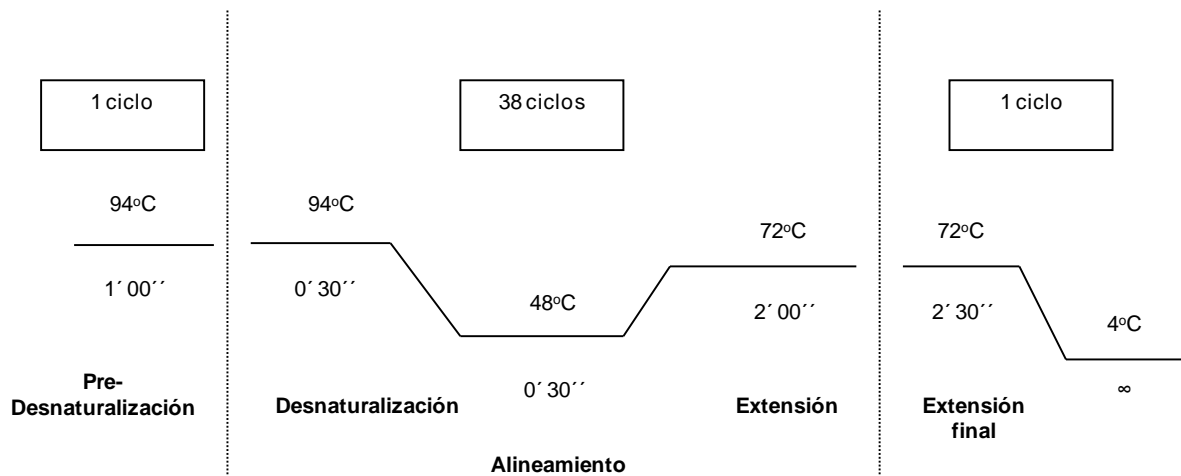
Cantidad	Componente
2 µL	ADN
10 µL	MyTaq™ de @Bioline
2 µL	Iniciador o Primer RAPD(Sigma-Aldrich®)

14 $\mu$ L	Agua HPLC (Sigma <sup>TM</sup> )
<b>Total</b>	<b>28 <math>\mu</math>L</b>

**Cuadro 5. 6 Iniciadores ISSR y su secuencia utilizados en la amplificación de ADN de aguacate.**

Iniciadores	Secuencia
(AC) <sub>8</sub> YG	5'- ACACACACACACACACYG -3'
(GA) <sub>8</sub> YC	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAYC -3'
(TCC) <sub>5</sub> RY	5'- TCCTCCTCCTCCTCCRY -3'
AC(GACA) <sub>4</sub>	5'- ACGACAGACAGACAGACA -3'
DBDA (CA) <sub>7</sub>	5'-DBDACACACACACACACA-3'
(GACA) <sub>4</sub>	5'- GACAGACAGACAGACA -3'

Iniciadores de Sigma-Aldrich ®



**Figura 14. Programa de PCR de iniciadores ISSR para la amplificación de ADN.**

**Cuadro 6. Componentes de reacción para el análisis tipo ISSR colocados en tubos eppendorf de 500  $\mu$ L.**

Cantidad	Componente
2 µL	ADN
10 µL	MyTaq™ de @Bioline
2 µL	Iniciador o Primer ISSR ( <b>Sigma-Aldrich</b> ®)
14 µL	Agua HPLC ( <b>Sigma-Aldrich</b> ®)
<b>Total</b>	<b>28 µL</b>

Para el análisis estadístico Las bandas amplificadas mediante RAPD e ISSR permitieron integrar una matriz de caracteres binarios en el que las bandas polimórficas fueron consideradas como variables discretas donde 1 representó presencia y 0 ausencia, La información fue procesada mediante el software Free Tree (Version 0.91.5) (Pavlíček et al., 1999) y se visualizó mediante el programa TreeView (Page, 2001). Se utilizó el criterio de distancia de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908) y el método Neighbord-Joining (Saitou & Nei, 1987). Para el agrupamiento de los datos en el caso de RAPD, el mismo criterio de distancia de similitud y el método de construcción UPGMA (Sneath, & Sokal, 1973) para ISSR, se realizó un bootstrapping de 1000 repeticiones en cada caso.

La eficiencia de los iniciadores utilizados fue calculada mediante; a) el Contenido de Información polimórfica (PIC) de los iniciadores, la cual se calculó mediante la ecuación (a) descrita por Roldan- Ruiz et al. (2000).

$$PIC_i = 2f_i (1-f_i) \quad (a)$$

Donde PIC<sub>i</sub>, es el contenido de información polimórfica, f<sub>i</sub> es la frecuencia de las bandas presentes y 1-f<sub>i</sub> correspondió a la frecuencia de las bandas ausentes. De acuerdo a De Riek et al. (2001) el valor máximo de PIC es de 0.5 en marcadores de carácter dominante.

b) El poder de resolución (Rp) de los iniciadores se calculó mediante la fórmula (b) descrita por Prevost y Wilkinson (1999).

$$R_p = \sum I_b \quad (b)$$

Donde I<sub>b</sub>, representa la informatividad de la banda calculado mediante la fórmula (c):

$$I_b = 1 - (2x | 0.5 - p|) \quad (c)$$

Donde  $p$ , correspondió a la proporción de todos los genotipos que contienen a la banda y  $I_b$  al porcentaje de bandas polimórficas.

## 10. Resultados

### 10.1 Caracterización morfológica

#### 10.1.1 Descripción de los individuos “cascarudos” *Persea* sp. del Estado de México.

Este tipo de aguacates se ubica distribuido en regiones cálidas, siendo en sitios de transición de bosque mesófilo de montaña, pino-encino, selva baja caducifolia y pastizales (Challenger & Soberon, 2008), con un clima templado y semicálido subhúmedo, característico como el de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro

Los árboles, en la mayoría de las veces son de forma ascendente y escasas ocasiones de forma irregular y una altura promedio de 12 a 20 metros, con una edad aproximada de 80 a 100 años de antigüedad de acuerdo con la información proporcionada por los propietarios. La pubescencia en sus brotes juveniles es notoria a simple vista con un color verde claro (**Figura 15**). Sus hojas tienen una forma que va desde oval a obovoide donde predomina la longitud más que la anchura con intervalos de 16 a 20 centímetros, y con una característica especial como lo es la pubescencia en el envés que va de moderada a alta y un leve olor anís cuando se tritura con las manos (**Figura 16**).

Las inflorescencias de este tipo de aguacate están presentes a mediados de febrero, van de intermedias a abundantes con un ciclo anual, en su mayoría con un hábito de floración tipo A, de acuerdo a los descriptores sugeridos por IPGRI (1995) y UPOV (2006), y lenticelas de color verde en sus brotes jóvenes de crecimiento. La pubescencia de los sépalos internos y pétalos va de moderada a densa, caso

contrario a las especies del subgénero *Eriodaphne* que son glabras en sus estructuras florales siendo éste el carácter de separación entre ambos subgéneros como lo mencionó Kopp (1966). Cuentan con un estilo floral torcido en su mayoría muy pubescente pero corto y un nectario séstil (**Figura 17**).

Los frutos del individuo conocido como “el cascarudo”, denominado así por su cascara tan gruesa, coriácea y corchosa que va de 1.20 a 2 mm, el fruto es de forma aperlada a piriforme de una longitud de hasta 11 a 16 cm y un diámetro promedio de 7 cm, presenta cuello bien expresado, madura en purpura a negro desde la parte estilar hasta la punta, color de la pulpa va de amarillo a verde, de consistencia acuosa a grasienta, ligeramente con olor a anís y con fibras conspicuas, la semilla es de forma ovada de tamaño considerable lo que hace que su relación con el fruto sea muy grande y tenga poco espacio de la pulpa, sin embargo tiene una débil adherencia al cotiledón (**Figura 18 y Figura 19**).

La anterior descripción del aguacate tipo cascarudo se contrasta con las principales características de los individuos y especies de referencia del estudio como puede observarse en el Cuadro 7 y las figuras relacionadas en los párrafos anteriores, donde se observan las características más sobresalientes (Hoja, Flor y Fruto); en este primero (**Cuadro 7**) se compara además con las tres razas de la especie *P. americana* Mill. Se observa que es semejante a *P. tolimanensis* en variables como; pubescencia en el envés de la hoja, consistencia y grosor de la cascara, superficie del fruto, y habito del árbol. En tanto que con la raza Guatemalteca es semejante a altura del árbol y altitud de desarrollo sobre el nivel del mar, relación longitud / diámetro de fruto, grosor y consistencia de la cascara, color de fruto maduro y tamaño del árbol, siendo únicas las características del cascarudo en olor intermedio a anís y sabor amargo del fruto.

**Cuadro 7. Características morfológicas y ambientales distintivas entre las especies de estudio.**

Carácter	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>	raza Costarricensis	<i>Persea tolimanensis</i>	<i>Persea floccosa</i>	<i>Persea</i> sp/ "casarudo"
<b>Clima</b>	Semitropical a templado	Subtropical	Tropical	Tropical	templado	Templado a húmedo	Templado semicálido
Altura sobre nivel del mar (m)	<u>Sobre 2000 - 2700</u>	<u>Entre 1000 a 2000</u>	Menos de 1000	Entre 800 a 1500	<u>1800</u>	1880 – 2500	<u>1900</u>
<b>Hoja:</b>							
Relación longitud /Anchura (cm)	Pequeña 1.5-1.8	Media-Grande 2.4-2.9	Grande 2.7-2.9	Media 2.1-2.4	Pequeña-Media 1.27-2.46	Pequeña-Media 1.48-2.3	Media-Grande 2.4-2.7
Color	<u>Verde obscuro</u>	V. obscuro	V. pálido	V. obscuro	V. obscuro	V. obscuro	<u>V. Obscuro</u>
Color de brote	Rojizo	Verde	Verde amarillo	Verde	Verde	Verde rojizo	Verde
Pubescencia/envés	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<u>Densa</u>	<u>Densa</u>	<u>Densa</u>
Aroma a anís	<u>Fuerte</u>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<u>Ausente a Intermedio</u>
<b>Fruto maduro:</b>							
Relación/Longitud Diámetro (cm)	Pequeña 1.25-1.46	<u>Media</u> <u>1.67-1.88</u>	Muy grande 2.51-2.73	Pequeña 0.83-1.04	Pequeña 1.03-1.14	Pequeña 1.04-1.46	<u>Media-Grande</u> <u>1.7-2.23</u>
Grosor de cascara	Muy Delgada 0.15-0.5	<u>Moderadamente Gruesa</u> <u>2.78-3.26</u>	Moderadamente delgada 0.83-1.31	Moderadamente delgada 0.83-1.31	<u>Moderadamente Gruesa</u> <u>2.78-3.26</u>	Moderadamente delgada 0.46-0.78	<u>Media a Moderadamente Gruesa</u> <u>1.34-2.4</u>
Consistencia de la cascara	Membranosa	<u>Corchosa</u>	Membranosa-coriácea	Corchosa	<u>Corchosa</u>	Coriácea	<u>Corchosa</u>
Superficie del fruto	Lisa	<u>Muy rugosa</u>	Lisa	Rugosa	<u>Muy rugosa</u>	Rugosa	<u>Muy rugosa</u>
Contenido de aceite	Alto contenido	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
Sabor	A anís	Ligero en ocasiones Nogado	Ligero, dulce con terminación amarga	Sin sabor específico	Amargo y granuloso	Ligero, Nogado	Semiamargo
Color de fruto maduro	Verde-rojizo	<u>Negro</u>	Verde claro	Negro	<u>Verde-púrpura oscuro</u>	Verde medio-verde oscuro	<u>Verde oscuro-negro</u>
Relación Longitud de fruto / Longitud de semilla (cm)	Media 3.03-3.46	Muy pequeña 1.28-1.71	Pequeña 2.15-2.59	Pequeña 2.15-2.59	Muy pequeña 1.28-1.78	Pequeña 2.15-2.59	Muy grande 4.78-5.21
Tamaño del árbol	Mediano 15m	<u>Alto</u> <u>30m</u>	Alto 30m	Alto 30m	Mediano 12m	Mediano 12m	<u>Alto</u> <u>25m</u>
Habito de crecimiento	Abierto	Erecto	Abierto y erecto	Abierto	Erecto	Piramidal y abierto	Erecto



**Figura 15. Pubescencia blanquecina en brote tierno del individuo "cascarudo", proveniente de Ixtapan el Oro, Reyes- Alemán, 2018.**



**Figura 16. Pubescencia en las venas de la hoja del individuo "cascarudo", proveniente de Ixtapan el Oro, Reyes- Alemán, 2018.**





**Figura 17. Estructura floral del individuo "casarudo", proveniente de Zumpahuacán; Autor, Marzo 2019.**



**Figura 18. Fruto del individuo "casarudo", proveniente de Zumpahuacán; Autor, 8 de Diciembre, 2018.**

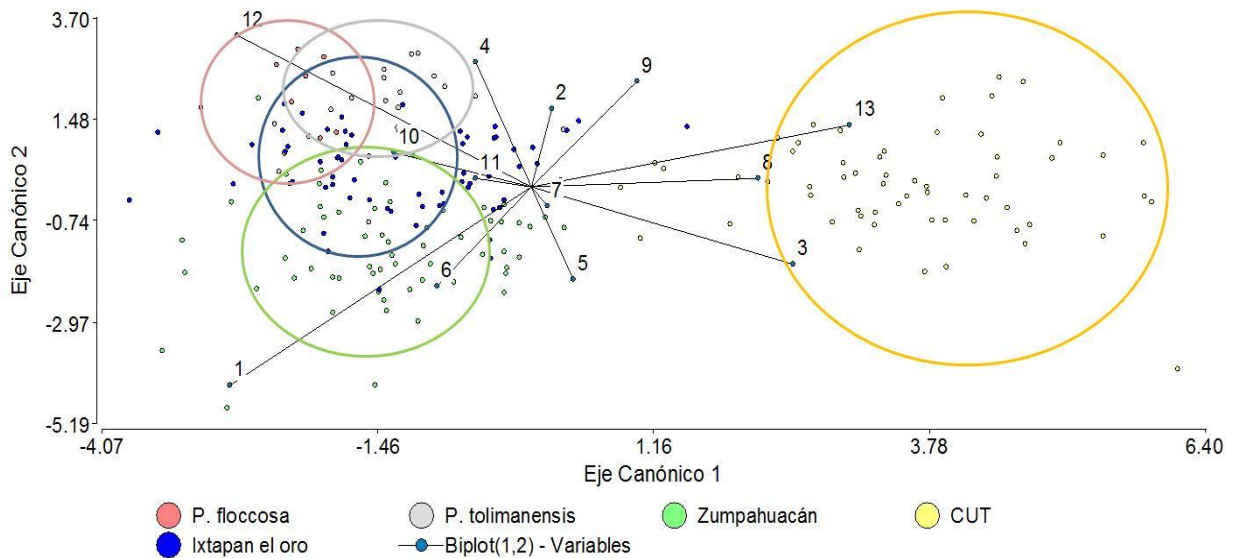


**Figura 19. Acercamiento de fruto de imagen anterior. Permite observar el grosor aproximado de la cascara y la separación de la cavidad de la semilla y su pulpa.**

### **10.1.2 Análisis morfológico**

#### *Análisis discriminante*

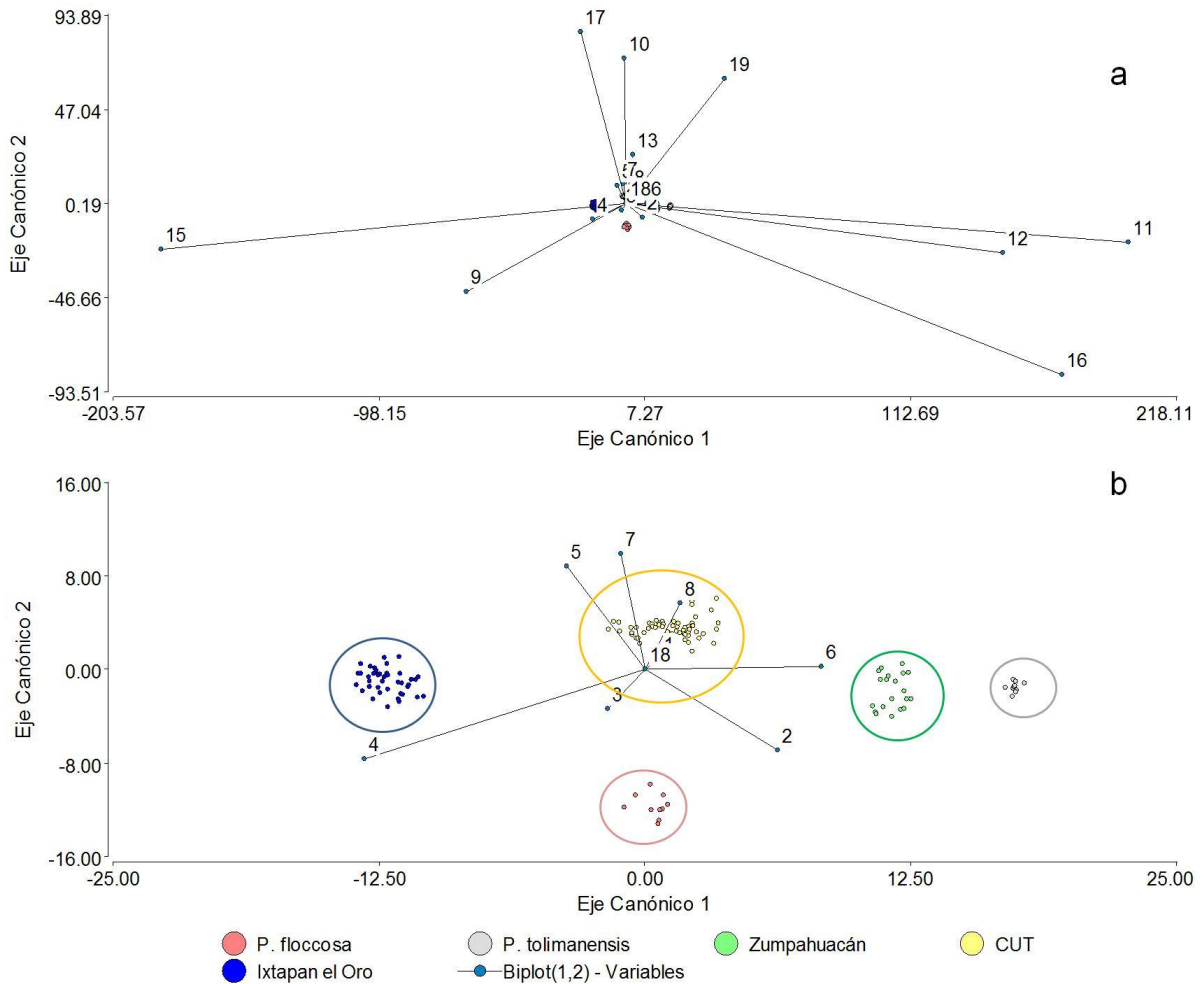
El análisis discriminante de hoja, generó cinco grupos (**Figura 20**), en los que se observó similitud entre colectas con los genotipos de referencia (*P. tolimanensis* y *P. floccosa*) en caracteres como densidad de pubescencia que va de media a densa y ondulación de hoja de débil a media. En Zumpahuacán destaca la longitud de hoja como variable más importante en la separación entre sus individuos con las poblaciones de referencia, con intervalos de 16 a 37.5cm de longitud, consideradas de media a muy larga. La población del CUT confirma su separación por los caracteres mencionados.



**Figura 20. Análisis discriminante de hoja de 22 colectas con 13 variables requiriendo 5 agrupaciones de acuerdo las poblaciones determinadas.**

1 = Longitud de hoja (cm), 2 = Ancho de hoja (cm), 3 = Relación longitud / ancho de hoja, 4= Longitud de peciolo (cm), 5 = Número de venas secundarias (numero), 6 = Forma de la hoja, 7 = Forma del ápice, 8 = Torcedura de la hoja, 9 = Torcedura del ápice, 10 = Ondulación de la hoja, 11 = Relieve de las venas superiores, 12 = Densidad de la pubescencia en el envés de la hoja, 13 = Olor a anís de la hoja

El análisis discriminante de flor (**Figura 21a**), se efectuó con base en 19 variables en 14 colectas. Para visualizar a los individuos de las poblaciones, fue necesario realizar cortes en los ejes canónicos X y Y, de 20 y 16 puntos absolutos respectivamente (**Figura 21b**), dejando expuesto cada individuo con sus repeticiones para poder visualizar con claridad la separación de los grupos, los grupos se separaron por cinco variables; densidad de la pubescencia del sépalo que va de baja a media (Ixtapan del Oro), tipo de nectario en su mayoría pedunculado (Zumpahuacán y *P. tolimanensis*), presencia de polen en la mayoría de las inflorescencias (Zumpahuacán), abundancia de la floración de intermedia a densa (Ixtapan del Oro) y lenticelas de color rojizo (*P. floccosa*).



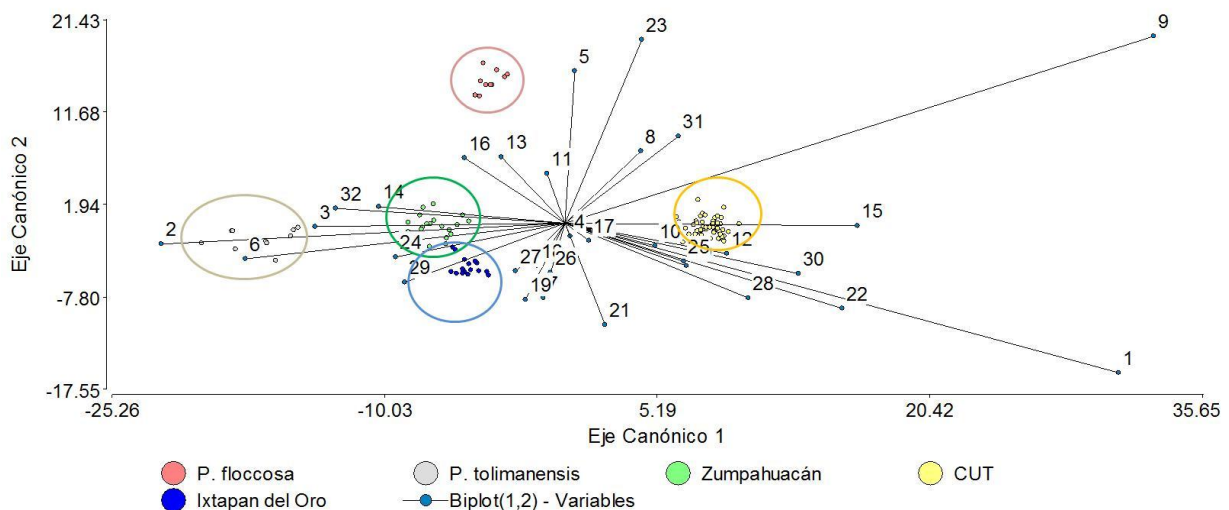
**Figura 21. Análisis discriminante de inflorescencias de 14 colectas con 19 variables requiriendo 5 agrupaciones de acuerdo las poblaciones determinadas.**

1 = Longitud el eje principal de la inflorescencia (cm) , 2 = Número de ramificaciones por inflorescencia, 3 = Número flores por inflorescencia, 4 = longitud se pedicelo (mm), 5= Longitud de pétalos (mm), 6 = Ancho de pétalo, 7 = Longitud de sépalo, 8 = Ancho e sépalo, 9 = Color de lenticelas, 10 = Tipo de floración, 11 = Tipo de nectario, 12 = Presencia de polen, 13 = Estilo de la flor, 14 = Pubescencia de sépalo interno, 15 = Densidad de la pubescencia del sépalo, 16 = Abundancia de la floración, 17 = Posición de la inflorescencia, 18 = Pubescencia del pétalo, 19 = Densidad de la pubescencia del pétalo.

Las inflorescencias de las colectas del CUT (*Persea americana* var. *drymifolia*), se distinguieron con claridad de las demás poblaciones mediante los caracteres; longitud de pétalo, longitud y ancho de sépalo, manteniéndose un grupo compacto no obstante que el tamaño de muestra fue mayor que el resto de agrupamientos. Los grupos de Zumpahuacán y *P. tolimanensis* se separaron por el estilo de la flor,

tipo de nectario, pubescencia y ancho del pétalo habiendo entre ellas similitud pero sin combinarse.

Con respecto al análisis discriminante de fruto, se visualizó (**Figura 22**), afinidad del agrupamiento de Zumpahuacán con la especie *P. tolimanensis* con semejanza en el grosor de cascara de 0.9 a 2.2 mm y diámetro de fruto de 5.73 a 7.90 cm. El agrupamiento de Ixtapan se caracteriza por la consistencia seca de la pulpa de su fruto y en el grupo de la raza mexicana del CUT, las variables discriminantes fueron brillantez del fruto y la depresión del extremo peduncular de su fruto.



**Figura 22. Análisis discriminante de fruto de 12 colectas con 32 variables con base en 5 agrupaciones de acuerdo con las poblaciones determinadas.**

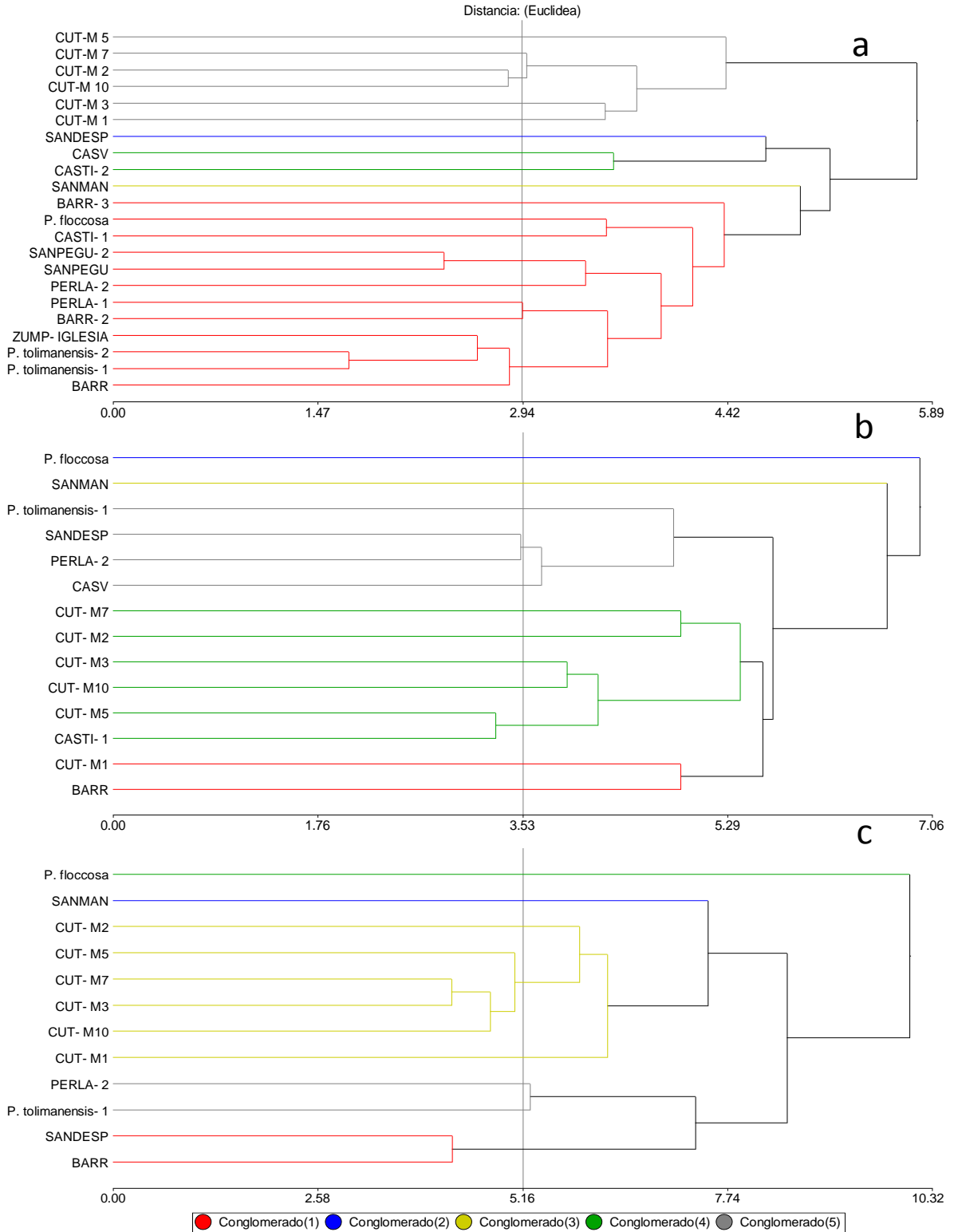
1 = longitud de fruto (cm), 2 = Diámetro de fruto (cm), 3 = Relación Longitud/ Diámetro (cm), 4 = Diámetro de inserción del pedicelo (mm) 5 = Longitud de pedicelo (cm), 6 = Grosor de la cascara (mm), 7= Forma del extremo peduncular, 8 = Presencia de cuello, 9 = Depresión del extremo peduncular, 10 = Posición del pedicelo, 11 = Forma de la parte estilar, 12 = Conspicuidad de lenticelas, 13 = Tamaño de lenticelas, 14 = Color de lenticelas, 15 = Brillantez, 16 = Superficie, 17 = Persistencia del perianto, 18 = Grosor en comparación con el pedúnculo, 19= Forma del pedicelo, 20 = Color del pedicelo, 21= Superficie del pedicelo, 22 = Color de fruto maduro, 23 = Consistencia de la cascara, 24 = Adherencia de la cascara la pulpa, 25 = Color principal de la pulpa, 26 = Color junto a la cascara, 27 = Ancho de la capa junto a la cascara, 28 = Conspicuidad de fibras en la pulpa, 29 = Consistencia de la pulpa, 30 = Aroma a anís de la pulpa , 31 = Relación de longitud de fruto/ longitud de semilla, 32 = Pedicelo con cabeza de clavo.

### *Análisis de conglomerados*

Los análisis de conglomerados mediante la técnica Promedio (Average Linkage) con una distancia Euclídea de 2.92 para hoja, 3.53 para flor y 5.16 para fruto, permitieron generar agrupamientos, para el caso de hoja (**Figura 23a**): se distingue un agrupamiento que incluye a los individuos de *Persea americana* var. *drymifolia*, con su hoja típica aguda lanceolada, en tanto que las poblaciones de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro correspondientes a los individuos cascarudos se distribuyen en un agrupamiento y se evidencia similitud entre sus hojas generalmente grandes, redondas y pubescentes con excepción de la colecta SANMAN que queda aislada de las demás, no obstante el olor a anís de las hojas de este individuo es evidente.

En el conglomerado de flor (**Figura 23b**), las inflorescencias correspondientes a las colectas del CUT se agrupan en la primera ramificación, a excepción del genotipo CUT-M1 que se muestra cercano al cascarudo Ixtapan del Oro (BARR) evidenciando su similitud probablemente por la longitud de sus pétalos y sépalos. En un segundo agrupamiento se integran colectas de individuos cascarudo de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro con la especie *P. tolimanensis*. Sin embargo, se observan muy afines la especie *P. floccosa* y el tipo cascarudo SANMAN, por variables como la densidad de la pubescencia en sépalos y pétalos, distintivos de *P. floccosa*.

En los frutos de las colectas de acuerdo al conglomerado generado (**Figura 23c**), se repite la afinidad evidenciada en la flor entre SANMAN y *P. floccosa*, por variables como la forma aplanada, lenticelas corchosas y cáscara verde de fruto típicas de *P. floccosa* mientras que un agrupamiento compacto lo integró la raza Mexicana (CUT). Una similitud de fruto muy interesante se observa entre la colecta PERLA-2 y *P. tolimanensis* y afín a ellos las colectas SANDESP y BARR, que corresponden a cascarudos de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro respectivamente, en estos predomina la semejanza de los caracteres de fruto; grosor de cascara, lenticelas corchosas, así como similitud en forma, longitud y consistencia de pulpa.



**Figura 23. Análisis de conglomerados delimitado por 5 agrupamientos. a) Hoja, b) Flor y c) Fruto de 22, 14 y 12 colectas respectivamente.**



## 10.2 Caracterización molecular

El ADN extraído de las muestras fue apropiado para los análisis RAPD e ISSR. El cociente de medición fotométrica  $OD_{260/280}$  que presento vario entre 1.96 a 6.26 donde los parámetros establecidos mínimo de ADN puro aceptado es de 2.0 a 2.2, lo que indicó que no hubo presencia de contaminantes como carbohidrato y fenoles que pudieran afectar la PCR (Velázquez, Martínez & Romero, 2014) (**Cuadro 8**).

**Cuadro 8. Cantidad de ADN obtenido mediante espectrofotometría.**

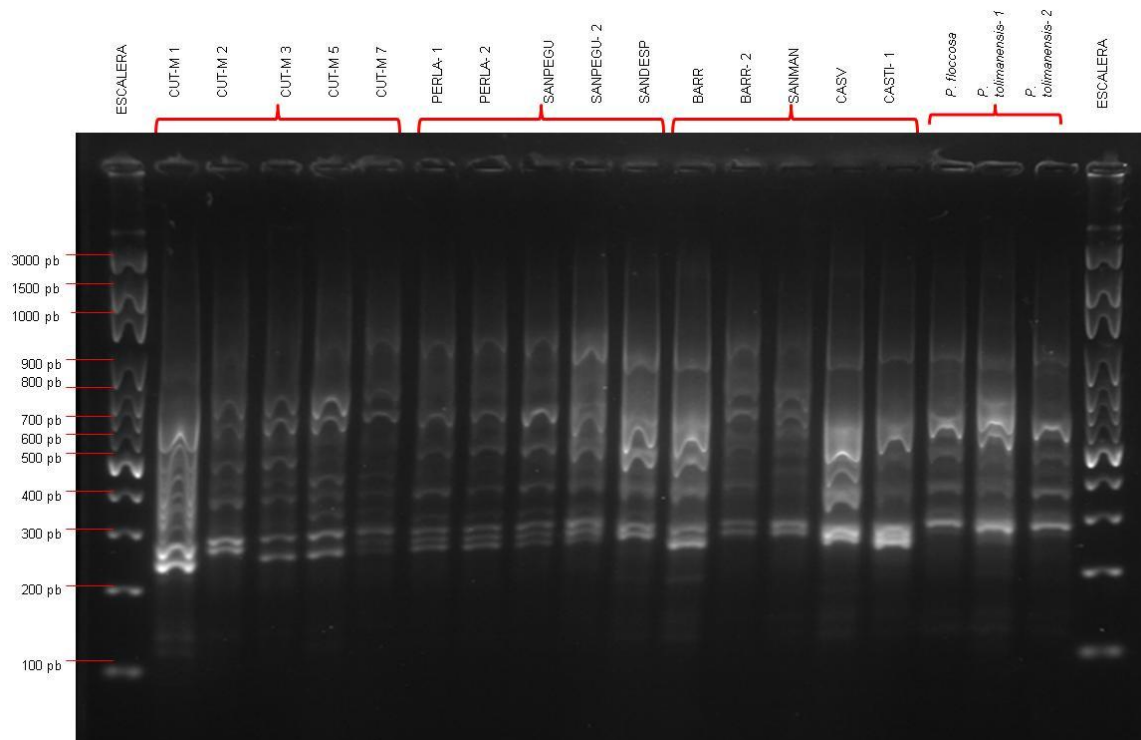
No. de Muestra	Origen	Clave-Origen	Cantidad ng/ $\mu$ L	Ratio A260/280
1	Ixtapan del oro, Estado de México	CASV	46	2.3
2	“ ”	CASTI- 1	82	2.06
3	“ ”	SANMAN	41	1.96
4	“ ”	BARR	140	2.13
5	“ ”	BARR- 2	41	2.18
6	Zumpahuacán, E. de México	SANDESP	16	2.95
7	“ ”	SANPEGU	16	2.43
8	“ ”	SANPEGU- 2	25	4.94
9	“ ”	PERLA- 1	26	2.5
10	“ ”	PERLA- 2	32	3.77
11	UAEM, Plantel Tenancingo	CUT-M 1	44	4.22
12	“ ”	CUT-M 2	200	2.13
13	“ ”	CUT-M 3	44	3.7
14	“ ”	CUT-M 5	66	2.9
15	“ ”	CUT-M 7	378	2.11
16	CICTAMEX	<i>P. floccosa</i>	45	3.48
17	CICTAMEX	<i>P. tolimanensis- 1</i>	38	5.95
18	CICTAMEX	<i>P. tolimanensis- 2</i>	38	6.26

### 10.2.1 Marcadores moleculares RAPD y Marcadores moleculares ISSR.

Los dos sistemas de iniciadores tipo RAPD e ISSR utilizados, mostraron un 99 % de polimorfismos (**Figuras 24 y 25**) con productos de PCR de 250 a 900 pb con 1417 bandas reconocidas para RAPD y 200 a 1000 pb con 917 bandas para ISSR



en las 18 colectas. La habilidad de los primers más informativos se diferenció por el contenido de información polimórfica (PIC) y el poder de resolución (RP); en el sistema RAPD el PIC vario de 0.36 para el iniciador A15 a 0.50 para el E18 y C13 con un promedio de 0.45 donde E18 fue el iniciador más informativo; en ISSR el PIC oscilo de 0.46 para (TCC)<sub>5</sub> RY y 0.50 para (AC)<sub>8</sub> YG, DBADA (CA)<sub>7</sub>, y (GA)<sub>8</sub> YC. El RP en el sistema RAPD tuvo una tasa de 64.64 puntos con variaciones de 1.33 para A15 hasta 16.33 para E16 siendo este el más eficiente, en ISSR el RP fue de 34.83, siendo de 3 para DBADA (CA)<sub>7</sub>, y (GA)<sub>8</sub> YC a 14.08 para (TCC)<sub>5</sub> RY con un promedio de 5.81 (**Cuadro 9**).



**Figura 24. Ejemplo de fragmentos derivados de ADN genómico de colectas del género *Persea* mediante RAPD del iniciador C-10.**

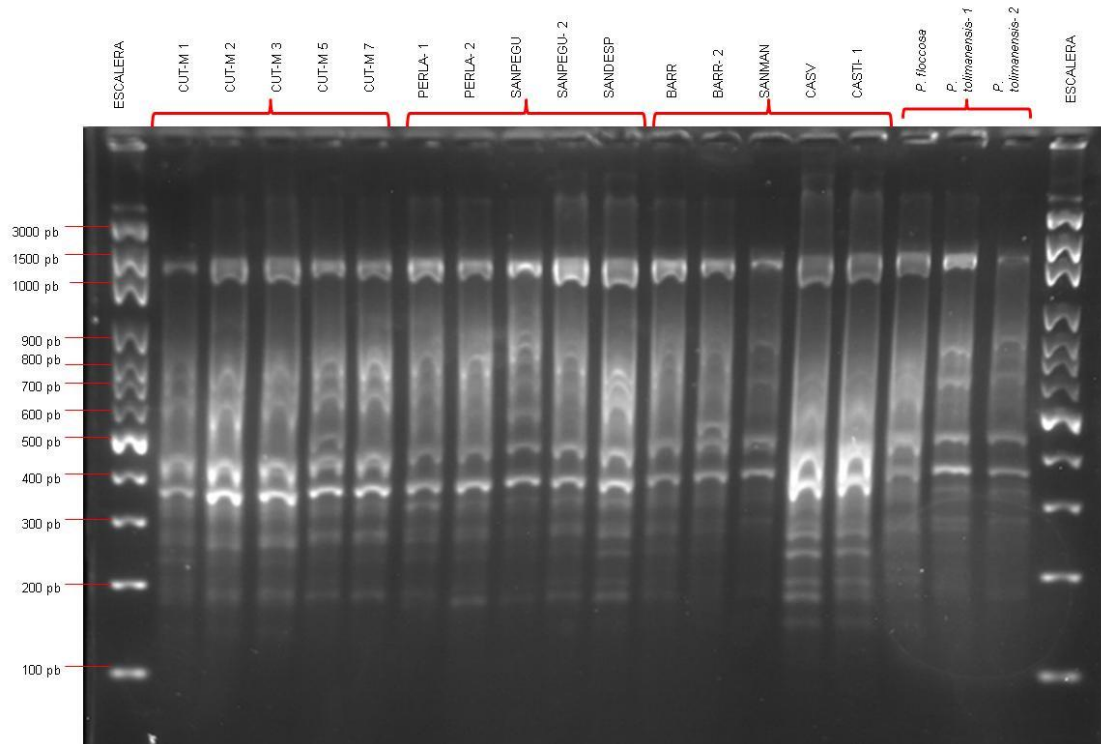


Figura 25. Ejemplo de fragmentos derivados de ADN genómico de colectas del género *Persea* mediante ISSR del iniciador TCC-5RY.

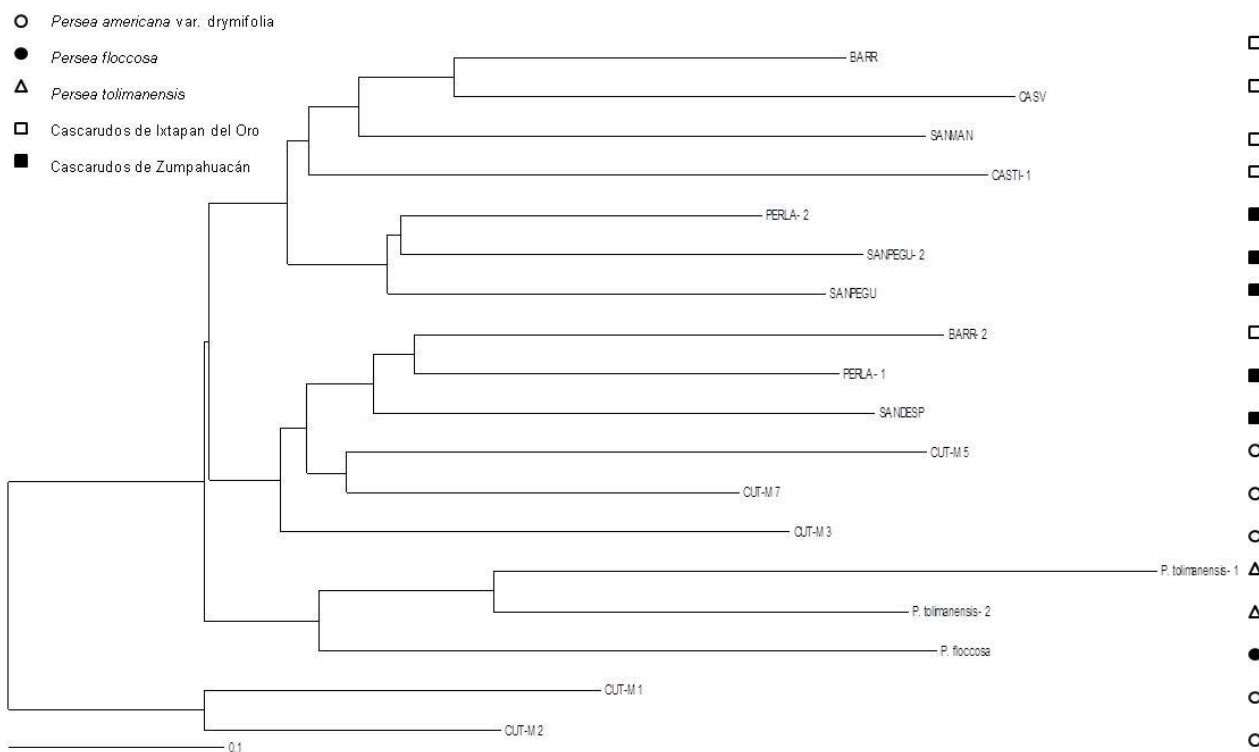
Cuadro 9. Iniciadores usados para el ADN de colectas del género *Persea*.

Tipo de marcador	Clave del iniciador	N. bandas/ fila	PIC	RP
RAPD	A 15	17	0.36	1.33
	C 08	13	0.43	14.08
	C 10	7	0.44	4.08
	C 13	10	0.50	8.33
	E 7	10	0.48	8.33
	E 14	5	0.47	2.08
	E 16	14	0.49	16.33
	E 18	11	0.50	10.08
	<b>Total</b>		<b>87</b>	<b>3.67</b>
	<b>Promedio</b>	<b>10.87</b>	<b>0.45</b>	<b>8.08</b>
ISSR	AC(GACA) <sub>4</sub>	7	0.49	4.08
	DBADA (CA) <sub>7</sub>	6	0.50	3
	(AC) <sub>8</sub> YG	8	0.50	5.33
	(GA) <sub>8</sub> YC	6	0.50	3
	(TCC) <sub>5</sub> RY	13	0.46	14.08
	(GACA) <sub>4</sub> **	8	0.49	5.33
	<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>2.93</b>

Promedio	8	0.49	5.81
----------	---	------	------

### 10.2.2 Relaciones genéticas y similitudes entre colectas.

Las relaciones genéticas entre colectas estimadas a partir de los datos de los marcadores mediante el coeficiente Jaccard (1908) y el método Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) para RAPD y Jaccard (1908) con UPGMA (Sneath, & Sokal, 1973) para ISSR, confirman la divergencia genética entre las colectas descritas abajo (**Figuras 26 y 27**).



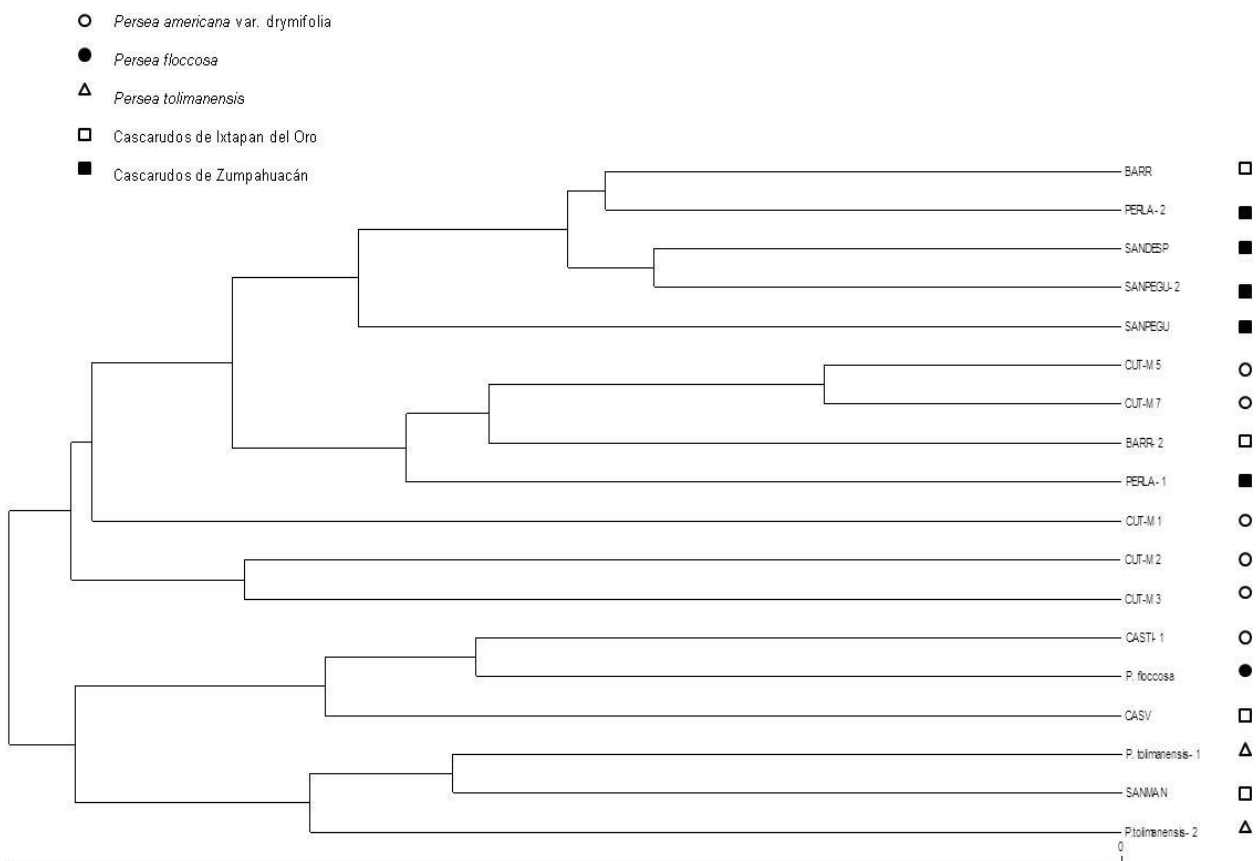
**Figura 26. Dendrograma de 18 colectas de *Persea americana* obtenido con RAPD, con un análisis estadístico combinado de ocho iniciadores, utilizando el índice de Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”).**

En el caso de RAPD, la formación del árbol filogenético resultó en una agrupación de acuerdo al origen proveniente de las colectas en el estudio (**Figura 26**), planteando cuatro agrupamientos de inicio. Se observa una separación de las

especies bien identificadas como *P. tolimanensis* y *P. floccosa*, integradas en el estudio como referencia de parentesco de algunos caracteres morfológicos.

Por otra parte, los individuos denominados propiamente como “cascarudos” colectados en las zonas de Zumpahuacán e Ixtapan del oro, formaron un grupo de siete integrantes que demuestran una relación genéticamente similar.

La formación del último grupo revela que integrantes provenientes de las dos regiones geográficas de colecta comparten algunas características genéticas con la especie de *P. americana* var. *drymifolia*, que son genotipos bien identificados o mejor conocidos como “aguacate criollos”, obtenidos ex situ del Huerto del Centro Universitario Tenancingo y algunos autores mencionan que esta especie tiene orígenes ancestrales en Centroamérica, lo cual explica la interacción geográfica que compartían con los genotipos de “cascarudos” en el momento de la colecta.



**Figura 27. Dendograma de 18 colectas de *Persea americana* obtenido con ISSR, con un análisis estadístico combinado de seis iniciadores, utilizando el índice Jaccard y el método UPGMA con un remuestreo de 1000 repeticiones (“bootstrap”).**

En contraste, con los marcadores ISSR (**Figura 27**), la separación de las colectas generó cuatro agrupaciones evidentes, donde se puede repetir la agrupación de especies bien identificadas como son *P. americana* var. *drymifolia* como lo es; CUT-M1, CUT-M2 Y CUT-M3, sin embargo en otro grupo con dos integrantes de esta variedad son aislados en el filograma de manera singular y compartiendo algún tipo de características con las colectas de interés.

Por otro lado en otra agrupación, individuos de la región de Ixtapan del Oro guardan una relación genética importante con la especie *P. floccosa*, la cual de manera morfológica muestra evidentes características similares a las colectas de los aguacates “cascarudos”.

Otra bifurcación del filograma muestra un grupo que contiene individuos tanto de Ixtapan del Oro y Zumpahuacán, que pudieran compartir algunas características genéticas como se ha planteado en primera instancia con variables morfológicas en el presente estudio.

## **11. Discusión**

### **Caracterización morfológica**

Morfológicamente se generaron 5 grupos de individuos al analizar la hoja, donde se destaca similitud de las colectas con los genotipos de referencia (*P. tolimanensis* y *P. floccosa*). Se destaca que la hoja oval, pubescencia en hoja y grosor de cáscara de fruto que los asemeja a los aguacates cascarudos con *P. tolimanensis* y *P. floccosa* (Schieber, & Zentmyer, 1972; Schroeder, 1951), este último caracterizado por su fruto ovoide a obovoide de 5 cm de longitud, de hoja y brotes jóvenes pubescentes (Williams, 1977). *P. floccosa* es considerado una especie rara de montaña relacionado con *P. nubigena*, distinguible de este por su pubescencia. Asimismo *Persea floccosa* y *Persea americana* var. *drymifolia* (Blake, 1920) son muy

similares y han sido relacionados genéticamente (Furnier et al., 1990). Otras especies con abundante pubescencia en hoja son *P. shiedeana* y *P. tolimanensis*.

Otro aspecto morfológico importante es el tipo de flor, los cascarudos de Zumpahuacán se unieron con *P. tolimanensis* por el estilo de la flor, tipo de nectario, pubescencia y ancho del pétalo muy semejante, aunque en el Estado no se reporta la presencia de *P. tolimanensis*, los cascarudos guardan similitud en estas características evidenciando su relación en algún momento. Los aguacates cascarudos se han desarrollado además en poblaciones conjuntas con la raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), con quienes podrían estar genéticamente vinculados. Aunque con relación al cruzamiento, estudios genéticos han señalado que dentro del género o subgénero *Persea*, no hay divergencia entre especies, es decir entrecruzamiento, más bien lo que prevalece es una alta tasa de hibridación al interior del grupo (*Persea*) que lo hace ser considerado un grupo monofilético (van der Werff, 2002).

El análisis discriminante basado en 33 caracteres reveló afinidad del agrupamiento de cascarudos de Zumpahuacán con *P. tolimanensis* al asemejarse en grosor de cascara y diámetro de fruto. Esta probable relación pudo haber sido hace tiempo y de manera muy lenta y por la influencia del hombre, ya que de acuerdo a un estudio el aguacate tendría dificultad para hibridarse con facilidad genéticamente con otra especie o raza. El estudio referido indica que mediante secuenciación de nucleótidos de *P. americana* var *drymifolia* se ha revelado que a pesar de su carácter alógamo, en el caso de la raza Mexicana, su recombinación es muy baja en comparación con la mutación como fuente de su diversidad (Chen et al., 2008), lo anterior al haber encontrado que prevalece una desviación en el equilibrio Hardy Weinberg y un desequilibrio en el ligamiento (LD) (Guzmán et al., 2017), en consecuencia, el criollo mexicano posee dificultad para hibridarse con otra raza, por lo que solo a su interior tiene facilidad para segregar y generar polimorfismos. Chen et al., (2008) habían analizado a las razas de *P. americana* (*drymifolia*, *guatemalensis* y *americana*) y encontraron un aumento significativo en el LD, no así al analizar a las razas por separado; Mexicana, Guatemalteca y Antillana.

Lo anterior fundamenta la preservación de los individuos que han estado confinados geográficamente por el hombre, como es el tipo cascarudo del Estado de México, que al ser poco atractivo por su fruto y sabor en comparación con el criollo mexicano, ha tenido un escaso intercambio humano y probablemente un proceso natural de hibridación que preserva sus características particulares. Sin embargo Ashworth y Clegg (2003), afirman que la hibridación inter racial ha ocurrido muy recientemente de lo supuesto y que a la fecha existen pocas diferencias entre razas. Aunque es probable que la hibridación entre *P. americana* var *drymifolia* con var *guatemalensis* si haya ocurrido durante un periodo largo de tiempo (Williams, 1977).

En un estudio etnobotánico Gama-Campillo y Gómez-Pompa (1992) concluyeron que el aguacate es una especie aún semi domesticada en un proceso continuo de recombinación por el intercambio de material propagativo que inició desde culturas muy antiguas. En este escenario el aguacate cascarudo también podría corresponder a un híbrido inter racial o inter específico originado de forma natural en tiempos recientes.

### **Caracterización molecular**

Los caracteres morfológicos tradicionales para describir al género *Persea* han resultado poco satisfactorios (Rodríguez-Medina et al., 2009; Rohwer et al., 2009), quienes han sugerido robustecer mediante la aplicación de herramientas moleculares. Los marcadores RAPD e ISSR utilizados separaron dos grupos de cascarudos por su origen geográfico, esto sugiere que los genotipos de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro no se han desplazado recientemente por acción del hombre y concuerda con el supuesto de grupos intactos definidos por altitud y latitud (Chen et al., 2008; Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, Simuta-Velázco, Barrientos-Priego, & Gallegos-Vázquez, 2013; Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, & Barrientos-Priego, 2016; Guzmán et al., 2017).

Las relaciones genéticas entre colectas estimadas a partir de los datos de los marcadores mediante el coeficiente Jaccard (1908) y el método Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) para RAPD y Jaccard (1908) con UPGMA (Sneath, & Sokal, 1973) para ISSR, confirmaron la divergencia genética entre las colectas. En el caso

de RAPD, la formación del árbol filogenético resultó en una agrupación de acuerdo al origen proveniente de las colectas en el estudio, se plantean cuatro agrupamientos pero se observó una separación de las especies bien identificadas como *P. tolimanensis* y *P. floccosa*, integradas como especies de referencia. Por lo que pudieron haber participado en el origen de los cascarudos *P. floccosa*, *P. tolimanensis* con *P. americana* pero en la actualidad el tipo cascarudo demuestra que ha adquirido características genéticas particulares y únicas. En el caso de algunos ejemplares de cascarudos de Ixtapan del oro, se revela algo importante mediante ISSR, una relación genética cercana con la especie ancestral *P. floccosa* ya que además de su morfología, se muestra evidencia de su similitud mediante marcadores moleculares.

Es remarcable además la convivencia de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* del género *Persea* en América como indica Rohwer et al. (2009) ya que el tipo de cascarudo en estudio también convive con poblaciones de aguacatillos silvestres del subgénero *Eriodaphne* como lo son en el Estado de México *P. cinerascens* y *P. hintonii* además de *P. americana*. Chanderbali, Soltis, Soltis, y Wolstenholme (2013) refieren a *P. americana* como una especie altamente polimórfica que requiere estudios de genética y campo que ayuden a resolver las controversias taxonómicas actuales que se han generado posterior a la clasificación de Kopp (1966).

Los aguacates cultivados son formas hortícolas de *P. americana*; y los individuos silvestres solo formas geográficas de las mismas especies como lo sugirió Popenoe en 1935, aunque posteriores estudios mediante marcadores RFLP (Furnier et al., 1990) lograron separar a *P. nubigena*, *P. steyermarkii* y *P. floccosa* de *P. americana*; se concluyó que éstos sólo son variantes de *P. americana*, lo que vislumbra otra ruta para poder entender el origen a los cascarudos, es decir que se trate tan solo de formas silvestres de la especie *P americana*.

### **Probable domesticación e hibridación de los cascarudos**

Ashworth y Clegg (2003), sugirieron que las tres razas de *P. americana* fueron domesticadas por separado por las culturas prehispánicas sin haber estado en contacto hasta después de la llegada de los europeos (Chen et al., 2008), por lo que formas como los cascarudos pudieron haber permanecido intactas a la mano del



hombre. A la fecha se reconocen tres razas de *P. americana* (*drymifolia*, *guatemalensis* y *americana*) con características morfológicas y distribución definida en Mesoamérica (Fiedler, Bufler, & Bangerth, 1998; Williams, 1977). Antes de la llegada de los españoles se encontraban separadas por barreras climáticas y topográficas, y eventualmente comenzaron a mezclarse con evidencia clara de introgresión racial (Gama-Campillo & Gomez-Pompa, 1992).

La generación de las principales variedades comerciales de acuerdo a Chen et al. (2008) ha sido en condiciones de altura, como el Centro de México. Williams (1977) indicó que *Persea nubigena* fue antecesor de la raza Guatemalteca de Guatemala, traído a México después de la conquista, comenzando un proceso de hibridación con la raza Mexicana para generar genotipos importantes como fue la variedad "Fuerte" en Puebla, México. Por lo que, el origen del aguacate cascarudo podría considerarse también una hibridación con genotipos afines a la raza Guatemalteca con la Mexicana evidenciado por su cáscara gruesa.

La hibridación ha sido un proceso continuo que conduce a la variabilidad genética del aguacate revelado por estudios morfológicos y moleculares en nuestro país (Cuiris-Pérez, Guillen-Andrade, Pedraza-Santos, López-Medina, & Vidales-Fernández, 2009), en Nuevo León (Gutiérrez-Diez et al., 2009; Acosta Díaz, Almeyda-León, & Hernández-Torres, 2013), en Veracruz (Galindo-Tovar, et al., 2011) en Nayarit (López-Guzmán et al., 2015) y Guerrero (Damían-Nava et al., 2017). La domesticación ha sido un efecto de cuello de botella (Chen et al., 2008), donde se ha seleccionado lo útil; tamaño, tiempo de maduración de fruto, sabor, etc., quedando como relictos los ejemplares poco atractivos como el aguacate cascarudo. De igual importancia, el aguacate fue una de las primeras plantas domesticadas en Mesoamérica como lo fue el área maya, en este tenor, es posible concluir dos causas fundamentales en esta ruta que han hecho que el aguacate cascarudo prevalezca hasta nuestros días; la intervención humana y la hibridación natural (Gama-Campillo & Gómez-Pompa, 1992; Galindo-Tovar et al., 2007).

## 12. Conclusión

La evidencia morfológica obtenida sobre los individuos cascarudos sugiere ubicarlos dentro del género *Persea*, subgénero *Persea* pero sin alguna raza en específico, siendo denominada como *Persea* sp., en un primer avance inicial por las variables densidad de pubescencia de hoja, olor a anís y grosor de cáscara fueron los caracteres más discriminantes en la conformación de grupos.

Los marcadores utilizados ofrecieron una interpretación eficiente de la variabilidad genética del aguacate cascarudo arrojando que se trata de individuos distintos a las razas hortícolas conocidas y diferentes a especies usadas como contrastantes en tanto que se infiere que ha existido una recombinación constante que conduce a la hibridación entre estos individuos.

## 13. Bibliografía

- Acosta Díaz, E., León, A., Humberto, I., & Hernández Torres, I. (2013). Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(4), 531-542.
- Aguilar-Moreno, J., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, J. E., & Almaguer-Vargas, G. (2019). Portainjertos de durazno en déficit hídrico y su caracterización con base a variables fisiológicas y anatómicas. *Bioagro*, 31(2), 91-102.
- Ashworth, V. E. & Clegg, M. T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity*, 94(5), 407-415.
- Azofeifa-D.A. (2006). Revisión bibliográfica. Uso de los marcadores moleculares en plantas; aplicaciones de frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/437/43717210/>.

- Baldwin, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1), 3-16.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., & Donoghue, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri botanical garden*, 247-277.
- Barrientos- Priego, A. F., Reyes Alemán, J. C., Aguilar-Melchor, J. J. (2010). Manual grafico para la descripción varietal de aguacate: Graphic handbook for the description of avocado varieties (1a ed.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SNICS-SAGARPA), Tlalnepantla, Estado de México. 136 p. <https://www.gob.mx/snics/documentos/manual-grafico-para-la-descripcion-varietal>
- Barrientos-Priego A. F., Gutiérrez-Diez A., Heredia-García E., Espíndola-Barquera M. C., López-Jiménez A., Medina Torres R., López-De León R., Esteban Escamilla-Prado E. y Reyes-Alemán J. C. (2010). Resúmenes ejecutivos: ejercicio fiscal. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos. Recuperado de <http://www.sinarefi.org.mx/redes/resejec10papaya.pdf>
- Barrientos-Priego, A. F., & López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. *El aguacate y su manejo integrado*. Téliz, D.; González, H, 19-31.
- Barrientos-Priego, A. F., Muñoz-Pérez, R., Reyes-Alemán, J. C., Borys, M. W., & Martínez-Damián, M. T. (2007). Taxonomía, cultivares y portainjertos. el aguacate y su manejo integrado. Téliz, D. y Mora, A.(Coord.). Segunda edición. Mundi Prensa. México, DF, 31-62.
- Becerra V.V., y Paredes C.M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270-281. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>
- Ben-Ya'acov, A., Bufler, G., Barrientos-Priego, A.F., de la Cruz-Torres, E. and López-L, L. (1992). A study of avocado germoplasm resources, 1988-1990. General description

of the International project and its findings. *Proc. of Second World Avocado Congress II*: 535-541.

Bergh, B and N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* (70), 35-145.

Bergh, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* (76), 61-75.

Blake, S. F. (1920). A preliminary revision of the North American and West Indian avocados (*Persea* spp.). *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 10(1), 9-21.

Borys, M. W., Leszczyńska-Borys, H., Marañen, S. R., Castro, L., & del Campo, F. California Avocado Society 1993 Yearbook 77: 125-136.

Bost, J. B., Smith, N. J. H., & Crane, J. H. (2013). History, distribution and uses. In: Schaffer, B. A., Whiley, A. W., & Wolstenholme, B. N. (Eds.), *The avocado, botany and uses* (pp. 10-30). Oxfordshire, UK: CAB International Publishing. doi: 10.1079/9781845937010.0010

Buckler, E. S., Ippolito, A. and Holsfort, P. (1997). The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. *The Genetics Society of America*, 145(3), 821-832.

Bufler, G., and Fiedler, J. (1996). Avocado Genetic Resources: Final Report. *GIARA B-14*, 50.

Caballero-Martínez, L. A., Rivas-Manzano, I. V., & Aguilera-Gómez, L. I. (2009). Hábitos alimentarios de *Anoura geoffroyi* (Chiroptera: Phyllostomidae) en Ixtapan del Oro, Estado de México, México. *Acta zoológica mexicana*, 25(1), 161-175.

Campos R.E., Espíndola, B.M.C & Mijares O.P. 2008. Diversidad del género *Persea* y sus usos. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Coatepec, Harinas. México. 59 p

Challenger, A., & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres. *Capital natural de México*, 1, 87-108.

- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Ashworth, V. E., Clegg, M. T., Litz, R. E., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30(4), 386-396.
- Chanderbali, A. S., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Wolstenholme B. N. (2013). Taxonomy and botany. In B., Schaffer, B. N., Wolstenholme, & A. W. Whiley (Eds.), *The avocado: botany, production and uses* (2a. ed., pp. 31–50). Wallingford, UK.: CAB International. ISBN 978 1 84593 701 0.
- Chanderbali, A. S., Van der Werff, H. and S. S. Renner. (2001). The relationships and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* (88)104-131.
- Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassouljian-Barrett, S. L., Lafe, K., Bui, U., ... & Cookson, B. T. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4042-4051.
- Chen, H., Morrell, P. L., Cruz, M. D. L., & Clegg, M. T. (2008). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of heredity*, 99(4), 382-389.
- Clegg, M. T., Davis, J. W., & Henderson, D. (1989). Molecular genetics of avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 73, 59-61.
- Clegg, M. T., M. Kobayashi, & J. Z. Lin. 1999. The use of molecular markers in the management of avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 5: 227–231.
- Coy B, D.E., y Cuca S, L.E. (2007). Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia *Lauraceae*. *Scntia et Technica*, (33), 363-364.
- Culley M.T. y A.D. Wolfe. (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity. eBook PackagesSpringer Book Archive*, (86), 545-556. DOI[https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6_1)

- Cruz-Maya, Barrientos-Priego, Zelaya-Molina, Rodriguez-de la O & Alemán, J. C. R. (2018). Phylogenetic analysis of some members of the subgenus *Persea* (*Persea*, Lauraceae). *REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA*, 24(2), 133-150.
- Cuiris-Pérez, H., Guillen-Andrade, H., Pedraza-Santos, M. E., López-Medina, J., & Vidales-Fernández, I. (2009). Genetic variability within mexican race avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm collections determined by ISSRs. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2): 169–175. doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2009.15.023>
- Damián-Nava, A., Palemón-Alberto, F., Moreno-Juárez, J., Hernández-Castro, E., Damián-Díaz, P. E., & Vargas-Álvarez, D. (2017). Characterization of creole avocado fruits harvested from both central and northern regions of Guerrero, Mexico. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 4(10), 151-159
- Davis, J., Henderson. D., Kobayashi M, Clegg MT, and Clegg MT, 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *Journal of Heredity* 89:319–323.
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and applied genetics*, 103(8), 1254-1265.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eguiarte, L. E., Castillo, A. & Souza, V. (2003). Evolución molecular y genómica en angiospermas. *Interciencia*, 28(3), 141-147. Recuperado de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442003000300005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000300005&lng=es&tlng=es).
- Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L. M., & Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica*, (42), 197-214.

- Espinosa, L. A. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR, En: Eguiarte L., Souza, V., y Aguirre, X, (eds), Ecología molecular (pp.517-540). México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
- Fiedler, J., Bufler, G., & Bangerth, F. (1998). Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica*, 101(2), 249-255.
- Flores–Ayala, F. 2014. *Caracterización Morfológica de Colectas de Aguacate del sur del Estado de México*. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Edo. Méx. 85p.
- Fuertes, A. J. and Nieto, F. G. (2003). Additive polymorphism and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria Plumbaginaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (28), 430-447.
- Furnier, G. R., Cummings, M. P., & Clegg, M. T. (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *Journal of heredity*, 81(3), 183-188
- Franco, T. L. (2003). *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos-Boletín Técnico IPGRI No. 8* (No. 8). Bioversity International. Obtenido de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=B55X-G3WiuGC&oi=fnd&pg=PA2&dq=Franco+TL,+Hidalgo+R.+An%C3%A1lisis+Estad%C3%ADstico+de+Datos+de+Caracterizaci%C3%B3n+Morfol%C3%B3gica+de+Recursos+Fitogen%C3%A9ticos.+Bolet%C3%ADn+t%C3%A9cnico+no.+8.+Cali,+Colombia:+Instituto+Internacional+de+Recursos+Fitogen%C3%A9ticos+\(IPGRI\),+2003.+89.&ots=i45ywRMJSD&sig=CUlt1Hoh7v0g2QGoKXl4XJ\\_RWNk#v=onepage&q=Franco%20TL%20Hidalgo%20R.%20An%C3%A1lisis%20Estad%C3%ADstico%20de%20Datos%20de%20Caracterizaci%C3%B3n%20Morfol%C3%B3gica%20de%20Recursos%20Fitogen%C3%A9ticos.%20Bolet%C3%ADn%20t%C3%A9cnico%20no.%208.%20Cali%20Colombia%3A%20Instituto%20Internacional%20de%20Recursos%20Fitogen%C3%A9ticos%20\(IPGRI\)%202003.%2089.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=B55X-G3WiuGC&oi=fnd&pg=PA2&dq=Franco+TL,+Hidalgo+R.+An%C3%A1lisis+Estad%C3%ADstico+de+Datos+de+Caracterizaci%C3%B3n+Morfol%C3%B3gica+de+Recursos+Fitogen%C3%A9ticos.+Bolet%C3%ADn+t%C3%A9cnico+no.+8.+Cali,+Colombia:+Instituto+Internacional+de+Recursos+Fitogen%C3%A9ticos+(IPGRI),+2003.+89.&ots=i45ywRMJSD&sig=CUlt1Hoh7v0g2QGoKXl4XJ_RWNk#v=onepage&q=Franco%20TL%20Hidalgo%20R.%20An%C3%A1lisis%20Estad%C3%ADstico%20de%20Datos%20de%20Caracterizaci%C3%B3n%20Morfol%C3%B3gica%20de%20Recursos%20Fitogen%C3%A9ticos.%20Bolet%C3%ADn%20t%C3%A9cnico%20no.%208.%20Cali%20Colombia%3A%20Instituto%20Internacional%20de%20Recursos%20Fitogen%C3%A9ticos%20(IPGRI)%202003.%2089.&f=false)
- Galindo-Tovar, M. E., Arzate-Fernández, A. M., Ogata-Aguilar, N., & Landero-Torres, I. (2007). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 12(2), 325-335.
- Galindo-Tovar, M. E., Milagro-Pérez, P. A., Alejandre-Rosas J. A., Leyva-Ovalle, O. R., Landero-Torres, I., Lee-Espinosa, H., & Murguía-González J. (2011). Relaciones

genéticas del aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios de centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13, 339–346.

Gama-Campillo, L., & Gomez-Pompa, A. (1992). An ethnoecological approach for the study of *Persea*: A case study in the Maya area. *Proc. of Sec. World Avoc. Congr.*, 11-17.

García, A. 1975. Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae). I. Karyology of seven species. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 173-180

García-Pérez, H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnostico*; 1(2):31-4 Recuperado de <https://vdocuments.mx/electroforesis-en-geles-de-poliacrilamida-fundamentos-actualidad-e-.html>

Gardes, M. y Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. (2), 113-118.

Galindo-Tovar, M. E., Arzate-Fernández, A. M., Ogata-Aguilar, N., & Landero-Torres, I. (2007). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard papers in botany*, 12(2), 325-334.

Gomes-Bezerra, K M., Soares-Silva, L.H. & Gomes, S.M. (2011). Arquitectura foliar de las *Lauraceae* del Distrito Federal, Brasil, y nuevos patrones de venación propuestos. *Gayana Bot*, 68 (1), 1-15.

González-Andrés, F. (2001a). La caracterización vegetal: Objetivos y enfoques. Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. *Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid*, España, 189-198.

Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) MAGNOLIIDAE-Lauraceae. Recuperado de <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/6.%20Lauraceae.pdf>

Gutiérrez-Díez, A., Martínez-de la Cerda, J., García-Zambrano, E. A., Iracheta-Donjuan, L., Ocampo-Morales, J. D., & Cerda-Hurtado, I. M. (2009). Estudio de diversidad



genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 32 (1), 09-18.

Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., Espíndola-Barquera, M. D. C., & Heredia García, E. (2017). Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. *Frontiers in plant science*, 8, 243.

Hair JF, Black B, Babin B, Anderson RE, Tatham RL. Multivariate data analysis. Nueva York: MacMillan 1992; 544.

Hernández Villarreal, A. E. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *CONACYT* 2(3): 113-118. *ISSN 2007-3380*.

Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especie vegetales. Pp. 2-26. In: Franco, T. L., Hidalgo, R. (eds). Análisis estadísticos de datos de caracterización morfológica de recursos filogenético. Boletín técnico No. 8 IPGRI. Cali, Colombia. 89 p.

HIPERTEXTOS DEL ÁREA DE LA BIOLOGÍA. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad. Ciencias Agrarias, Corrientes, República Argentina, ©1998-2015. En <http://www.biologia.edu.ar>

INEGI (2010). Marco Geo estadístico Municipal 2010, Estado de México. Recuperado de [http://cuentame.inegi.org.mx/mapas/pdf/entidades/div\\_municipal/mexico.pdf](http://cuentame.inegi.org.mx/mapas/pdf/entidades/div_municipal/mexico.pdf)

International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 1995. Descriptor for avocado (*Persea* spp.). International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 52 p.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles Recherches sur la Distribution Florale (*Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* vol 44).

Jardón-Barbolla, L.O., V. Alavez-Gómez, V. Méndez, M.J.X. Damián-Domínguez, A. Gaona, A.L. Wegier y D. Piñero. 2011. Análisis para la determinación de los centros de origen, domesticación y diversidad genética del género *Persea* y la especie *Persea americana* (aguacate), segundo informe. Instituto de Ecología, UNAM, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Dentro del Proyecto “Generación y recopilación de información de las especies de las que México es centro de origen y diversidad genética”, financiado por la Dirección General

del Sector Primario y Recursos Naturales Renovables (DGSPRNR), perteneciente a la SEMARNAT y coordinado por la CONABIO. CONABIO. México D.F.

Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea-Lauraceae*) *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14(1): 1-120.

López, Q.J.A., Garces de Granada, E., y Diaz, J.E.Á. (2004). Determinación de la variabilidad genética entre aislamientos de *Rosellinia* sp. *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*, mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos de DNA (RAPD) y análisis de los espaciadores de transcritos internos (ITS). *Acta biológica Colombiana*, 9(2), 99-100.

López-Guzmán, G., Medina-Torres, R., Guillén-Andrade, H., Ramírez-Guerrero, L. G., Juárez-López, P., & Ruelas-Hernández, P. G. (2015). Caracterización morfológica en genotipos nativos de aguacate (*Persea americana* Mill.) de clima tropical en Nayarit, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(SPE11), 2157-2163.

López-López, L., Rubí-Arriaga, M., Ben-Ya'acov, A. D., & Barrientos-Priego, A. F. (1997). La biodiversidad del género *Persea* y especies afines preservados en los bancos de germoplasma del Estado de México. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*, 3, 51-54.

Hernández, F. G. L. (2002). La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (71), 59-70.

Marín-Gallegos, I.N. 2011. *Identificación a nivel molecular de aislamientos de Botrytis cinérea Pers.* Tesis de Licenciatura de Agronomía en Floricultura, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Tenancingo.

Medina, N. N. R., Lorenzo, J. L. F., Arbelo, O. C., Fiallo, V. R. F., Pérez, I. M. R., Becker, D. & Palenzuela, B. V. (2009). Agro-morphologic traits, isoenzyme and DNA markers for estimating the polymorphism levels, discriminating capacity and informativeness in avocado. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 40(1), 63-74.

Meza-Castillo, E., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, J. E., Reyes-Alemán, J. C., Borys, M. W., & Espíndola-Barquera, M. D. L. C. (2018). Caracterización morfológica

e histológica de ápices de raíz de portainjertos de aguacate y su resistencia a factores adversos en el suelo. *Bioagro*, 30(2), 107-116.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.

Muriel, P. (2017). *Lauraceae*. En: León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa Ulloa y H. Navarrete (Eds). Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. <<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500247>>.

Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2014). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 1(1), 1-6.

Page. R. D. M. (2001). *TreeView*. Recuperado de <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod%00Apala>

Pavlíček, A., Hrdá, S., & Flegr., J. (1999). Short Communication FreeTree-freeware program for construction of Phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frekieli*. *Folia Biologica*, 45: 97-99.

Pasini, E., Funk, V. A., de Souza-Chies, T. T., & Miotto, S. T. (2016). New insights into the phylogeny and biogeography of the *Gerbera*-Complex (Asteraceae: Mutisieae). *Taxon*, 65(3), 547-562.

Pereira, H. F. (2012). Aportes al conocimiento taxonómico del género *Persea* (Lauraceae) en Venezuela. *Obtenido de Scielo: <http://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v39n3/a07v39n3>*.

Pérez Álvarez, S., Ávila Quezada, G., & Coto Arbelo, O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36(2), 111-123.

- Phillips, W., Fritz, P. & Rodríguez, H. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones de cacao, *Theobroma cacao* (No. 633.74523/P564).
- Piña-Escutia, J. L., Vences-Contreras, C., Gutiérrez-Martínez, M. G., Vázquez-García, L. M., & Arzate-Fernández, A. M. (2010). Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (Lf) DC. *Agrociencia*, 44(2), 147-158.
- Popenoe, W. (1935). Origin of the cultivated races of avocados. *California Avocado Association Yearbook*, 20, 184-94.
- Prakash, D. P., Narayanaswamy, P. & Sondur, S. N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77(3), 287-293.
- Prevost A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 98(1), 107-112.
- Ramírez-Mendoza, M.C. (2015). *Caracterización molecular de colectas de aguacate del Estado de México*. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Edo. Méx. 77p.
- Rentaría A. M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte L., Souza, V., y Aguirre, X, (eds), *Ecología molecular* (1ª ed., pp. 541–566). México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT Recuperado de <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap18.pdf>
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., y Barrientos-Priego, A. F. (2016). Assessment of genetic relationship in *Persea* spp. by traditional molecular markers. *Genetics and Molecular Research*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027359>.
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., & Barrientos-Priego, A. F. (2016). Assessment of genetic relationship in *Persea* spp by traditional molecular markers. *Gene Conserve*, 15(59).

- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., Simuta-Velázco, L., Barrientos-Priego, A. F. & Gallegos-Vázquez, C. (2013). Distinción de especies del género *Persea* mediante RAPD e ISSR de ADN. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(4), 503-516.
- Rincón-Hernández, C. A., Sánchez Pérez, J. La Luz., & Espinosa-García, F. J. (2011). Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Rev. Mex. Biodiv.* 82(2), Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S187034532011000200004&script=sci\\_artt\\_ext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S187034532011000200004&script=sci_artt_ext&tlng=en)
- Rodríguez-Medina, N., Fuentes-Lorenzo, J. L., Coto-Arbelo, O., Fuentes-Fiallo, V. R., Ramírez-Pérez, I. M., Becker, D., & Velázquez-Palenzuela, B. (2009). Agromorphologic traits, isoenzyme and DNA markers for estimating the polymorphism levels, discriminating capacity and informativeness in avocado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40(1), 63-74.
- Rohwer, J. G. (1993). Lauraceae. In *Flowering Plants: Dicotyledons* (pp. 366-391). Springer, Berlín, Heidelberg.
- Rohwer, J. G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S. A., van der Werff, H., & Li, H. W. (2009). Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *Taxon*, 58(4), 1153-1167.
- Roldán-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., Van Eijk, M. J. T., & De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding*, 6(6), 593-602.
- Saghai-Maroo, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (81), 8014- 8018. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

- Schieber E. (1981). Exploring for the "Aguacate de Mico" in Central America. *California Avocado Society, Year book*, 65, 49-55.
- Schieber, E. & Zentmyer G.A. (1972). Exploring for Persea in Latin America. Proc. of 1st international tropical fruit Short Course. *The Avocado. University of Florida, Gainesville, Florida. USA.* pp. 16-20
- Schroeder, C. A., (1951). Avocado material for horticultural research. *California Avocado Society Year book*, 35, 107-112.
- Scora, R. W., and Bergh, B.O. (1990). The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill.). Lauraceae. *Acta Horticulturae* (275), 387-394.
- Serrano-Hernández, M. (2017). *Caracterización morfológica y molecular de un híbrido natural de aguacate y su comparación con especies del género Persea*. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Edo. Méx.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). *Boletín mensual de la producción del aguacate*. (Agosto 2019). Recuperado de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/456358/Bolet\\_n\\_mensual\\_de\\_la\\_producci\\_n\\_de\\_aguacate\\_marzo\\_2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/456358/Bolet_n_mensual_de_la_producci_n_de_aguacate_marzo_2019.pdf)
- Smith, C. E. Jr. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Econ. Bot.* 20: 169-175.
- Smith, C. E. Jr. (1969). Additional notes on preconquest avocados in Mexico. *Econ. Bot.* 23: 135-140.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- Soltis D.E., and Soltis P.S. (1998) Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis. *Molecular Systematics of Plants II*. Springer, Boston, MA. 1-42. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6_1)
- Somma, M & Querci M. 2007b. Electroforesis en gel de agarosa. *In*: Querci M., Jermini M. y Guy Van den Eede (Eds.) Curso de formación sobre análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Comunidades

Europeas. Luxemburgo. Recuperado de: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>

Storey, W. B., Bergh, B., and Zentmyer, G. A. (1986). The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, (70), 127-143.

Storey, W.B., Bergh, B.O., Platt, R.G. and Miller, M. (1987). Observations in a second generation progeny of a Mexican x West Indian cross, *California Avocado Society Yearbook*, (68)161-165.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.

Teliz-Ortíz, D.; Mora-Aguilera, G. y Morales-García, L. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. En: El aguacate y su manejo integrado. Téliz-Ortíz, D. (coord.). Mundi Prensa. México, 2000.

Tiselius, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* Recuperado de: <http://pubs.rsc.org//content/articlelanding/1937/ft/ft9373300524/unauth#!divAbstract>

Torres, L. M. E., y V. S. Moreno 2001. *Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN*. pp: 235-252 In: González, A. F., y V. J. M. Pita (eds). *Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos*. Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. 279 p.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 16 Sep 2019 Consultado de <http://www.tropicos.org/Name/40005008> © 2020 Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110

- UPOV. 2006. DRAFT. Avocado (*Persea americana* Mill). *Guidelines for the conduct of test distinctness, uniformity and stability*. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34p.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. D.F., México 147 p.
- Valadez-Moctezuma, E., Kahl-Günter, R. J., Hüttel, B. & Rubluo-Islas, A. (2001). Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(1) ,103-120. [Fecha de Consulta 20 de Enero de 2019]. ISSN: 0187-7380. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=610/61024113>
- van der Werff, H. (2002). A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon*, 575-586.
- Velasco, M. R. (2005). Marcadores Moleculares y la Extracción del ADN. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, (3), 14-18. Recuperado de <file:///C:/Users/user/Downloads/Dialnet-MarcadoresMolecularesYLaExtraccionDeADN-6117966.pdf>
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC press.
- Whiley, A. W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. (2007). El Aguacate: Botánica, Producción y Usos. *Puelma, P. CABI, Ediciones Universitarias de Valparaíso. Valparaíso, Chile.*
- White. T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 18(1), 315-322.
- Williams, L.O. (1977a). The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea* Econ. Bot. 31: 315-320. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02866883>



Zentmyer, G.A. and Schieber, E. (1990). *PERSEA TOLIMANENSIS*: A NEW SPECIES FOR  
CENTRAL AMERICA. Acta Hortic. 275, 383-386  
DOI: 10.17660/ActaHortic.1990.275.46  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.275.46>

## 14. Anexos

### 14.1 Recepción de manuscrito enviado para su revisión en la Revista Chapingo Serie Horticultura

#### Revista Chapingo Serie Horticultura CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE AGUACATE “CASCARUDO” DEL SUR DEL ESTADO DE MÉXICO

Manuscript Number:	
Full Title:	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE AGUACATE “CASCARUDO” DEL SUR DEL ESTADO DE MÉXICO
Article Type:	Artículo Científico / Scientific Article
Section/Category:	Frutales
Keywords:	Caracterización morfológica, Marcadores moleculares, Diversidad genética, Persea americana Mill, Aguacate antiguo, Domesticación
Corresponding Author:	Juan Carlos Reyes-Alemán, Dr. Universidad Autónoma del Estado de México
Corresponding Author Secondary	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma del Estado de México
Corresponding Author's Secondary	
First Author:	Juan Carlos Jaime-Dávila, Ingeniero agrónomo
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Juan Carlos Jaime-Dávila, Ingeniero agrónomo Juan Carlos Reyes-Alemán, Dr. Jaime Mejía-Carranza, Dr Luis Miguel Vázquez-García, Dr Justino Gerardo González Díaz, Dr
Order of Authors Secondary Information:	

Abstract:

The *Persea* genus has *Persea* and *Eriodaphne* as subgenera, the *Persea* subgenus is the one with the greatest genetic variability and complexity in evolutionary terms of the Lauraceae Family. In the south of the State of Mexico a type of avocado called "cascarudo" was found with morphological characteristics different from known species of the *Persea* subgenus, but similarly in the pubescence of leaf and thick peel of fruit to *Persea floccosa* and *P. tolimanensis*, their habitat with *P. americana* variety *drymifolia*. The objective of the study was to distinguish morphologically and molecularly individuals from two regions and establish phylogenetic relationships with these species. The morphological analysis consisted of 64 characters identified in IPGRI and UPOV guidelines and through discriminant and cluster analysis, it was found that pubescence density, undulation and shape of leaf grouped individuals, while pubescence density and width of sepal, smell of anise and shell thickness separated them. The molecular study consisted of eight RAPD primers and six ISSRs that amplified leaf DNA by PCR with 99% of polymorphisms that generated 1417 bands from 250 to 900 bp for RAPD and 917 bands from 200 to 1000 bp for ISSR with a polymorphic information content (PIC) of 0.45 and 0.49 and a resolution power (RP) of 8.8 and 5.81 respectively. The phylograms, allowed to infer that this type of avocado could represent a natural hybrid between old regional genotypes with *P. floccosa*, *P. tolimanensis*, *P. americana* var. *guatemalensis* and var. *drymifolia*.

## Correo de Recepción con fecha 8/ ENERO /2020

Dr. Juan Carlos Reyes Alemán

De: [em.rchsh.0.687d31.a2f11c5d@editorialmanager.com](mailto:em.rchsh.0.687d31.a2f11c5d@editorialmanager.com) <[em.rchsh.0.687d31.a2f11c5d@editorialmanager.com](mailto:em.rchsh.0.687d31.a2f11c5d@editorialmanager.com)> en nombre de RCHSH <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

Enviado: miércoles, 8 de enero de 2020 06:22 p. m.

Para: Juan Carlos Reyes Aleman

Asunto: Your PDF CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE AGUACATE "CASCARUDO" DEL SUR DEL ESTADO DE MÉXICO has been built and requires approval

Dear Dr. Reyes-Alemán,

The PDF for your submission, "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE AGUACATE "CASCARUDO" DEL SUR DEL ESTADO DE MÉXICO" has now been built and is ready for your approval. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

To approve the PDF please login to <https://www.editorialmanager.com/rchsh/> as an Author:

Username: [jrcyasaleman@hotmail.com](mailto:jrcyasaleman@hotmail.com)

Password: <https://www.editorialmanager.com/rchsh/login.asp?i=255238&h=RVT4HSZj>

Then click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve the PDF of your submission. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

Please note that you are required to ensure everything appears appropriately in PDF and no change can be made after approving a submission

Editorial Office Staff

Revista Chapingo Serie Horticultura

<https://www.editorialmanager.com/rchsh/>

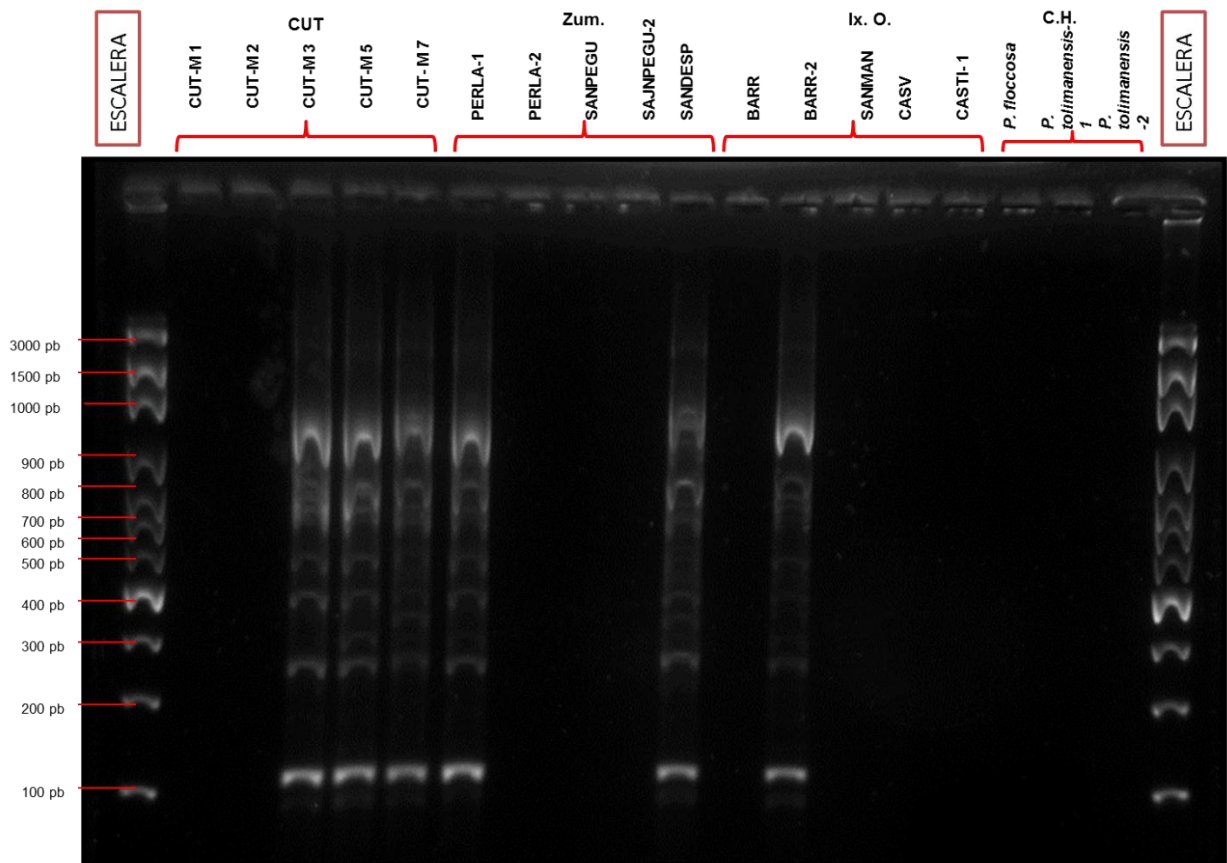
In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/rchsh/login.asp?i=255238&h=RVT4HSZj>). Please contact the publication office if you have any questions.

...

[Mensaje recortado] [Ver todo el mensaje](#)

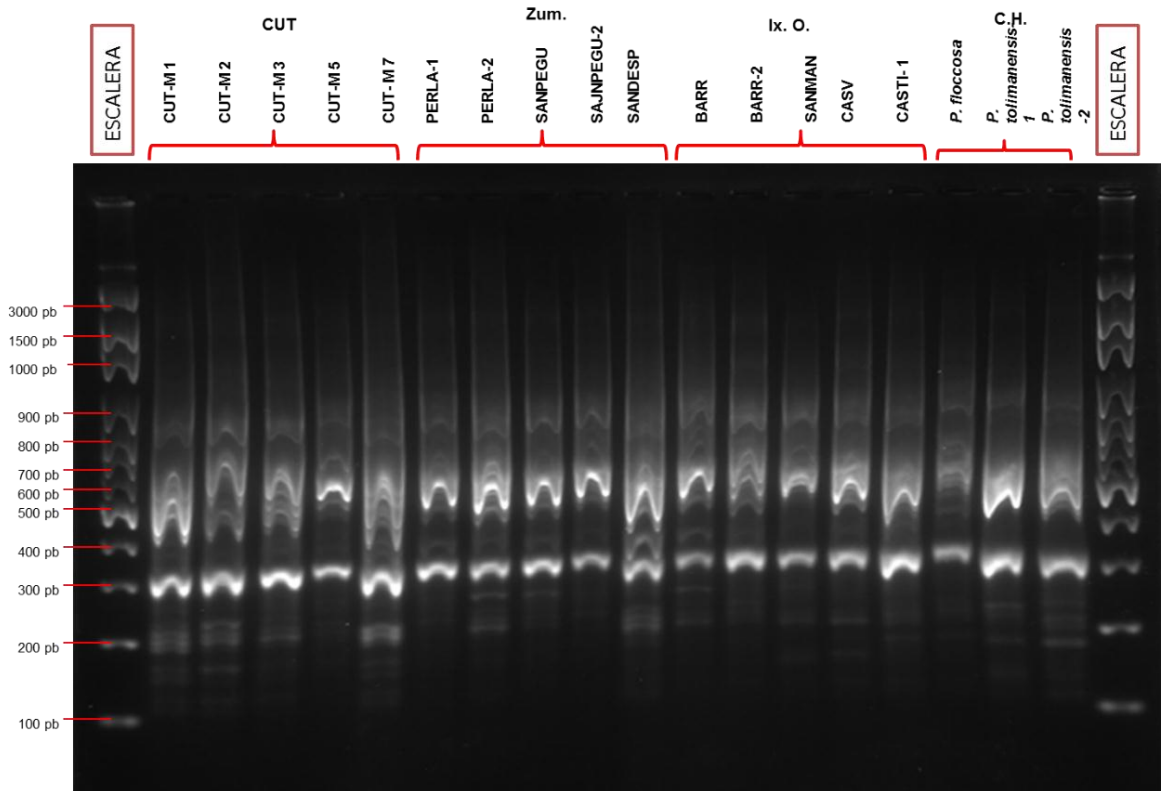


**Anexo 14.2** Gel de electroforesis del marcador A-15 en 18 muestras de ADN de aguacate.



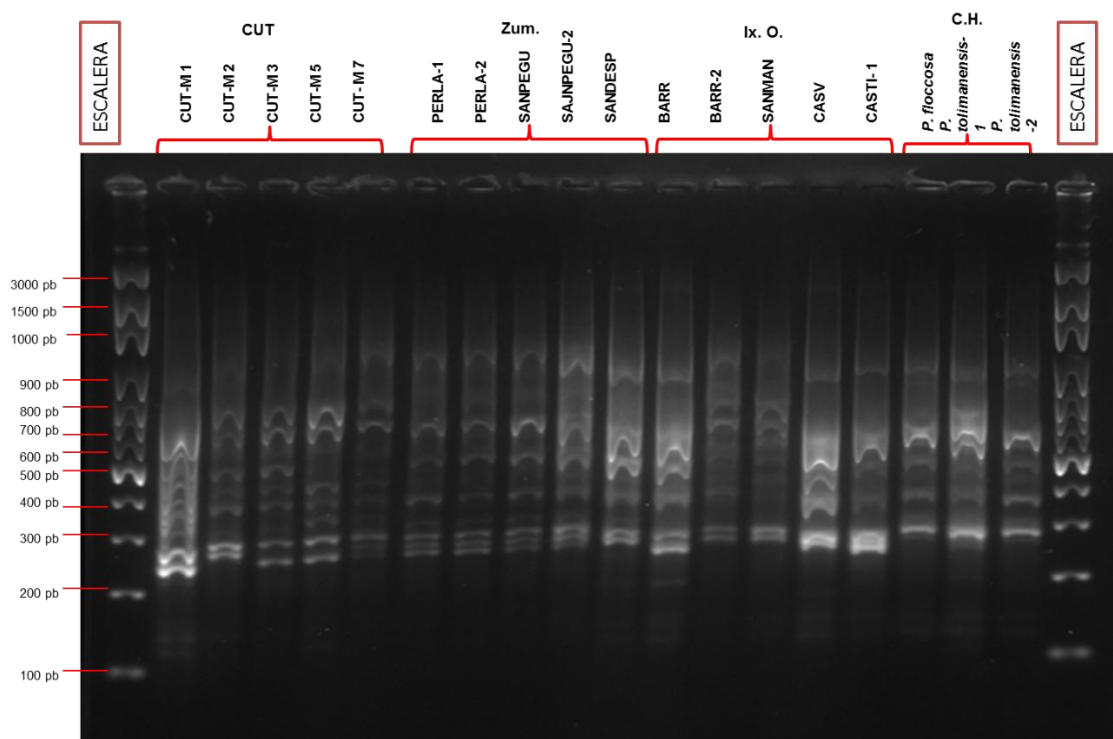
**CUT:** Centro Universitario Tenancingo **Zum:** Zumpahuacán, **C.H:** Coatepec Harinas, **Ix. O:** Ixtapan del Oro, Estado de México. Gel solidificado al 1.5 % de agarosa, corrido a 80 V por 4 horas.

**Anexo 14.3** Gel de electroforesis del marcador C-08 en 18 muestras de ADN de aguacate.



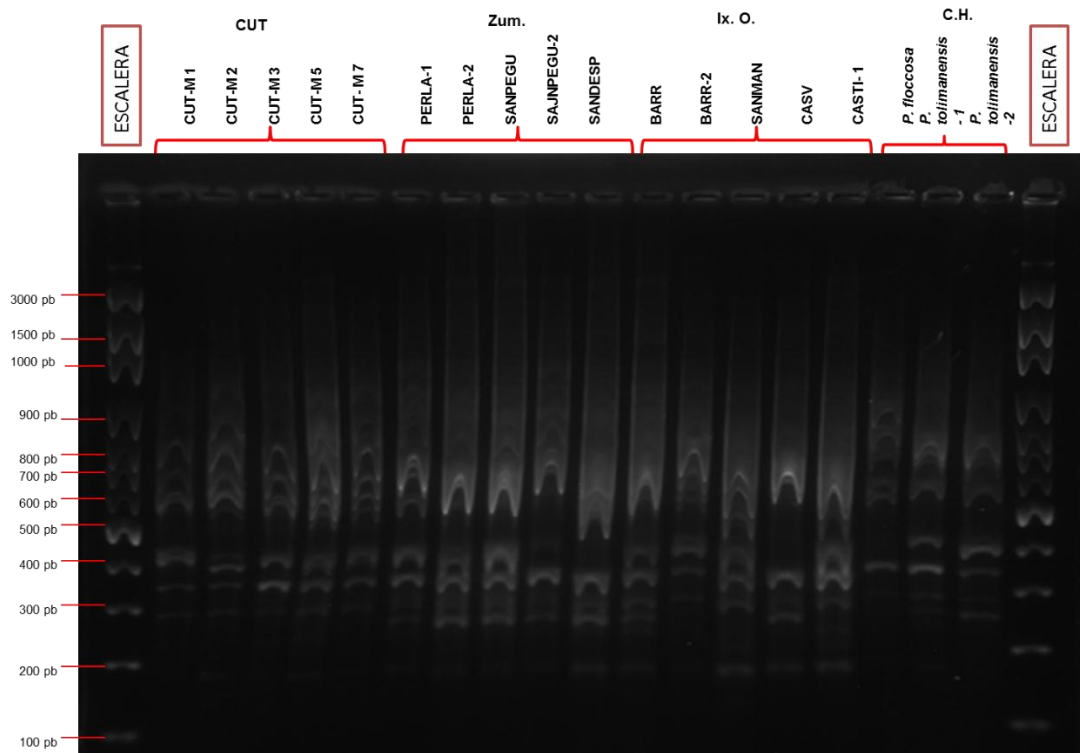
Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 4 horas

**Anexo 14.4** Gel de electroforesis del marcador C-10 en 18 muestras de ADN de aguacate.



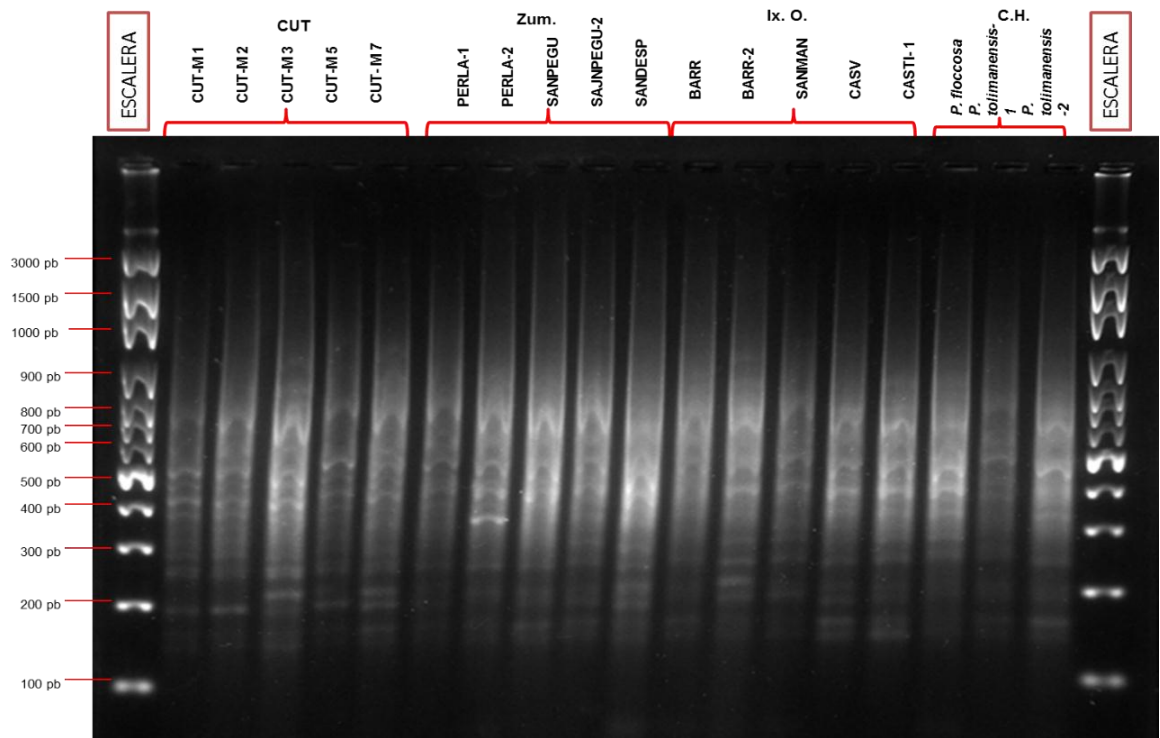
Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 4 horas

**Anexo 14.5** Gel de electroforesis del marcador C-13 en 18 muestras de ADN de aguacate.



Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 70 V por 4 horas

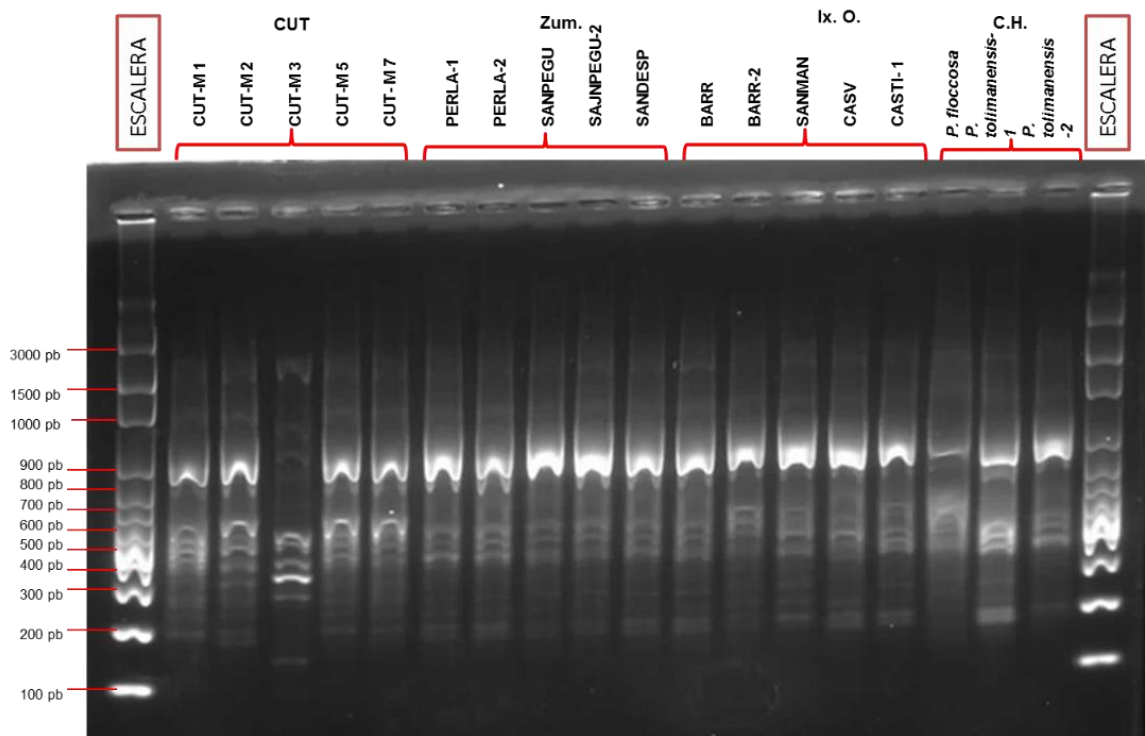
**Anexo 14.6** Gel de electroforesis del marcador E-07 en 18 muestras de ADN de aguacate.



Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 70 V por 4 horas

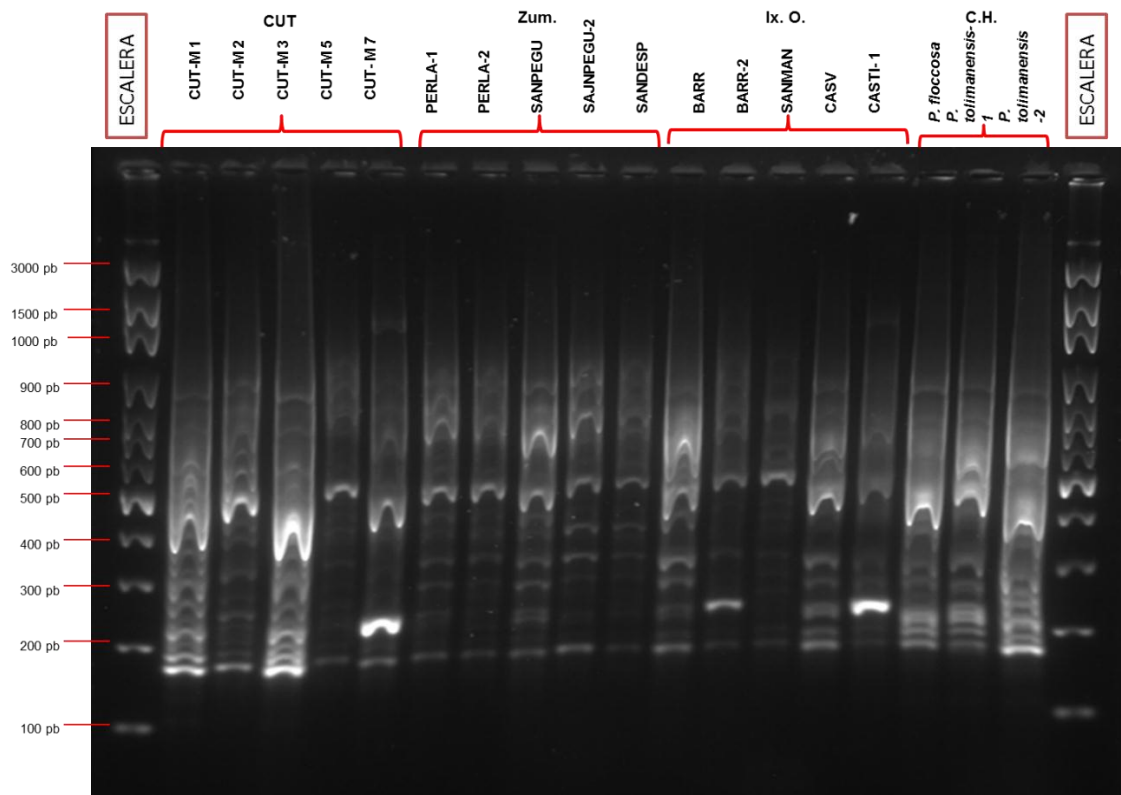


**Anexo 14.7** Gel de electroforesis del marcador E-14 en 18 muestras de ADN de aguacate.



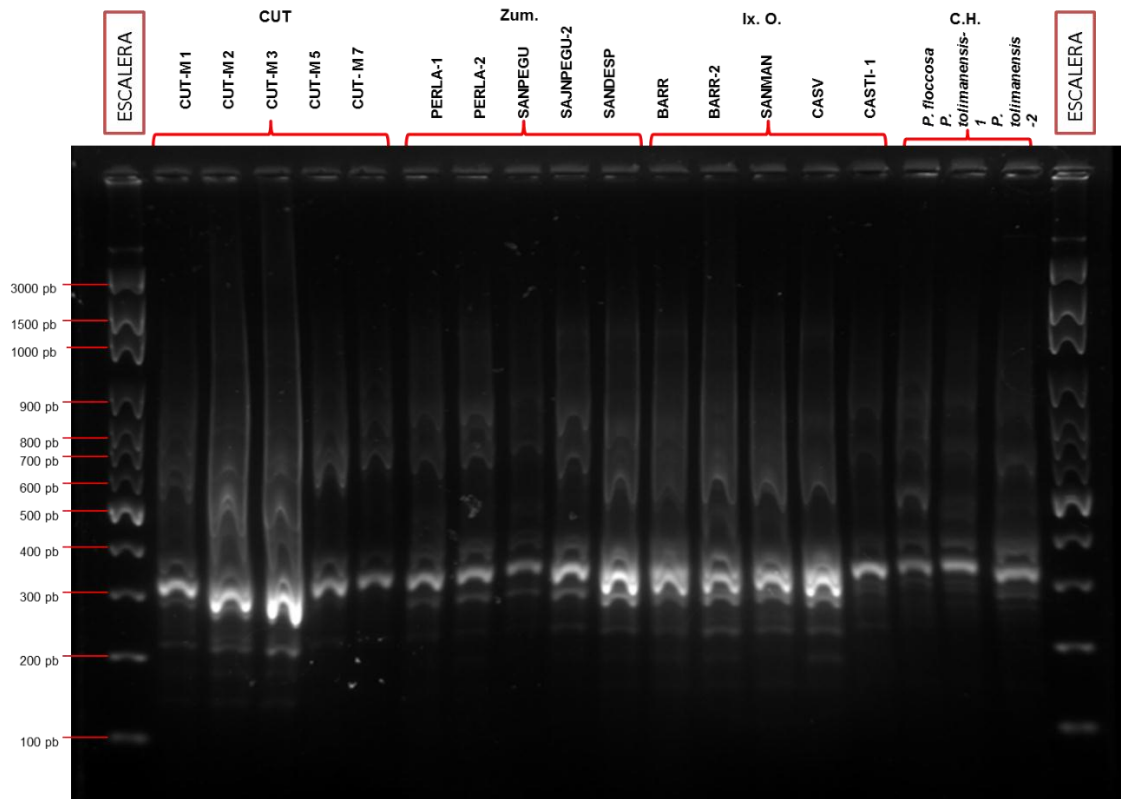
Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3 horas

**Anexo 14.8** Gel de electroforesis del marcador E-16 en 18 muestras de ADN de aguacate.



Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3 horas

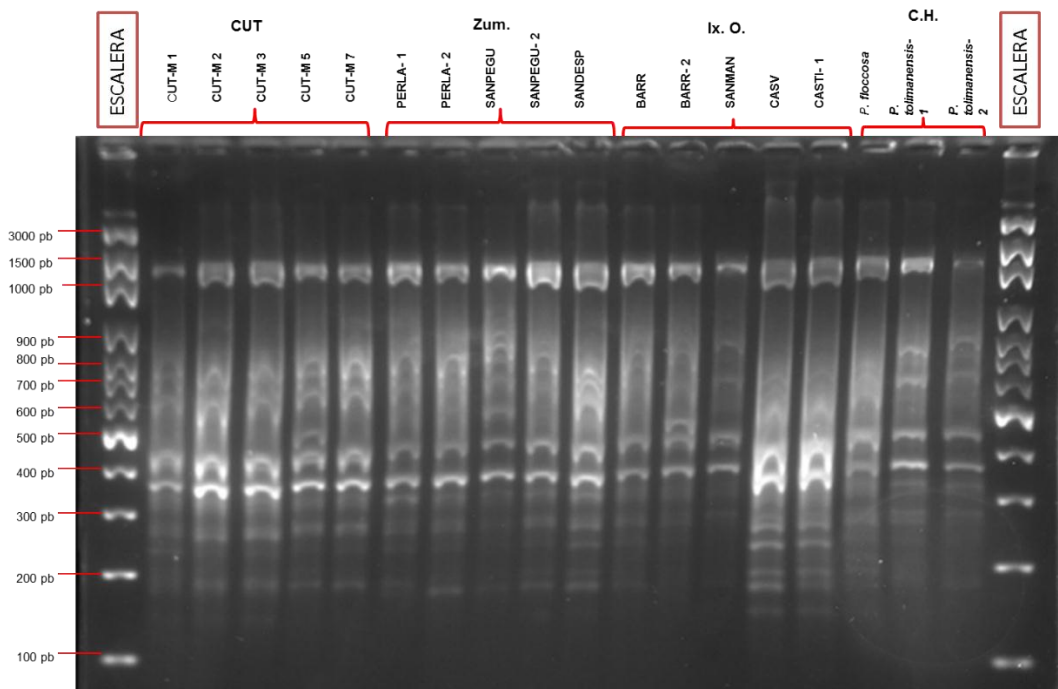
**Anexo 14.9** Gel de electroforesis del marcador E-18 en 18 muestras de ADN de aguacate.



Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 4 horas

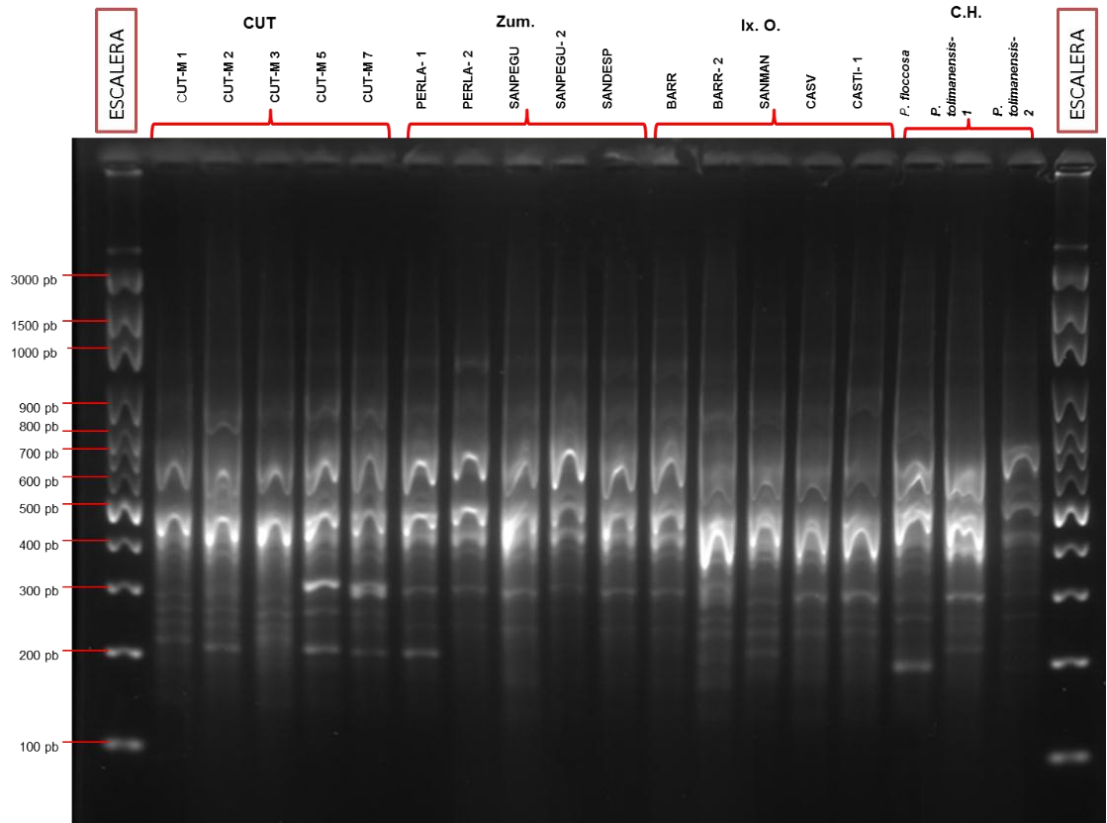
## Geles de electroforesis obtenidos con marcadores moleculares ISSR en 18 muestras de ADN de aguacate.

Anexo 14.10 Gel de electroforesis del marcador  $(TCC)_5$  RY en 18 muestras de ADN aguacate.



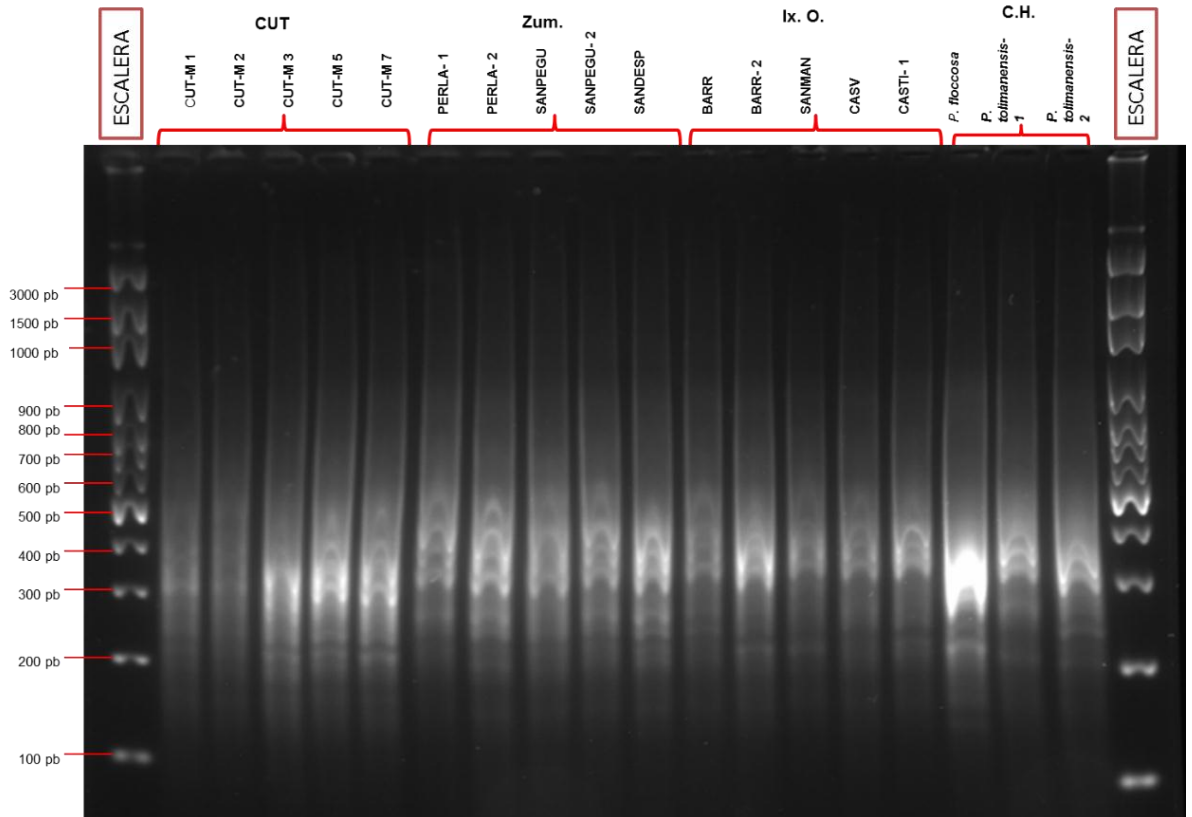
**CUT:** Centro Universitario Tenancingo **Zum:** Zumpahuacán, **C.H:** Coatepec Harinas, **Ix. O:** Ixtapan del Oro, Estado de México. Gel solidificado al 1.6% de agarosa, corrido a 80 V por 3:30 horas.

**Anexo 14.11** Gel de electroforesis del marcador (GACA)<sub>4</sub> en 18 muestras de ADN de aguacate.



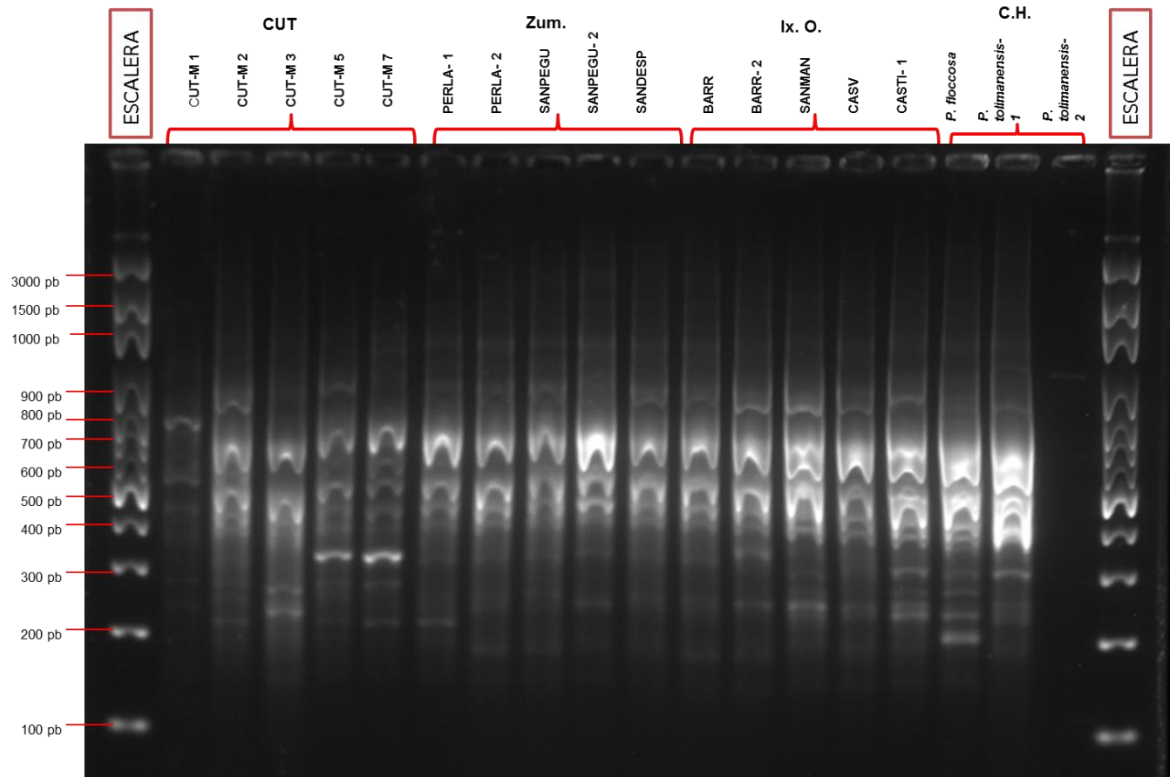
Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3:30 horas.

**Anexo 14.12** Gel de electroforesis del marcador DBADA (CA)<sub>7</sub> en 18 muestras de ADN de aguacate.



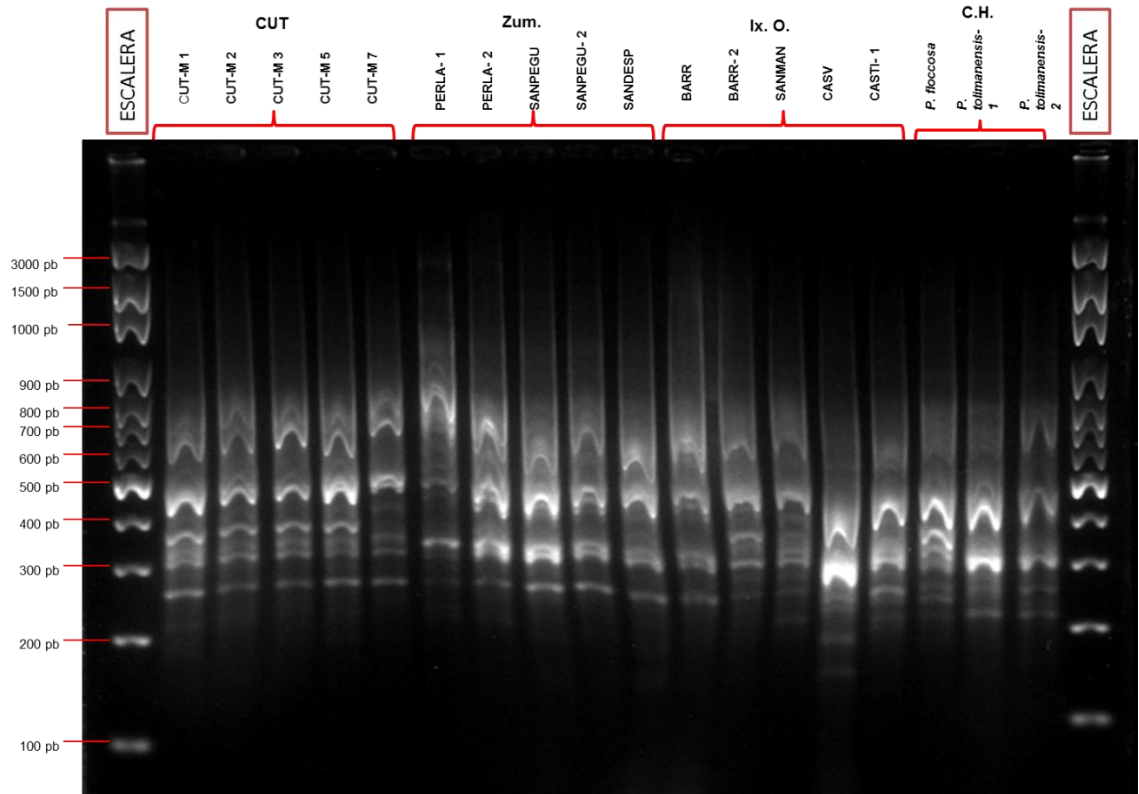
Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3:30 horas

**Anexo 14.13** Gel de electroforesis del marcador AC (GACA)<sub>4</sub> en 18 muestras de ADN de aguacate.



Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3:30 horas

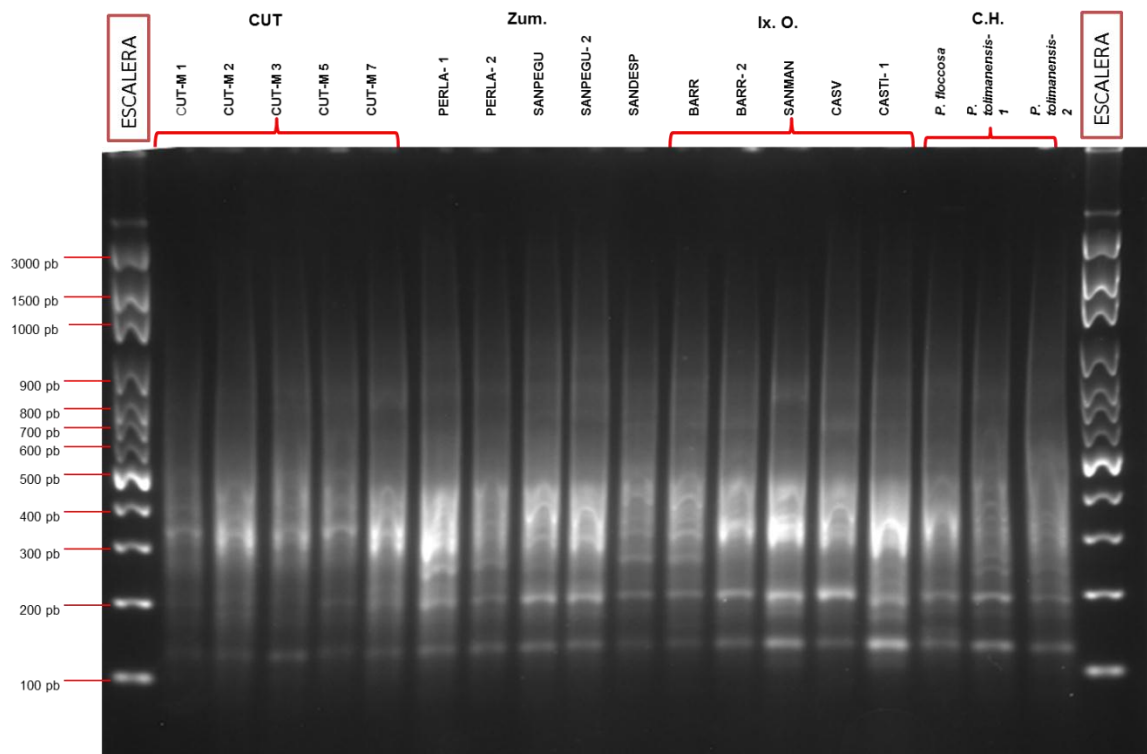
**Anexo 14.14** Gel de electroforesis del marcador (AC)<sub>8</sub>YG en 18 muestras de ADN de aguacate.



Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3:30 horas



**Anexo 14.15** Gel de electroforesis del marcador (GA)<sub>8</sub>YC en 18 muestras de ADN de aguacate.






Gel solidificado al 1.6 % de agarosa, corrido a 80 V por 3:30 horas

# ANEXO 14.16 PARTICIPACIÓN EN AVOCADO BRAINSTORMIG 2018

## MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NEW TYPE OF AVOCADO IN THE SOUTH OF MEXICO STATE




**Jaime Dávila Juan Carlos<sup>1</sup>, Reyes Alemán Juan Carlos<sup>1</sup>, Mejía Carranza Jaime<sup>1</sup>, Vázquez García Luis Miguel<sup>1</sup>, González Díaz Justino Gerardo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo. Ex Hacienda de Santa Ana, Carr. Tenancingo-Villa Guerrero, Km 1.5, CP. 52400. (jcjaime09@gmail.com, reyesaleman@hotmail.com)

### INTRODUCTION

The avocado stripe of the south of the State of Mexico is part of the center of origin of certain species of the *Persea* genus, there are distributed morphotypes which belong to the subgenus *Persea* and *Eriodaphne*, probably used since pre-hispanic times by settlers who domesticated their fruit (Galindo-Tovar, 2007). Particularly in the region, a type of ancient avocado probably related to the Mexican race is identified, which has been called natural hybrid (cascarudos) (thick skin), is located in ravines and areas with little access that are remnants of geography without crop, plus they are distinguished by their thin and dark mature stems, with corky lenticles, large leaves of oval shape to circular and dense pubescence on the underside and without anise odor, their fruit of variable shape and size, ridge when drying, this type of avocado is immersed among populations of *Persea americana* var. *drymifolia* with which it cohabits. At the same time, it has been disappearing due to adverse environmental factors and the action of man. Work has begun on the description and evaluation of its genetic variability using morphological and molecular tools; it is necessary to study their alternatives for use and conservation.

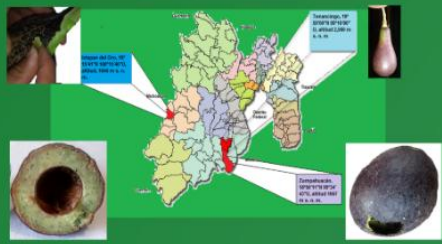
*Figure 2. Cascarudo hybrid: A) pubescent underside, B) broad and glabrous, C) tender pubescent bud*

### Statistic analysis

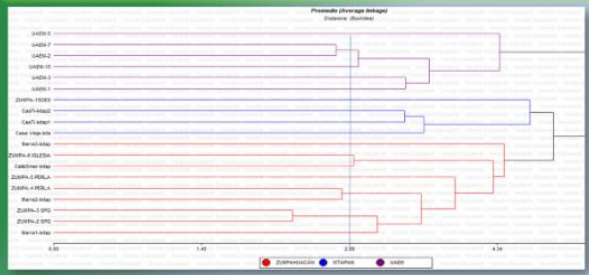
Using multivariate and inferential statistics, different analyzes were performed to infer similarities and dissimilarities between collections based on the morphological characters described. The InfoStat program (Di Rienzo et al., 2016) was used.

### Results and Discussion

In the dendrogram generated in a cluster analysis (Figure 3), and applying the Average Linkage technique with Euclidean distance (2.89), three different groupings were obtained, in these it is observed that the UAEM population groups all the individuals of *Persea americana* var. *drymifolia*, while the populations of Zumpahuacán and Ixtapan del Oro of the cascarudo hybrids combine and show similarity between them, but dissimilarity with respect to the Mexican Race it is shown. In the discriminant analysis, the above is confirmed, where the population of Zumpahuacán and Ixtapan del Oro which share characteristics such as leaf shape, leaf width and pubescence density, unlike the UAEM population, which is far from these two groups and distinguishes itself by the characters of smell to anise, twist and length/width ratio of the leaf. However, the three populations share characters such as apex shape and petiole length (Figure 4).



*Figure 1. Characteristics of hulled fruit and its distribution in the State of Mexico.*



*Figure 3. Dendrogram by cluster analysis, standardized data for 13 morphological descriptors in 19 avocado collections.*

### OBJECTIVE

Characterize morphologically avocados from the South of the State of Mexico and find similarities with genotypes of *Persea americana* var. *drymifolia* (Mexican Race).

### MATERIALS and METHODS

Collecting hybrid cascarudos was carried out in three sites in the South of the State of Mexico: seven genotypes of Ixtapan del Oro, six of Zumpahuacán, and six genotypes of the Mexican race from the University Center UAEM Tenancingo (Table 1). The individuals were described by means of quantitative and qualitative leaf morphological characters based on the UPOV (2006) and IPGRI (1996) guidelines (Table 2).

Number	Genotypes	Site	Location: Latitude / Longitude / Altitude meters above sea level (meters)	Subgenus / Species / Race / Location
1	OUT-01	UAEM 1	19°58' 52.71" N 97°36' 45.88" W 2054 msnm	Persea/ Persea americana/ var. Drymifolia (Mexican Race) Tenancingo, México
2	OUT-02	UAEM 2	19°58' 5.07" N 97°36' 45.17" W 2054	
3	OUT-03	UAEM 3	19°58' 5.59" N 97°36' 45.17" W 2053	
4	OUT-04	UAEM 4	19°58' 3.31" N 97°36' 45.17" W 2053	
5	OUT-05	UAEM 5	19°58' 5.81" N 97°36' 45.17" W 2054	
6	OUT-06	UAEM 6	19°58' 5.17" N 97°36' 45.17" W 2054	
7	IZT-001-1	CAS-06	19°49' 20.17" N 97°32' 31.87" W 1912	Persea/ Persea americana/ Persea subulana Ixtapan del Oro, México
8	IZT-001-2	CAS-01-1	19°49' 24.91" N 97°32' 31.87" W 1912	
9	IZT-001-3	CAS-01-2	19°49' 25.31" N 97°32' 31.87" W 1912	
10	IZT-001-4	BAH-0-1	19°49' 23.06" N 97°32' 31.87" W 1912	Persea/ Persea americana/ Persea subulana Zumpahuacán, México
11	IZT-001-5	BAH-0-2	19°49' 13.19" N 97°32' 31.87" W 1912	
12	IZT-001-6	BAH-0-3	19°49' 14.76" N 97°32' 31.87" W 1912	
13	IZT-001-7	BAH-0-6	19°49' 23.27" N 97°32' 31.87" W 1912	
14	ZUM-001-01	003-01	19°49' 11.76" N 97°32' 31.87" W 1912	Persea/ Persea americana/ Persea subulana Zumpahuacán, México
15	ZUM-001-02	003-02	19°49' 14.77" N 97°32' 31.87" W 1912	
16	ZUM-001-03	003-03	19°49' 11.17" N 97°32' 31.87" W 1912	
17	ZUM-001-04	PERL-0-4	19°49' 12.17" N 97°32' 31.87" W 1912	
18	ZUM-001-05	PERL-0-5	19°49' 12.44" N 97°32' 31.87" W 1912	
19	ZUM-001-06	003-0-6	19°49' 24.32" N 97°32' 31.87" W 1912	

Quantitative	Qualitative
1. Leaf length (cm) (Long. Hoja)	5. Leaf shape (Forma Hoja)
2. Leaf width (cm) (Ancho Hoja)	6. Apex shape (Forma Apice)
3. Ratio Length/Width leaf (cm) (Long/Ancho)	7. Leaf twisting (Torção Hoja)
4. Length Petiole (cm) (Long.Petiole)	8. Apex twisting (Torção Apice)
	9. Cavitation of margin (Oruga Hoja)
	10. Conspicuousness of venation of upper surface (Red/VenaSuper)
	11. Number of secondary veins (R.NeuraSeco)
	12. Pubescence on the lower surface (Dens/Pubesencia)
	13. Odor of anise (OlorAnise)

### CONCLUSIONS

The groupings generated show a close relationship between the representatives of Ixtapan del Oro and those of Zumpahuacán for sharing similarities in pubescence, form, leaf width, etc. It is suggested a probable hybridization of cascarudos with the Mexican Race (apex shape and petiole length), however it is necessary to complete the flower and fruit descriptors as well as the molecular analysis to have greater tools to elucidate the phylogenetic relationships between them and with *Persea ficocosa* and *Persea tolimensis*, species with which they keep similarities of fruit and leaf.

### References

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Rolón C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar/>

Galindo-Tovar M.E., Arzate-Fernández A.M., Ogata-Aguilar N. and I. Landero-Torres. (2007). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany* 11(2), 325-334.

IPGRI. 1996. Planning collecting missions. Material de capacitación. International Plant Genetic Resources Institute, Italia 15p.

UPOV. 2006. Avocado (*Persea americana* Mill). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34p.

14.17 CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN CONGRESO AVOCADO  
BRAINSTORMING 2018



**Caracterización Morfológica y Molecular de Poblaciones de Aguacate  
“Cascarudo” del Sur del Estado de México.**

**Morphological and Molecular Characterization of “Cascarudo” Avocado  
Populations in the South of the State of Mexico**

J. C. Jaime-Dávila<sup>1</sup>

J. C. Reyes-Alemán<sup>1</sup>

J. Mejía-Carranza<sup>1</sup>

L. M. Vázquez-García<sup>1</sup>

J. G. González-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM  
Tenancingo. Ex Hacienda de Santa Ana, Carr. Tenancingo-Villa Guerrero, Km 1.5,  
CP. 52400.

Autor para correspondencia: J. C. Reyes-Alemán [reyesaleman@hotmail.com](mailto:reyesaleman@hotmail.com)

**Resumen:**

El género *Persea* posee como subgéneros a *Persea* y *Eriodaphne*, el subgénero *Persea* es el de mayor variabilidad genética y complejidad en términos evolutivos de la Familia *Lauraceae*. En el Sur del Estado de México se encontró a un tipo de aguacate denominado “cascarudo” con características morfológicas distintas a especies conocidas del subgénero *Persea*, pero semejante en pubescencia de hoja y cáscara gruesa de fruto a *Persea floccosa* y *P. tolimanensis*, asimismo comparten su hábitat con *P. americana* variedad *drymifolia*. El objetivo de estudio consistió en distinguir morfológica y molecularmente a ejemplares de dos regiones y establecer sus relaciones filogenéticas con tales especies. El análisis morfológico consistió de 64 caracteres basados en directrices IPGRI y UPOV y mediante análisis discriminante y de conglomerados se encontró que la densidad de pubescencia, ondulación y forma de hoja agrupó a individuos, en tanto que, densidad de pubescencia y ancho de sépalo, olor a anís y grosor de cascara los separaron. El estudio molecular consistió de ocho iniciadores RAPD y seis ISSR que amplificaron DNA de hojas mediante PCR con un 99 % de polimorfismos que generaron 1417 bandas de 250 a 900pb para RAPD y 917 bandas de 200 a 1000pb para ISSR con un contenido de información polimórfica (PIC) de **0.45** y 0.49 y un poder de resolución (RP) de 8.8 y 5.81 respectivamente. Los filogramas, permitieron inferir que este tipo de aguacate podría representar a un híbrido natural entre genotipos antiguos regionales con *P. floccosa*, *P. tolimanensis*, *P. americana* var. *guatemalensis* y var *drymifolia*.

**Palabras clave:** Caracterización morfológica, Marcadores moleculares, Diversidad genética, *Persea americana* Mill, Aguacate antiguo, Domesticación.

## **Abstract:**

The *Persea* genus has *Persea* and *Eriodaphne* as subgenera, the *Persea* subgenus is the one with the greatest genetic variability and complexity in evolutionary terms of the *Lauraceae* Family. In the south of the State of Mexico a type of avocado called "cascarudo" was found with morphological characteristics different from known species of the *Persea* subgenus, but similarly in the pubescence of leaf and thick peel of fruit to *Persea floccosa* and *P. tolimanensis*, their habitat with *P. americana* variety *drymifolia*. The objective of the study was to distinguish morphologically and molecularly individuals from two regions and establish phylogenetic relationships with these species. The morphological analysis consisted of 64 characters identified in IPGRI and UPOV guidelines and through discriminant and cluster analysis, it was found that pubescence density, undulation and shape of leaf grouped individuals, while pubescence density and width of sepal, smell of anise and shell thickness separated them. The molecular study consisted of eight RAPD primers and six ISSRs that amplified leaf DNA by PCR with 99% of polymorphisms that generated 1417 bands from 250 to 900 bp for RAPD and 917 bands from 200 to 1000 bp for ISSR with a polymorphic information content (PIC) of 0.45 and 0.49 and a resolution power (RP) of 8.8 and 5.81 respectively. The phylograms, allowed to infer that this type of avocado could represent a natural hybrid between old regional genotypes with *P. floccosa*, *P. tolimanensis*, *P. americana* var. *guatemalensis* and var *drymifolia*.

**Key words: Morphological characterization, Molecular markers, Genetic diversity, *Persea americana* Mill, Ancient avocado, Domestication.**

## **INTRODUCCIÓN**

México es el país con más especies del género *Persea* en América con 20 reportadas de un total de 85 (Barrientos-Priego, Muñoz-Pérez, Reyes-Alemán, Borys, & Martínez-Damían, 2015). El aguacate pertenece a este género y es un representante de importancia económica de la familia *Lauraceae*. La franja aguacatera del Sur del Estado de México forma parte del centro de origen de algunas especies del género *Persea*, a su vez en ésta, se encuentran distribuidos genotipos pertenecientes a los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (García, '1975), los cuales se distinguen uno de otro por la pubescencia de la cara interior de sus sépalos (Kopp, 1966) de acuerdo a claves taxonómicas para la descripción morfológica (Williams, 1977).

La caracterización morfológica del género *Persea* es un procedimiento para cuantificar la variabilidad fenotípica de una población así como seleccionar a los descriptores más apropiados para la distinción de una planta dentro de una colección o población de individuos (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2014) que permite orientar su conservación y mejoramiento genético

A pesar de que la descripción morfológica es una metodología que ha permitido la discriminación de individuos entre especies, tiene limitaciones, pues su expresión está supeditada a factores ambientales y fenológicos (Azofeifa-Delgado, 2006). En la actualidad combinar esta metodología con los marcadores genéticos moleculares armoniza la identificación entre individuos similares (Rentaría-Alcántara, 2007), en *Persea americana* estos últimos han permitido la separación entre razas y la distinción entre híbridos semejantes (Davis, Henderson, Kobayashi, & Clegg, 1998; Clegg, Kobayashi, & Lin, 1999; Ashworth & Clegg, 2003). Luego de años de evolución y mejoramiento selectivo del hombre, el aguacate

a generado diversidad de híbridos y formas ligados a la expresión de genes que regulan el desarrollo de flor y frutos los cuales deberían ser estudiados y aprovechados (Chanderbali et al., 2008).

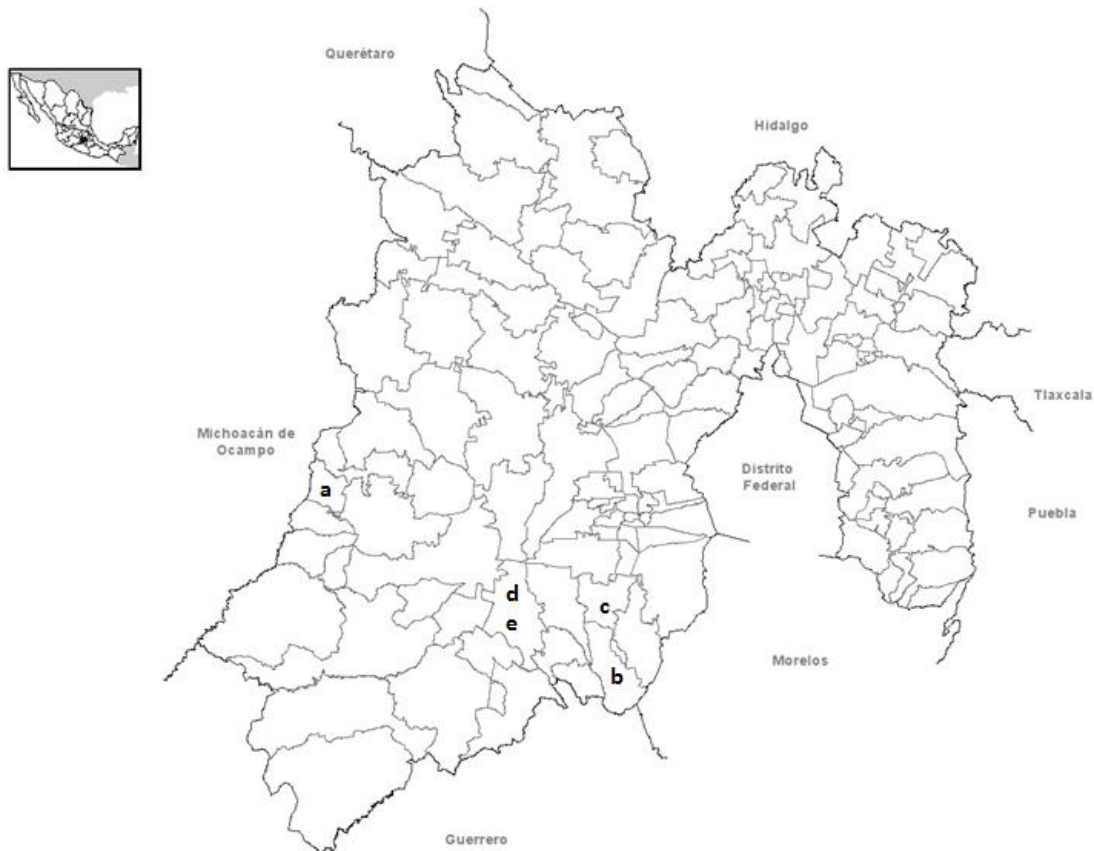
En la región del Sur del Estado de México, se identificó a un tipo de aguacate antiguo por su morfología, es probable su relación con las razas mexicana o guatemalteca, aunque también muestra semejanza morfológica con las especies: *Persea tolimanensis* (Shieber & Zentmyer, 1972; Schieber, 1981) y *Persea floccosa* (Schroeder, 1951). Este aguacate ha sido denominado “aguacate cascarudo” por los pobladores de la región al hacer alusión a la piel gruesa de su fruto. Este fruto al parecer se ha utilizado desde épocas prehispánicas en la domesticación del aguacate (Gama-Campillo & Gómez-Pompa, 1992; Galindo-Tovar, Arzate-Fernández, Ogata-Aguilar, & Landero-Torres, 2007). Sin embargo éste genotipo ha ido desapareciendo por factores ambientales adversos y por la acción del hombre, tal y como ha pasado con otros recurso genéticos del aguacate (Ben-Ya’acov, Buffler, Barrientos-Priego, de la Cruz-Torres, & Lopez-López, 1992). De tal forma que es importante su estudio y preservación, ya que en el caso específico, estos individuos muestran la capacidad de crecer en condiciones adversas de suelo y agua, factor limitante en los procesos fisiológicos de la planta, que resulta importante en la búsqueda de atributos sobresalientes en el mejoramiento genético de portainjertos de aguacate y otras especies (Meza-Castillo et al., 2018; Aguilar-Moreno, Barrientos-Priego, Rodríguez-Pérez, & Almaguer-Vargas, 2019). Su identificación es la tarea que se aborda en el presente estudio, desde el punto de vista morfológico y molecular con el objetivo de establecer relaciones filogenéticas de genotipos cascarudos de dos regiones del sur del Estado de México con las especies *P. americana*, *P. floccosa* y *P. tolimanensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material Vegetal*

El material vegetal consistió de 22 colectas (Figura 1): 6 individuos de Zumpahuacán, 6 de Ixtapan del Oro, 7 del Centro Universitario UAEM Tenancingo (*P. americana* var. *drymifolia*) localizados *In situ* y 2 ejemplares de *P. tolimanensis* y uno de *P. floccosa* como especies de referencia conservadas *ex situ* donadas por el banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C ubicado en Coatepec Harinas, Méx. (Cuadro 1). Para el análisis morfológico se utilizaron; 22 colectas para hoja, 13 para flor y 12 para fruto, con diez réplicas por muestra, para el análisis molecular; cinco muestras de Zumpahuacán, cinco de Ixtapan del Oro, cinco del CUT-Tenancingo más las especies de referencia *P. tolimanensis* y *P. floccosa*.





**Figura 1. Distribución de colectas en el Estado de México: mapa modificado de INEGI. Fuente: Marco Geo estadístico Municipal 2010. Version 5.0: a) *Persea* sp. Ixtapan del Oro, b) *Persea* sp. Zumpahuacán, c) *Persea americana* var. *drymifolia* CUT, d) *Persea floccosa* y e) *Persea tolimanensis*.**

**Cuadro 1. Material vegetal del estudio.**

Clave de colecta	Sitio de Colecta	Coordenadas y metros sobre el nivel el mar (msnm)	Atributo principal	Subgénero/ Especie/ Raza
CUT-M 1	<b>Tenancingo, Méx.</b>	18°58'6.43"N, 99°36'46.92"O, 2067	Fruto pequeño, cascara delgada	<i>Persea</i>
CUT-M 2		18°58'5.89"N, 99°36'45.12"O, 2067	Semilla grande, escasa inflorescencia	<i>americana/ var. drymifolia</i>
CUT-M 3		18°58'6.27"N, 99°36'46.52"O, 2066	Fruto mediano, semilla ovada	"
CUT-M 5		18°58'6.44"N, 99°36'47.02"O, 2066	Fruto grande, pulpa cremosa	"
CUT-M 7		18°58'6.44"N, 99°36'46.45"O, 2066	Fruto pequeño brillante	"
CUT-M 10		18°58'6.06"N, 99°36'45.31"O, 2066	Brote juvenil muy pubescente	"
PERLA- 1	<b>Zumpahuacán, Méx.</b>	18°48'25.66"N, 99°33'14.05"O, 1849	Hoja pubescencia intermedia	<i>Persea / Híbridos (probables)</i>
PERLA- 2		18°48'21.80"N, 99°33'15.21"O, 1833	Fruto pequeño, hoja pubescente	"
SANPEGU		18°49'16.36"N, 99°32'19.01"O, 1790	Hoja grande ligero olor a anís	"
SANPEGU- 2		18°49'16.16"N, 99°32'18.52"O, 1789	Hoja grande, ligero olor a anís	"
SANDESP		18°48'18.71"N, 99°32'12.17"O, 1836	Fruto cáscara gruesa, hojas grandes	"
ZUMP- IGLESIA		18°49'24.05"N, 99°32'14.39"O, 1745	Hoja muy oscura, ligero olor a anís	"
BARR		19°16'12.35"N, 100°15'21.47"O, 1698	Fruto cáscara gruesa, hojas grandes pubescentes	"

BARR- 2	<b>Ixtapan del Oro, Méx.</b>	19°16'3.11"N, 100°15'17.68"O, 1725	Hojas muy grandes pubescentes	“
BARR- 3	“	19°16'1.44"N, 100°15'18.85"O, 1722	Hojas muy grandes, ligero olor a anís	“
SANMAN	“	19°16'23.23"N, 100°15'34.90"O, 1759	Fruto mediano de cascara ligeramente delgada	“
CASV	“	19°16'20.10"N, 100°15'21.10"O, 1702	Hojas grandes pubescentes	“
CASTI- 1	“	19°16'25.53"N, 100°15'57.12"O 1810	Hojas grandes ligeramente torcidas	“
CASTI- 2	“	19°16'25.86"N, 100°15'56.15"O, 1815	Hojas intermedias, ligero olor a anís	“
<i>P. floccosa</i>	<b>CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, Méx.</b>	18°55'12.23"N, 99°45'33.45"O, 2214	Fruto mediano, cascara delgada, hoja pequeña muy pubescente	<i>Persea/ Persea floccosa</i>
<i>P. tolimanensis</i> -1	“	18°55'14.00"N, 99°45'31.91"O, 2206	Fruto redondo, cascara muy gruesa, sabor semi amargo	<i>Persea / Persea tolimanensis</i>
<i>P. tolimanensis</i> -2	“	18°55'14.03"N, 99°45'32.04"O, 2206	Fruto redondo, cascara muy gruesa, sabor semi amargo	

## Análisis morfológico

La descripción morfológica se realizó con base en International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, 1995), International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV, 2006) y Barrientos-Priego, Reyes-Alemán, y Aguilar-Melchor, (2010).

Se integró una matriz básica de datos con 64 caracteres; 19 cuantitativos y 45 cualitativos (Cuadro 2), los caracteres de hoja se evaluaron en 22 colectas, de fruto en 12 e inflorescencias en 14 de acuerdo a la disponibilidad de estructuras. La información generada se analizó mediante el software InfosStat (Di Rienzo et al., 2017).

El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva y multivariada (Hair, Black, Babin, Anderson, & Tatham, 1992) tales como análisis de conglomerados y discriminante que permitieron identificar similitudes y diferencias entre colectas y especies de referencia.

### Cuadro 2. Caracteres morfológicos utilizados.

Tipo de caracter	Hoja	Flor	Fruto
<b>Cuantitativos</b>	Longitud de hoja (cm)	Longitud de eje floral	Longitud de fruto
	Ancho de hoja (cm)	Numero de ramificaciones por inflorescencia	Diámetro de fruto
	Relación longitud/ancho de hoja (cm)	Número de flores por inflorescencia	Relación longitud/diámetro de fruto
	Longitud de peciolo (cm)	Longitud de pedicelo	Diámetro de inserción de pedicelo
	Número de venas secundarias (número)	Longitud de pétalos	Longitud de pedicelo
		Ancho de pétalos	Grosor de la cascara
		Longitud de sépalos	
	Ancho de sépalos		



<b>Cualitativos</b>	Forma de la hoja	Color de lenticelas	Forma del extremo peduncular
	Forma del ápice	Tipo de floración	Presencia de cuello
	Torcedura de la hoja	Tipo de nectario	Depresión del extremo peduncular
	Torcedura del ápice	Estilo de flor	Posición de pedicelo
	Ondulación de la hoja	Presencia de polen	Cabeza de clavo
	Relieve de las venas superiores	Pubescencia del sépalo interno	Forma de la parte estilar
	Densidad de pubescencia	Densidad de pubescencia el sépalo interno	Conspicuidad de lenticelas
	Olor a anís	Pubescencia del pétalo	Tamaño de lenticelas
		Densidad de pubescencia del pétalo	Color de lenticelas
		Abundancia de la floración	Brillantes de fruto
		Posición de la inflorescencia	Superficie de fruto
			Persistencia de perianto
			Grosor en comparación del pedúnculo
			Forma de pedicelo
			Color de pedicelo
			Superficie de pedicelo
			Color de fruto maduro
			Consistencia de la cascara
			Adherencia de la cascara a la pulpa
			Color principal de la pulpa
			Color junto a la cascara
			Ancho de la capa junto a la cascara
			Conspicuidad de fibras en la pulpa
			Consistencia de la pulpa
			Aroma a anís de la pulpa
			Relación longitud de fruto/semilla

## Análisis molecular

El DNA genómico se extrajo de 100 mg de tejido fresco de hoja utilizando el kit FAST ID Genomic DNA Extraction® según las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA se midió con un espectrofotómetro ND- 1000 Nano Drop (Thermo Fisher Scientific), con parámetros establecidos entre 1.6 y 2.0µl. La mezcla de PCR para los iniciadores RAPD contenía 2µl de DNA, 10µl de MyTaq Mix, 2 µl de iniciador y 4µl de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 28µl, los mismos componentes se utilizaron para ISSR. La PCR se realizó en un termociclador GENE Amp PCR System 2700® (Applied Biosystems, USA) con el siguiente programa: para RAPD; 1 min a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 40°C por 30 s y 72°C por 1.5 min, con una extensión final de 72°C por 2.5 min, para ISSR; 1 min a 94°C, seguido de 38 ciclos a 94°C por 30 s, 48°C por 30 s, y 72°C por 2 min con una extensión final de 72°C por 2.5 min. Los iniciadores utilizados y sus índices de eficiencia se describen en el Cuadro 3. Los productos de PCR, se corrieron en electroforesis en una Celda MS CREEN Cleaver Scientific® con geles de agarosa entre 0.9 % a 1.2%, con una corriente de 90 a 120V de acuerdo al marcador durante 2 a 3 horas.

**Cuadro 3. Tipo de marcador molecular utilizado, secuencia del iniciador, bandas de DNA/locus, PIC y RP obtenidos.**

Tipo de marcador	Iniciador	Secuencias (5'-3')	Locus/bandas DNA	PIC	RP
------------------	-----------	--------------------	------------------	-----	----

<b>RAPD<sup>1</sup></b>	A 15	TTCCGAACCC	17	0.36	1.33
	C 08	TGGACCGGTG	13	0.43	14.08
	C 10	TGTCTGGGTG	7	0.44	4.08
	C 13	AAG CCT CGT C	10	<u>0.50</u>	8.33
	E 7	AGA TGC AGC C	10	0.48	8.33
	E 14	TGC GGC TGA G	5	0.47	2.08
	E 16	GGT GAC TGT G	14	0.49	<u>16.33</u>
	E 18	GGA CTG CAG A	11	<u>0.50</u>	10.08
		<b>Total</b>	<b>87</b>	<b>3.67</b>	<b>64.64</b>
	<b>Promedio</b>	<b>10.87</b>	<b>0.45</b>	<b>8.08</b>	
<b>ISSR*</b>	AC(GACA) <sub>4</sub>	ACGACAGACAGACAGACA	7	0.49	4.08
	DBADA (CA) <sub>7</sub>	DBDACACACACACACACA	6	0.50	3
	(AC) <sub>8</sub> YG	ACACACACACACACACYG	8	0.50	5.33
	(GA) <sub>8</sub> YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	6	0.50	3
	(TCC) <sub>5</sub> RY	TCCTCCTCCTCCTCCRY	13	0.46	<u>14.08</u>
	(GACA) <sub>4</sub> **	GACAGACAGACAGACA	8	0.49	5.33
		<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>2.93</b>	<b>34.83</b>
	<b>Promedio</b>	<b>8</b>	<b>0.49</b>	<b>5.81</b>	

<sup>1</sup>Compañía Sigma- Aldrich, \*B = G, T, C; D = G, A, T; Y = C, T; R = A, G, iniciadores anclados, \*\* iniciador sin ancla

Para el análisis estadístico las bandas amplificadas mediante RAPD e ISSR permitieron integrar una matriz de caracteres binarios en el que las bandas polimórficas fueron consideradas como variables discretas donde 1 representó presencia y 0 ausencia, La información fue procesada mediante el software Free Tree (Version 0.91.5) (Pavlíèek, Hrdá, & Flegr, 1999) y se visualizó mediante el programa TreeView (Page, 2001). Para RAPD se utilizó el criterio de distancia de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908) y el método de construcción del árbol Neighbord-Joining (Saitou & Nei, 1987). Para ISSR el mismo criterio de distancia de similitud anterior y el método de construcción UPGMA (Sneath & Sokal, 1973), se realizó un bootstrapping de 1000 repeticiones en cada caso.

La eficiencia de los iniciadores se calculó mediante: 1) Contenido de Información Polimórfica (PIC), con la ecuación (a) descrita por Roldan- Ruiz et al. (2000).

$$PIC_i = 2f_i (1-f_i) \quad (a)$$

Donde PIC<sub>i</sub>, es el contenido de información polimórfica, f<sub>i</sub> es la frecuencia de las bandas presentes y 1-f<sub>i</sub> correspondió a la frecuencia de las bandas ausentes. De acuerdo a De Riek, Calsyn, Everaert, Van Bockstaele y De Loose, (2001) el valor máximo de PIC es de 0.5 en marcadores de carácter dominante.

2) El Poder de Resolución (R<sub>p</sub>) de los iniciadores calculada mediante la fórmula (b) descrita por Prevost y Wilkinson (1999).

$$R_p = \sum lb \quad (b)$$

Donde lb, representa la informatividad de la banda calculado mediante la fórmula (c):

$$lb = 1 - (2x | 0.5 - p |) \quad (c)$$

Donde p, corresponde a la proporción de todos los genotipos que contienen a la banda y lb al porcentaje de bandas polimórficas.

## RESULTADOS

El aguacate tipo cascarudo se ubica en regiones cálidas del Estado de México en sitios de transición de bosque mesófilo, bosques de pino-encino, selva baja caducifolia y pastizales (Challenger & Soberón, 2008) es común en clima templado semicálido subhúmedo, estas condiciones corresponden a los sitios en Zumpahuacán e Ixtapan del oro, la primer región tiene una altura de 1900-2000 m y la segunda de 1700-1800 m promedio, caracterizado por una topografía accidentada y cañadas que favorecen el desarrollo de diferentes especies (Caballero-Martínez, Rivas-Manzano, & Aguilera-Gómez, 2009; Emeterio-Lara, Palma-Linares, Vázquez-García, & Mejía-Carranza, 2016).

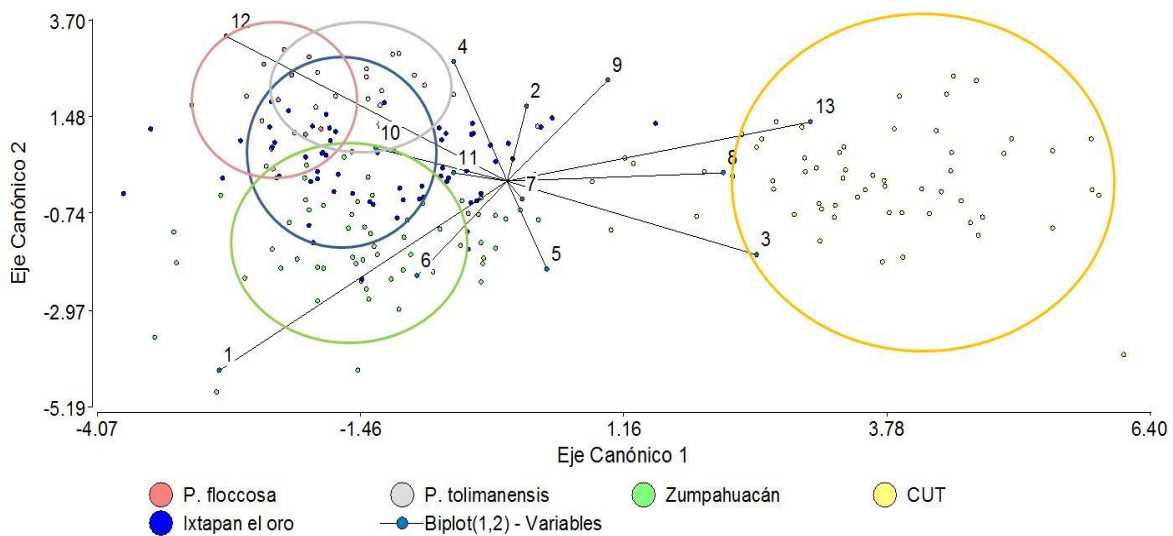
### Descripción morfológica del aguacate “cascarudo”

los arboles tienen un crecimiento que va de ascendente a pocas veces irregular, una altura promedio de 12 a 20 metros, de edad variable pero predominan ejemplares entre 80 a 100 años, la pubescencia en sus brotes juveniles es notoria, de color verde claro. **Hoja.** Sus hojas tienen forma que va de oval a obovoide, predomina la longitud más que la anchura entre 16 a 20 centímetros, pubescencia moderada a alta y leve o nulo olor a anís cuando se tritura la hoja. **Inflorescencias.** Están presentes a mediados de febrero, su abundancia es de intermedia a abundante, en su mayoría de hábito floral tipo A, lenticelas verdes en sus brotes jóvenes, pubescencia interna de tépalos de moderada a abundante, estilo floral corto y pubescente, nectario sécil. **Fruto.** De cascara gruesa, coriácea y corchosa que va de 1.2 a 2 mm, forma aperada a piriforme de 11 a 16 cm de longitud y diámetro de 7 cm, presenta cuello bien expresado, madura de color púrpura a negro predominantemente desde la parte estilar hasta la punta, color de pulpa va de amarillo a verde, de consistencia acuosa a grasienta, con fibras conspicuas. **Semilla.** Es de forma ovada, tamaño grande en relación con el fruto, que deja poco espacio de pulpa con débil adherencia a la pulpa (**Figura 2**).



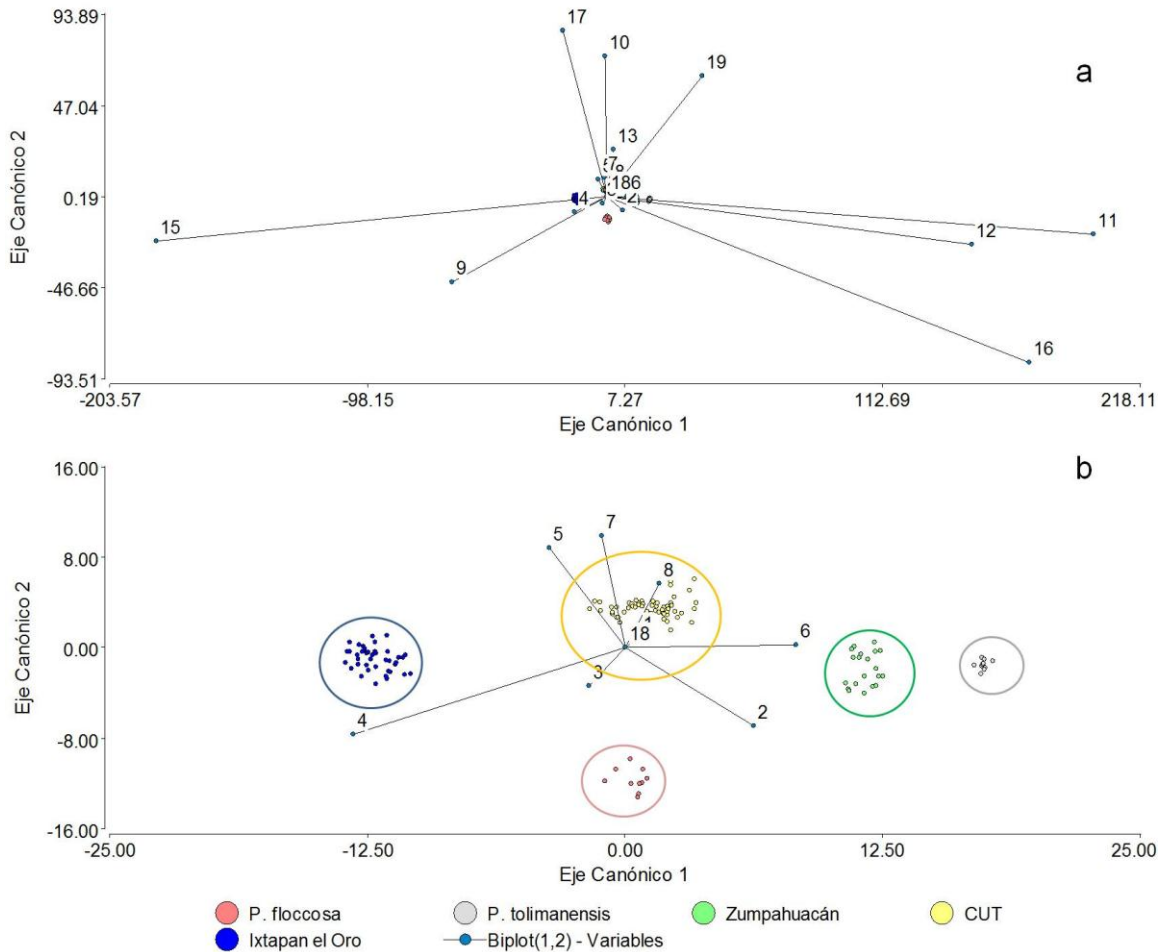
**Figura 2. Estructuras de morfotipos cascarudos: a) colectados en Zumpahuacán, México. b) colectados en Ixtapan del Oro, México.**

El análisis discriminante de hoja, generó cinco grupos (Figura 3), en los que se observó similitud entre colectas con los genotipos de referencia (*P. tolimanensis* y *P. floccosa*) con caracteres como densidad de pubescencia que va de media a densa y ondulación de hoja de débil a media. En Zumpahuacán destaca la longitud de hoja como variable más importante en la separación entre morfotipos con las poblaciones de referencia, con intervalos de 16 a 37.5cm de longitud, consideradas de media a muy larga. La población del CUT confirma su separación por los caracteres mencionados.



**Figura 3. Análisis discriminante de hoja de 22 colectas con 13 variables y cinco agrupamientos:** 1 = Longitud de hoja (cm), 2 = Ancho de hoja (cm), 3 = Relación longitud / ancho de hoja, 4 = Longitud de peciolo (cm), 5 = Número de venas secundarias (numero), 6 = Forma de la hoja, 7 = Forma del ápice, 8 = Torcedura de la hoja, 9 = Torcedura del ápice, 10 = Ondulación de la hoja, 11 = Relieve de las venas superiores, 12 = Densidad de la pubescencia en el envés de la hoja, 13 = Olor a anís de la hoja

El análisis discriminante de flor (Figura 4a), se efectuó con base en 19 variables en 14 colectas. Para visualizar los individuos de las poblaciones, fue necesario realizar cortes en los ejes canónicos X y Y, de 20 y 16 puntos absolutos respectivamente (Figura 4b), dejando expuesto cada individuo con sus repeticiones y visualizar una eficiente separación de los grupos, los grupos se separaron por cinco variables; Densidad de la pubescencia del sépalo que va de baja a media (Ixtapan del Oro), Tipo de nectario en su mayoría pedunculado (Zumpahuacán y *P. tolimanensis*), Presencia de polen en la mayoría de las inflorescencias (Zumpahuacán), Abundancia de la floración de intermedia a densa (Ixtapan del Oro) y lenticelas de color rojizo (*P. floccosa*).



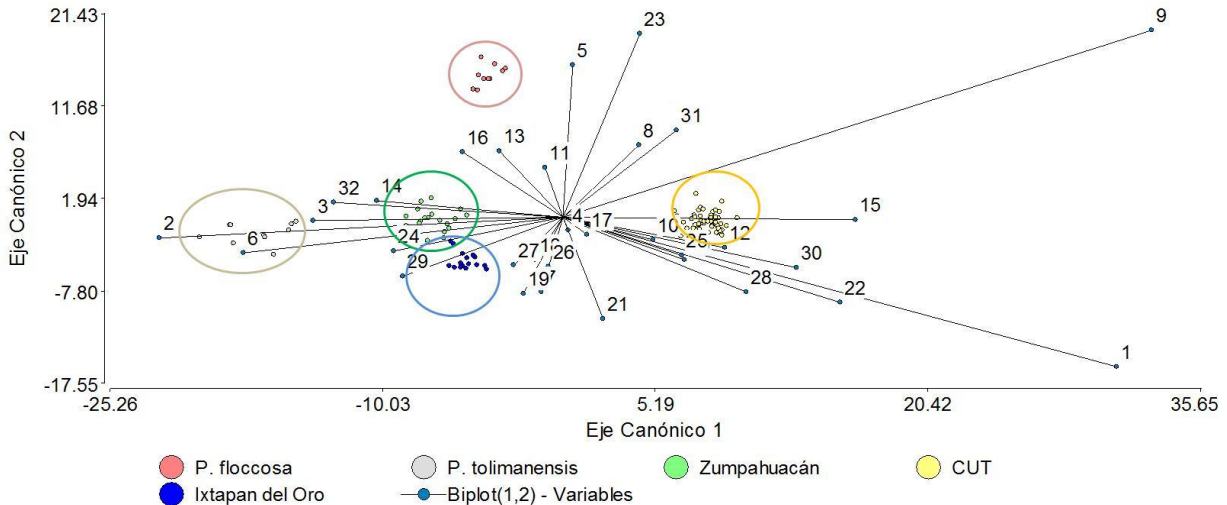
**Figura 4. Análisis discriminante de inflorescencias de 14 colectas con 19 variables y**

**cinco agrupamientos:** 1 = Longitud el eje principal de la inflorescencia (cm) , 2 = Número de ramificaciones por inflorescencia, 3 = Número flores por inflorescencia, 4 = longitud se pedicelo (mm), 5= Longitud de pétalos (mm), 6 = Ancho de pétalo, 7 = Longitud de sépalo, 8 = Ancho de sépalo, 9 = Color de lenticelas, 10 = Tipo de floración, 11 = Tipo de nectario, 12 = Presencia de polen, 13 = Estilo de la flor, 14 = Pubescencia de sépalo interno, 15 = Densidad de la pubescencia del sépalo, 16 = Abundancia de la floración, 17 = Posición de la inflorescencia, 18 = Pubescencia del pétalo, 19 = Densidad de la pubescencia del pétalo.

Las inflorescencias de las colectas del CUT (*Persea americana* var. *drymifolia*), se distinguen con claridad de las demás poblaciones mediante los caracteres; Longitud de pétalo, Longitud y ancho de sépalo, manteniéndose un grupo compacto no obstante que el tamaño de muestra fue mayor que el resto de agrupamientos. Los grupos de Zumpahuacán y *P. tolimanensis* se separaron por el estilo de la flor, tipo de nectario, pubescencia y ancho del pétalo habiendo entre ellas similitud pero sin combinarse.

Con respecto a fruto, el análisis discriminante se realizó con base en 33 caracteres (**Figura 5**), en los que se visualiza afinidad del agrupamiento de Zumpahuacán con la especie *P. tolimanensis* con semejanza en el grosor de cascara de 0.9 a 2.2mm y Diámetro de fruto de

5.73 a 7.90 cm. El agrupamiento de Ixtapan se caracteriza por la consistencia seca de la pulpa de su fruto y en el grupo de la raza mexicana CUT las variables discriminantes fueron brillantez de fruto y la depresión del extremo peduncular de su fruto.



**Figura 5. Análisis discriminante de fruto de 12 colectas con 32 variables y cinco agrupamientos:** 1 = longitud de fruto (cm), 2 = Diámetro de fruto (cm), 3 = Relación Longitud/ Diámetro (cm), 4 = Diámetro de inserción del pedicelo (mm) 5 = Longitud de pedicelo (cm), 6 = Grosor de la cascara (mm), 7= Forma del extremo peduncular, 8= Presencia de cuello, 9 = Depresión del extremo peduncular, 10 = Posición del pedicelo, 11= Forma de la parte estilar, 12 = Conspicuidad de lenticelas, 13 = Tamaño de lenticelas, 14 = Color de lenticelas, 15 = Brillantez, 16 = Superficie, 17 = Persistencia del perianto, 18 = Grosor en comparación con el pedúnculo, 19= Forma del pedicelo, 20 = Color del pedicelo, 21= Superficie del pedicelo, 22 = Color de fruto maduro, 23 = Consistencia de la cascara, 24 = Adherencia de la cascara a la pulpa, 25 = Color principal de la pulpa, 26 = Color junto a la cascara, 27 = Ancho de la capa junto a la cascara, 28 = Conspicuidad de fibras en la pulpa, 29 = Consistencia de la pulpa, 30 = Aroma a anís de la pulpa , 31 = Relación de longitud de fruto/ longitud de semilla, 32 = Pedicelo con cabeza de clavo

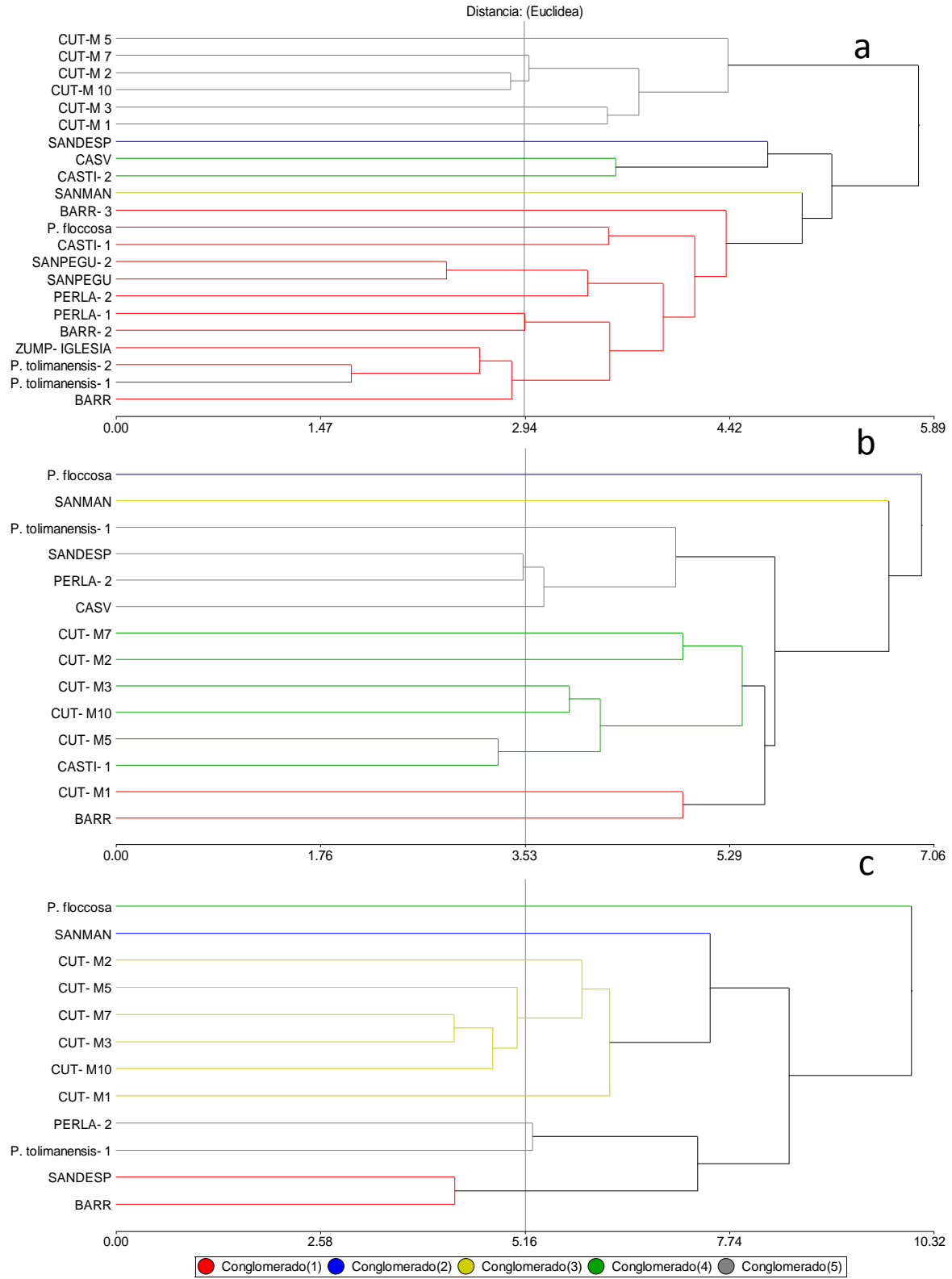
Los análisis de conglomerados mediante la técnica Promedio (Average Linkage) con una distancia Euclídea de 2.92 para hoja, 3.53 para flor y 5.16 para fruto, permitieron generar agrupamientos, para el caso de hoja (**Figura 6a**): se distingue una rama que agrupa a los individuos del CUT, *Persea americana* var. *drymifolia* con hoja típica aguda lanceolada, en tanto que las poblaciones de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro correspondientes a los genotipos cascarudos, se combina su ramificación y evidencian similitud entre sus hojas generalmente grandes, redondas y pubescentes a excepción de la colecta SANMAN que queda aislada de las demás, en esta, el olor a anís de su hoja es evidente.

En el conglomerado de flor (**Figura 6b**), las inflorescencias correspondientes a las colectas del CUT se agrupan en la primera ramificación, a excepción del genotipo CUT-M1 que se muestra cercano al cascarudo Ixtapan del Oro (BARR) evidenciando su similitud probablemente por sus longitud de sus pétalos y sépalos. En un segundo agrupamiento se integran colectas de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro con la especie *P. tolimanensis* correspondiendo estos a los típicos cascarudos. Sin embargo, se observan muy afines la especie *P. floccosa* y el tipo cascarudo SANMAN muestran semejanza estrecha, por la densidad de la pubescencia en sépalos y pétalos distintivos de *P. floccosa*.

En los frutos de las colectas de acuerdo al conglomerado generado (**Figura 6c**), se repite la afinidad evidenciada en la flor entre SANMAN y *P. floccosa*, en ellos se distingue la forma

aperada, lenticelas corchosas y cáscara verde de fruto típicas de *P. floccosa*. Un agrupamiento compacto lo integra la raza mexicana (CUT). Una similitud de fruto muy interesante se observa entre la colecta PERLA-2 y *P. tolimanensis* y afín a ellos las colectas SANDESP y BARR, que corresponden a cascarudos de Zumpahuacán, en estos predomina la semejanza de los caracteres de fruto; grosor de cascara, redondez, lenticelas corchosas, así como similitud en forma y longitud y consistencia de pulpa en el fruto maduro.





**Figura 6. Análisis de conglomerados delimitado por 5 agrupamientos: a) Hoja, b) Flor y c) Fruto de 22, 14 y 12 colectas respectivamente.**



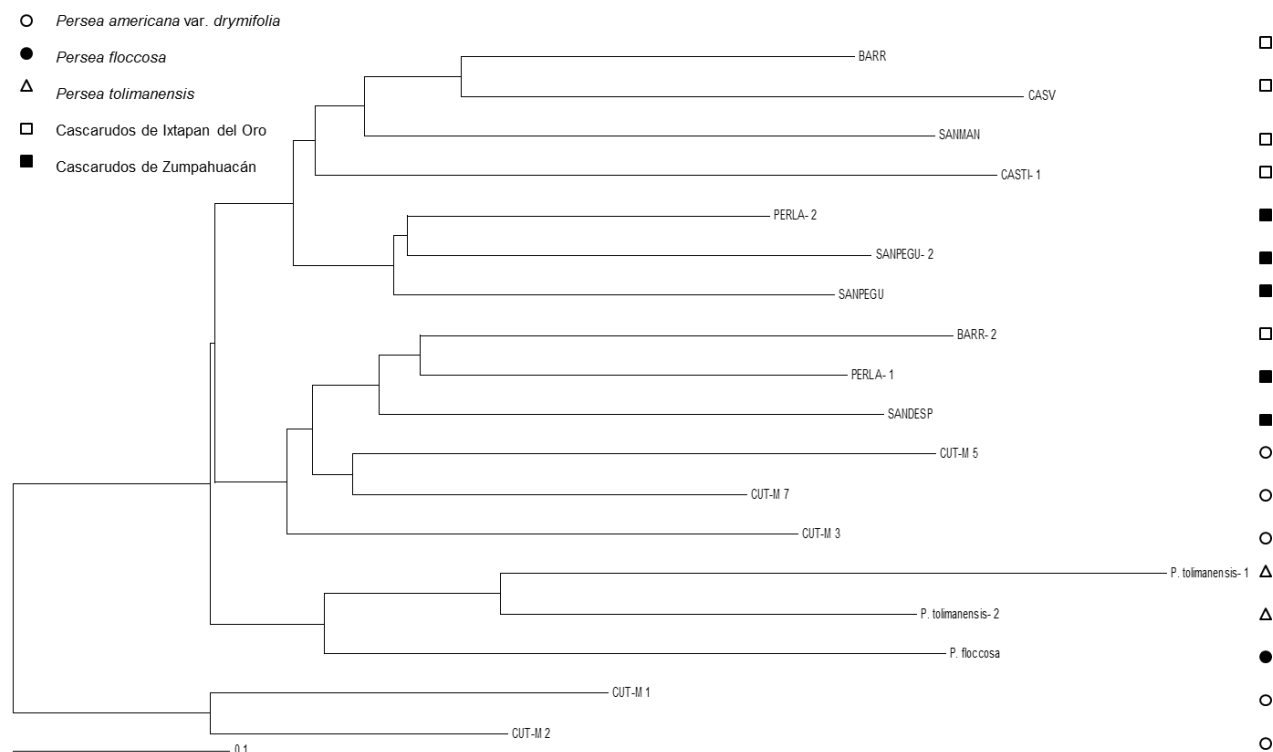
## Desarrollo de los marcadores moleculares.

El DNA extraído de las muestras fue apropiado para los análisis RAPD e ISSR. El cociente de medición fotométrica  $OD_{260/280}$  se encuentra entre 1.96 a 6.26 lo que indica que su calidad fue aceptable.

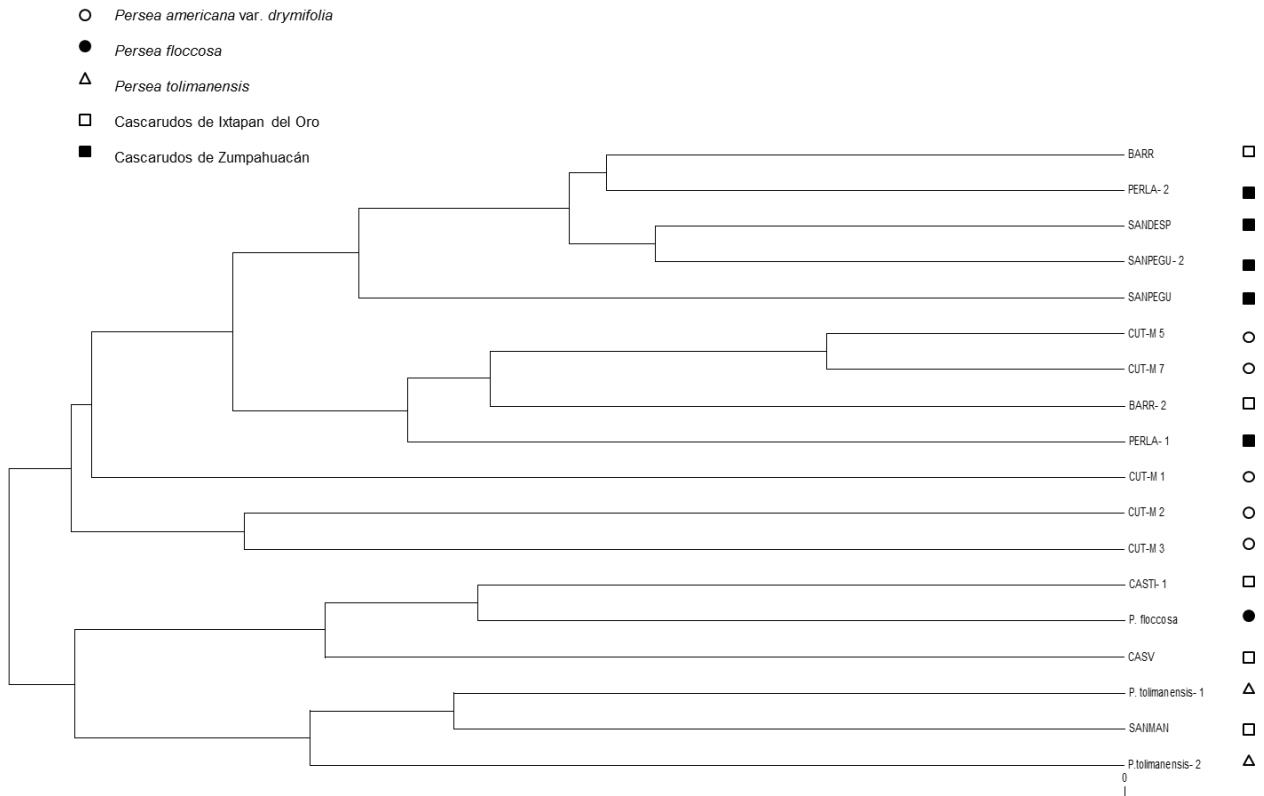
Los sistemas de iniciadores tipo RAPD e ISSR utilizados, mostraron un 99% de polimorfismos con productos de PCR de 250 a 900pb con 1417 bandas reconocidas para RAPD y 200 a 1000pb con 917 bandas para ISSR en las 18 colectas. La capacidad de los primers para dar información se debió a su contenido de información polimórfica (PIC) y poder de resolución (RP); en el sistema RAPD el PIC vario de 0.36 para el iniciador A15 a 0.50 para el E18 y C13 con un promedio de 0.45 y E18 fue el iniciador más informativo; en ISSR el PIC oscilo de 0.46 para  $(TCC)_5RY$  y 0.50 para  $(AC)_8YG$ , DBADA  $(CA)_7$ , y  $(GA)_8YC$ . El RP en el sistema RAPD tuvo una tasa de 64.64 puntos con variaciones de 1.33 para A15 hasta 16.33 para E16 siendo este el más eficiente, en ISSR el RP fue de 34.83, siendo de 3 para DBADA  $(CA)_7$ , y  $(GA)_8YC$  a 14.08 para  $(TCC)_5RY$  con un promedio de 5.81.

## Relaciones genéticas y similitudes entre colectas.

Las relaciones genéticas entre colectas estimadas a partir de los datos de los marcadores mediante el coeficiente Jaccard (1908) y el método Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) para RAPD y Jaccard (1908) con UPGMA (Sneath, & Sokal, 1973) para ISSR, confirman la divergencia genética entre las colectas descritas abajo (Figuras 7 y 8).



**Figura 7. Filograma de 18 colectas de *Persea* generado mediante ocho iniciadores RAPD: se utilizó el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un bootstrap de 1000 repeticiones.**



**Figura 8. Filograma de 18 colectas de *Persea* generado mediante seis iniciadores ISSR: se utilizó el índice Jaccard y el método UPGMA con un bootstap de 1000 repeticiones.**

En el caso de RAPD, la formación del árbol filogenético resultó en una agrupación de acuerdo al origen proveniente de las colectas en el estudio (**Figura 7**), planteando cuatro agrupamientos de inicio. Se observa una separación de las especies bien identificadas como *P. tolmanensis* y *P. floccosa*, integradas en el estudio como referencia de parentesco de algunos caracteres morfológicos.

Por otra parte, los individuos denominados propiamente como “cascarudos” colectados en las zonas de Zumpahuacán e Ixtapan del oro forman un grupo de siete integrantes que demuestran una relación genéticamente similar.

La formación del último grupo revela que individuos de las dos regiones de colecta comparten características genéticas con la especie de *P. americana* var. *drymifolia*, conocidos como “aguacate criollos”, obtenidos *ex situ* del Huerto del Centro Universitario Tenancingo y algunos autores mencionan que esta especie tiene orígenes ancestrales en

Centroamérica, lo cual explica la interacción geográfica que compartían con los genotipos de “cascarudos” en el momento de la colecta.

En contraste, con los marcadores ISSR´s (**Figura 8**), la separación de las colectas generó cuatro agrupaciones evidentes, donde se puede repetir la agrupación de especies bien identificadas como son *P. americana* var. *drymifolia* como lo es; CUT-M1, CUT-M2 Y CUT-M3 sin embargo en otro grupo con dos integrantes de esta variedad son aislados en el filograma de manera singular y compartiendo algún tipo de características con las colectas de interés.

Por otro lado en otra agrupación, integrantes de la región de Ixtapan del oro guardan una relación genética importante con una especie ancestral como lo es *P. floccosa*, la cual de manera morfológica muestra evidentes características similares a la colectas de los aguacates “cascarudos”.

Otra bifurcación del filograma muestra un grupo que contiene individuos tanto de Ixtapan del Oro y Zumpahuacán, que pudieran compartir algunas características genéticas como se ha planteado en primera instancia con variables morfológicas en presentada en este estudio.

## DISCUSIÓN

Los aguacates cascarudos del Estado de México se distinguen por su hoja oval, pubescencia en hoja y grosor de cáscara de fruto que los asemeja a *P. floccosa* (Schroeder, 1951) que crece en el este de Puebla y Chiapas a 1800 m de altura, caracterizado por su fruto ovoide a obovoide de 5 cm de longitud, de hoja y brotes jóvenes pubescentes (Williams, 1977). *P. floccosa* es considerado una especie rara de montaña relacionada con *P. nubigena*, distinguible de este por su pubescencia, otras especies con pubescencia en hoja son *P. shiedeana* y *P. tolimanensis*. *Persea floccosa* y *Persea americana* var. *drymifolia* (Blake, 1920) han sido relacionadas filogenéticamente en estudios anteriores (Furnier, Cummings, & Clegg, 1990), los aguacates cascarudos del Estado de México se encuentran desarrollando en poblaciones de la raza mexicana *P. americana* var. *drymifolia* con quienes podrían estar genéticamente vinculados.

Con relación al cruzamiento, estudios genéticos han señalado que dentro del género o subgénero *Persea*, no hay divergencia entre especies, es decir entrecruzamiento, más bien lo que prevalece es una alta tasa de hibridación al interior del grupo (*Persea*) que lo hace ser considerado un grupo monofilético (van der Werff, 2002). Estudios recientes en la secuenciación de nucleótidos de *P. americana* var. *drymifolia* han revelado que a pesar de su carácter alógamo, en la raza mexicana su recombinación es muy baja en comparación con la mutación como fuente de su diversidad (Chen, Morrell, De la Cruz, & Clegg, 2008), lo anterior al haber encontrado que prevalece una desviación en el equilibrio Hardy Weinberg y un desequilibrio en el ligamiento (LD) (Guzmán et al., 2017), es decir, posee dificultad para hibridarse con otra raza, por lo que solo a su interior tiene facilidad para segregar y generar polimorfismos. Chen et al., (2008) habían analizado a las razas de *P. americana* (*drymifolia*, *guatemalensis* y *americana*) y encontraron un aumento significativo en el LD, no así al analizar a las razas por separado; mexicana, guatemalteca y antillana. Lo anterior fundamenta la preservación de los individuos que han estado confinados geográficamente por el hombre, como es el tipo cascarudo del Estado de México que al ser poco atractivo por

su fruto en comparación con el criollo mexicano, ha tenido poco contacto y probablemente un proceso natural de hibridación que preserva sus características particulares.

Sin embargo Ashworth y Clegg (2003), afirman que la hibridación inter racial ha ocurrido muy recientemente de lo supuesto y que a la fecha existen pocas diferencias entre razas. Aunque es probable que la hibridación entre *P. americana* var *drymifolia* con var *guatemalensis* si haya ocurrido durante un periodo largo de tiempo (Williams, 1977). En un estudio etnobotánico Gama-Campillo y Gómez-Pompa (1992) concluyeron que el aguacate es una especie aún semi domesticada en un proceso continuo de recombinación por el intercambio de material propagativo que inició desde culturas antiguas. En tal contexto el aguacate cascarudo podría corresponder a un híbrido inter racial o inter específico originado en tiempos recientes.

Los caracteres morfológicos tradicionales para describir al género *Persea* no han resultado satisfactorios (Rodríguez-Medina et al., 2009; Rohwer et al., 2009), quienes han sugerido robustecer mediante análisis moleculares. Los marcadores RAPD e ISSR utilizados separaron dos grupos de cascarudos por su origen geográfico, esto sugiere que los genotipos de Zumpahuacán e Ixtapan del Oro no se han desplazado recientemente por acción del hombre y concuerda con el supuesto de grupos intactos definidos por altitud y latitud (Chen et al., 2008; Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, Simuta-Velázco, Barrientos-Priego, & Gallegos-Vázquez, 2013; Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, & Barrientos-Priego, 2016; Guzmán et al., 2017). O bien que exista afinidad filogenética con especies que pudieron haber participado en su origen como: *P. floccosa*, *P. tolimanensis* y *P. americana* (Reyes-Alemán et al., 2013; Reyes-Alemán et al., 2016), es remarcable la convivencia de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* del género *Persea* en América como indica Rohwer et al. (2009) ya que el tipo de cascarudo en estudio convive con poblaciones de aguacatillos silvestres del subgénero *Eriodaphne* como *P. cinerascens* y *P. hintonni*, además de *P. americana*.

Chanderbali, Soltis, Soltis, y Wolstenholme (2013) refieren a *P. americana* como una especie altamente polimórfica que requiere estudios de genética y campo para resolver controversias taxonómicas actuales a partir de la clasificación realizada por Koop (1966). Los aguacates cultivados son formas hortícolas de *P. americana*; y los individuos silvestres solo formas geográficas de las mismas especies había indicado Popenoe (1935). Mediante RFLP Furnier et al. (1990) logró separar a *P. nubigena*, *P. steyermarkii* y *P. floccosa* de *P. americana*; sin embargo concluyó que éstos sólo son variantes de *P. americana*, lo vislumbra otra ruta para poder considerar a los cascarudos, es decir que se trate tan solo de formas silvestres de *P. americana*. Ashworth y Clegg (2003), sugieren que las 3 razas de *P. americana* fueron domesticadas por separado por las culturas prehispánicas sin haber estado en contacto hasta después de la llegada de los europeos (Chen et al., 2008), por lo que formas como los cascarudos pudieron haber permanecido intactas.

A la fecha se reconocen tres razas de *P. americana* (*drymifolia*, *guatemalensis* y *americana*) con características morfológicas y distribución definida en Mesoamérica (Fiedler, Bufler, & Bangerth, 1998; Williams, 1977). Antes de la llegada de los españoles se encontraban separadas por barreras climáticas y topográficas, luego comenzaron a mezclarse con evidencia clara de introgresión racial (Gama-Campillo & Gomez-Pompa, 1992).

La generación de las principales variedades comerciales de acuerdo a Chen et al. (2008) ha sido en condiciones de altura, como el Centro de México. Williams (1977) indicó que *Persea nubigena* fue antecesor de la raza guatemalteca de Guatemala, traído a México después de la conquista, iniciándose la hibridación con la raza mexicana para generar genotipos importantes como fue la variedad "Fuerte" en Puebla, México. Por lo que, el origen del aguacate cascarudo podría considerarse también una hibridación con genotipos afines a la raza guatemalteca con la mexicana evidenciado por la cáscara gruesa. La hibridación ha sido un proceso continuo que conduce a la variabilidad genética del aguacate revelado por estudios morfológicos y moleculares en nuestro país (Cuiris-Pérez, Guillen-Andrade, Pedraza-Santos, López-Medina, & Vidales-Fernández, 2009), en Nuevo León (Gutierrez-Diez et al., 2009; Acosta Díaz, Almeyda-León, & Hernández-Torres, 2013), en Veracruz (Galindo-Tovar, et al., 2011) en Nayarit (López-Guzmán et al., 2015) y Guerrero (Damían-Nava et al., 2017).

La domesticación ha sido un efecto de cuello de botella (Chen et al., 2008), donde se ha seleccionado lo útil; tamaño, tiempo de maduración de fruto, sabor, etc., quedando como relictos los ejemplares poco atractivos como el aguacate de estudio. El aguacate fue una de las primeras plantas domesticadas en Mesoamérica como lo fue el área maya, concluyendo dos causas fundamentales en esta ruta; la intervención humana y la hibridación natural (Gama-Campillo & Gómez-Pompa, 1992; Galindo-Tovar et al., 2007).

## CONCLUSIÓN

Los marcadores morfológicos y moleculares de ADN utilizados ofrecieron una interpretación eficiente de la variabilidad genética del aguacate y permitieron argumentar que los individuos denominados “cascarudos” correspondientes a dos poblaciones del Estado de México, se tratan de individuos distintos a la raza mexicana con quien comparten hábitat. Los perfiles genético moleculares de ADN generados indican que los individuos de Ixtapan del Oro y Zumpahuacán, guardan relación filogenética con especies del género *Persea* y se infiere que ha existido una recombinación constante que conduce a la hibridación entre individuos. Los marcadores moleculares redujeron los sesgos por efecto ambiental durante la descripción morfológica y la densidad de pubescencia de hoja, olor a anís y grosor de cáscara fueron los caracteres más discriminantes en la conformación de agrupamientos.

## LITERATURA CITADA

Acosta-Díaz, E., Almeyda-León, I. H., & Hernández-Torres, I. (2013). Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(4), 531–542.

Aguilar-Moreno, J., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, J. E., & Almaguer-Vargas, G. (2019). Portainjertos de durazno en déficit hídrico y su caracterización con base a variables fisiológicas y anatómicas, *Bioagro*, 31(2), 91–102.

Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242.

Ashworth, V. E. T. M., & Clegg, M. T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes, *Journal of Heredity*, 94(5), 407–415.

Barrientos- Priego, A. F., Reyes Alemán, J. C., Aguilar-Melchor, J. J. (2010). *Manual grafico para la descripción varietal de aguacate: Graphic handbook for the description of avocado varieties* (1a ed.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SNICS-SAGARPA), Tlalnepantla, Estado de México. 136 p. <https://www.gob.mx/snics/documentos/manual-grafico-para-la-descripcion-varietal>

Barrientos-Priego, A. F., Muñoz-Pérez, R. B., Reyes-Alemán, J. C., Borys M. W., & Martínez-Damían, M. T. (2015). Taxonomía, cultivares y portainjertos. In D. Téliz, & A. Mora (Eds.), *El aguacate y su manejo integrado* (1a. ed., pp. 29–60). México: bba.

Ben-Ya'acov, A., Buffler, G., Barrientos-Priego, A. F., de la Cruz-Torres, E., & Lopez-López, L. (1992). A study of avocado germplasm resources 1988-1990: General description of the international project and its findings. *Proceedings of Second World Avocado Congress II*, California, U.S., 535–541.

Blake, S. F. (1920). A preliminary revision of the North American and West Indian avocados (*Persea* spp.). *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 10(1), 9–21.

Caballero-Martínez, L. A., Rivas-Manzano, I. V., & Aguilera-Gómez, L. I. (2009). Hábitos alimentarios de *Anoura geoffroyi* (Chiroptera: Phyllostomidae) en Ixtapan del Oro, Estado de México, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(1), 161–175.

Challenger, A., & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres. *Capital Natural de México*, 1, 87–108.

Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Ashworth, V. E., Clegg, M. T., Litz, R. E., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era, *BioEssays*, 30(4), 386–396. doi: DOI 10.1002/bies.20721

Chanderbali, A. S., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Wolstenholme B. N. (2013). Taxonomy and botany. In B., Schaffer, B. N., Wolstenholme, & A. W. Whiley (Eds.), *The avocado: botany, production and uses* (2a. ed., pp. 31–50). Wallingford, UK.: CAB International. ISBN 978 1 84593 701 0.

Chen, H., Morrell, P. L., De la Cruz, M., & Clegg, M. T. (2008). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Heredity*, 99(4), 382–389.

Clegg, M. T., Kobayashi, M., & Lin, J. Z. (1999). The use of molecular markers in the management of avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 227–231.

Cuiris-Pérez, H., Guillen-Andrade, H., Pedraza-Santos, M. E., López-Medina, J., & Vidales-Fernández, I. (2009). Genetic variability within mexican race avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm collections determined by ISSRs. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2): 169–175. doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2009.15.023>

Damián-Nava, A., Palemón-Alberto, F., Moreno-Juárez, J., Hernández-Castro, E., Damián-Díaz, P. E., Vargas-Álvarez, D., ...Reyes-García, G. (2017). Characterization of creole

avocado fruits harvested from both central and northern regions of Guerrero, Mexico. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(10), 151–159. doi: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.10.020>

Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., & Clegg M. T., (1998). Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *Journal of Heredity*, 89, 319–323.

De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1254–1265.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C.W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL. <http://www.infostat.com.ar>

Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L. M., & Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México, *Polibotánica*, 42, 197–214.

Fiedler, J., Bufler, G., & Bangerth, F. (1998). Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica*, 101(2), 249–255.

Furnier, G. R., Cummings, M. P., & Clegg, M. T. (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity*, 81(3), 183–188.

García, A. (1975). Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae): I. Karyology of seven species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17, 173–180.



Galindo-Tovar, M. E., Arzate-Fernández, A. M., Ogata-Aguilar, N., & Landero-Torres, I. (2007). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 12(2), 325–335.

Galindo-Tovar, M. E., Milagro-Pérez, P. A., Alejandre-Rosas J. A., Leyva-Ovalle, O. R., Landero-Torres, I., Lee-Espinosa, H., & Murguía-González J. (2011). Relaciones genéticas del aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios del centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13, 339–346.

Gama-Campillo, L., & Gomez-Pompa, A. (1992). An ethnoecological approach for the study of *Persea*: A case study in the Maya area. *Proceedings of Second World Avocado Congress II*, California, U.S., 11–17.

Gutiérrez-Díez, A., Martínez-de la Cerda, J., García-Zambrano, E. A., Iracheta-Donjuan, L., Ocampo-Morales, J. D., & Cerda-Hurtado, I. M. (2009). Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(1), 09–18.

Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., Espíndola-Barquera, M. de la C., & Heredia-García, E. (2017). Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. *Frontiers in Plant Science* 8(243), 1–10. doi: 10.3389/fpls.2017.00243

Hair, J. F., Black, B., Babin, B., Anderson, R. E., & Tatham, R. L. (1992). *Multivariate data analysis*. Nueva York: MacMillan 544 p.

International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 1995. *Descriptor for avocado* (*Persea* spp.). International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 52 p.

International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). (2006). *DRAFT avocado* (*Persea americana* Mill). *Guidelines for the conduct of test distinctness, uniformity and stability*. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34 p.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale (*Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44, 223–270.

Kopp, L. (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea-Lauraceae*) *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14(1), 1–120.

López-Guzmán, G., Medina-Torres, R., Guillén-Andrade, H., Ramírez-Guerrero, L. G., Juárez-López, P., & Ruelas-Hernández, P. G. (2015). Caracterización morfológica en genotipos nativos de aguacate (*Persea americana* Mill.) de clima tropical en Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11, 2157–2163.

Popenoe, W. (1935). Origin of the cultivated races of avocados. *California Avocado Association Yearbook*, 20, 184–94.

Meza-Castillo, E., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, J. E., Reyes-Alemán, J. C., Borys, M. W., & Espíndola-Barquera, M. de la C. (2018). Caracterización morfológica e histológica de ápices de raíz de portainjertos de aguacate y su resistencia a factores adversos en el suelo. *Bioagro*, 30(2), 107–116.

Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2014). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 1(1), 1–6.

Page, R. D. M. (2001). TreeView version 1.6.6. Escocia, Reino Unido. Obtenido de [http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod%](http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod%20)

Pavlíček, A., Hrdá, S., & Flegr, J. (1999). FreeTree-freeware program for construction of Phylogenetic trees on the bases of distance data and bootstrap Jacjknife analysis of the tree robustness: Application in the RAPD analysis of genus *Frekeli*. *Folia Biologica*, 45, 97–99.

Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1), 107–112.

Rentaría-Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.) *Ecología molecular* (1a. ed., pp. 541–566), México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.

Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., Simuta-Velázco, L., Barrientos-Priego, A. F., & Gallegos-Vázquez, C. (2013). Distinción de especies del género *Persea* mediante RAPD e ISSR de ADN. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(4), 503–516.

Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., & Barrientos-Priego, A. F. (2016). Assessment of genetic relationship in *Persea* spp. by traditional molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 15(59), 1–11.

Rodríguez-Medina, N., Fuentes-Lorenzo, J. L., Coto-Arbelo, O., Fuentes-Fiallo, V. R., Ramírez-Pérez, I. M., Becker, D., & Velázquez-Palenzuela, B. (2009). Agro-morphologic traits, isoenzyme and DNA markers for estimating the polymorphism levels, discriminating capacity and informativeness in avocado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40(1), 63–74.

Roldàn-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., Van Eijk, M. J. T., & De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties: 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding*, 6(6), 593–602.

Rohwer, J. G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S. A., van der Werff, H., & Li, H. W. (2009). Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *Taxon*, 58(4), 1153–1167.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.

Schieber, E. (1981). Exploring for the “Aguacate de Mico” in Central America. *California Avocado Society, Yearbook*, 65, 49–55.

Schieber, E., & Zentmyer, G. A. (1972). Exploring for *Persea* in Latin America. *Proceedings of 1st. International Tropical Fruit Short Course. The Avocado*. University of Florida, Gainesville, Florida, U.S.A., 16–20.

Schroeder, C. A. (1951). Avocado material for horticultural research. *California Avocado Society, Yearbook*, 36, 107–112.

Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, U.S.A. 573 p.

van der Werff, H. (2002). A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon*, 12, 575–586.

Williams, L.O. (1977). The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subgenus *Persea*. *Economic Botany*, 31(3), 315–320. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02866883>