



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE COLECTAS DE AGUACATE DE LA ZONA
SUR DEL ESTADO DE MÉXICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

**PRESENTA:
MARÍA DEL CARMEN RAMÍREZ MENDOZA**

**DIRECTORES DE TESIS:
Dr. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN
Dr. JAIME MEJÍA CARRANZA**

**ASESOR EXTERNO:
Dra. ERNESTÍNA VALADEZ MOCTEZUMA**

TENANCINGO, ESTADO DE MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2015

DEDICATORIA

A Dios principalmente por darme la oportunidad de enfrentarme a nuevos retos y estar en cada momento en que los realice, por ser ese ser tan especial en mi vida el cual me ha motivado a ser mejor cada día.

A mi Madre por haberme dado la vida, la cual no pudo compartir ya este momento de felicidad y que aunque ya no esté a mi lado estoy segura que donde se encuentre se sentirá feliz de que pude realizar mi sueño de terminar la carrera.

A mi Padre, Hermana, Hermanos y Abuela por su apoyo que me brindaron a lo largo de mi carrera y de la realización de mi trabajo de tesis.

A Oscar quien estuvo todos estos años con migo apoyándome siempre y animándome a seguir adelante cada vez que no encontraba el camino a seguir, porque ha sido una gran persona conmigo y por todo su amor que me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por haberme permitido formar parte de ella.

Al apoyo recibido mediante el programa PROMEP

Al laboratorio de Biotecnología del CUT por haberme permitido llevar a cabo las extracciones de mis muestras.

Al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Reyes Alemán por su apoyo incondicional durante todo el proceso del experimento y por ayudarme a poder concluir este ciclo de mi vida.

Al Dr. Jaime Mejía Carranza por haberme permitido formar parte de este proyecto.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su apoyo en el proceso del experimento en la UACH y por su tiempo que le dedicó a la revisión de mi proyecto.

A la Maestra Brenda Ayala por su apoyo en el proceso de extracción de ADN de los genotipos de interés.

A mi familia por su apoyo durante mi proceso de formación.

A Dios principalmente por ser tan maravilloso y estar con migo en cada momento de mi vida.

A todas las personas que de alguna forma se involucraron en el desarrollo de mi trabajo y aportaron parte de su conocimiento para poder llevarlo a cabo.

RESUMEN

Debido a que la caracterización morfológica es un proceso lento y no tan preciso al existir factores ambientales que pueden alterar la forma de los genotipos de interés, la caracterización molecular es una alternativa que nos permite obtener una mejor descripción del genotipo al basarse en el ADN de las plantas ya que esta no cambia por el ambiente o etapa fenológica.

El presente estudio consistió en analizar molecularmente 36 genotipos del género *Persea* los cuales fueron colectados de algunos municipios de la zona sur del Estado de México, dichos genotipos fueron seleccionados ya que eran sobresalientes a diferentes caracteres como pubescencia de la hoja, tamaño de fruto, calidad comestible y grosor de la cáscara que permitieron considerarlos como colectas de interés. El trabajo operativo consistió de la colecta del material, maceración, extracción del ADN, lavado, cortado, amplificación en PCR y electroforesis utilizando geles de acrilamida con el uso de marcadores RAPD (8) e ISRR (6).

Mediante los perfiles de bandas generados se elaboró una matriz básica de datos para cada marcador y se generaron dendogramas mediante diferentes combinaciones con los métodos de Nei and Li / Dice y Neighbor – joining, Jaccard y UPGMA, Jaccard y Neighbor-joining. Se realizó un remuestreo de 1000 repeticiones en el programa Free Tree y se visualizaron en el programa Tree View. Se seleccionaron dos dendogramas, los que mostraban mayor congruencia entre sus agrupamientos; uno mediante RAPD, otro mediante ISSR y un tercero combinando ambos. Se sabe que los RAPD, generan agrupamientos aleatorios entre genotipos basándose en similitudes (variabilidad), mientras que mediante ISSR se identifican fragmentos más específicos del genoma, siendo estos últimos más útiles para encontrar diferencias entre especies (diversidad). Mediante los dendogramas seleccionados se discutieron las probables relaciones entre los

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de
México

genotipos desde el punto de vista de la variabilidad y diversidad que prevalece en la región sur del Estado de México, su similitud, y se infiere sobre la presencia de probables especies en la región.

Índice de contenido

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
Índice de contenido	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Importancia del aguacate en México	2
2.2 Origen y Distribución	2
2.3 Descripción Botánica y Taxonómica	2
2.3.1 Taxonomía	5
2.3.2 Especies del género <i>Persea</i> reportadas en América	7
2.4 Características de algunas especies del subgénero <i>Persea</i> y del género afín <i>Bleishmiedia</i>	10
2.4.1 <i>Persea nubigena</i>	10
2.4.2 <i>Persea steyermarkii</i>	10
2.4.3 <i>Persea schiedeana</i>	11
2.4.4 <i>Persea floccosa</i>	11
2.4.5 <i>Persea cinerascens</i>	12
2.4.6 <i>Bleishmiedia</i> spp.	12
2.5 Razas del Aguacate de la especie <i>Persea americana</i>	13
2.5.1 <i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	15
2.5.2 <i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	16
2.5.3 <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	17
2.6 Caracterización molecular en plantas	18
2.7 TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES	23
2.7.1 Izoenzimas	23
2.7.2 Microsatélites (SSR)	23
2.7.3 RFLPs-PCR	23
2.7.4 AFLPs	24
2.7.5 Marcadores moleculares tipo RAPD	24
2.7.6 Marcadores moleculares tipo ISSR	25
2.8 Principios de la electroforesis	26
2.9 Cortado del ADN	27
2.10 Experiencias en la manipulación de ADN del género <i>Persea</i> y otras especies.	28
2.10.1 Cronología de estudios sobre biología molecular en aguacate.....	29
2.11 Tendencia mundial en el uso de marcadores moleculares.	32

3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVO GENERAL.....	35
5.1 Objetivos específicos	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1 Esquema general del trabajo.....	36
6.2 Localización de los laboratorios donde se realizó el estudio.	38
6.3 Material vegetal.....	38
6.4 Colecta y traslado de material vegetal	40
6.5 Metodología	41
6.5.1 Maceración y almacenamiento de muestras	41
6.5.4 Purificación y digestión del ADN.....	43
6.5.5 Amplificación del ADN.....	44
6.5.6 Elaboración de geles de acrilamida.....	46
6.5.7 Construcción de dendogramas	47
7. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	49
7.1 Calidad del ADN.....	49
7.2. Cuantificación de ADN.....	50
7.2.3 Cortado del ADN	54
7.3. Polimorfismos generados mediante RAPDs e ISRRs.....	56
7.4 Agrupamiento de genotipos	59
8. CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
IV.- ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de aguacate de la raza mexicana <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	14
Figura 2. Fruto de aguacate de la raza guatemalteca <i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i> ... 14	14
Figura 3. Fruto de aguacate de la raza antillana <i>P. americana</i> var. <i>americana</i>	15
Figura 4. Cortes cohesivos o abruptos de ADN.	28
Figura 5. Cronología de técnicas d caracterización.	33
Figura 6. Secuencia gráfica del proceso operativo del estudio realizado.	36
Figura 7. Franja aguacatera en el Estado de México, con algunos municipios que la comprenden, denotada por puntos verdes.	38
Figura 8. Colecta de hojas de los materiales de interes.	40
Figura 9. Proceso de maceración de las muestras de hojas de aguacate con nitrógeno líquido y conservación del tejido.	41
Figura 10. Concentración de ADN de las muestras del 1 al 12, ilustrándose a las de mayor concentración a los materiales UAEM 4, UAEM 6 Y UAEM 8.	51
Figura 11. Concentración de ADN de las muestras del 13 al 26, ilustrándose a los de mayor concentración a los materiales <i>floccosa</i> , UAEM 21 y UAEM 9.	52
Figura 12. Concentración de ADN de las muestras del 27 al 36, ilustrándose las de mayor concentración a los materiales UAEM 16, Zimatlán, UAEM 2 y UAEM 15.	52
Figura 13. Concentración de ADN de los genotipos usados (ng/ μ L).	53
Figura 14. Gel de acrilamida con 23 muestras de ADN sin cortar "A" y cortado "B" con el primer A 15.	55
Figura 15. Gel de acrilamida con 13 muestras con ADN sin cortar y cortado con el primer A 15.	55
Figura 16. Gel de acrilamida con 33 muestras usando el primer E 14.	57
Figura 17. Gel de acrilamida con 42 muestras usando el primer C 08.	57
Figura 18. Gel de acrilamida mediante ISSR usando el primer (AC) ₈ YG.	58
Figura 19. Gel de acrilamida mediante ISSR usando el primer (GACA) ₄	58
Figura 20. Dendograma con datos RAPD mediante la distancia/matriz de similitud Jaccard y el método de construcción Neighbor joining. (3), generado de los genotipos de aguacate colectados.	61

Figura 21. Dendograma con datos ISSRs mediante la distancia/matriz de similitud Nei Li/Dice- y el método de construcción UPGMA, generado de los genotipos de aguacate colectados..... 62

Figura 22. Dendograma Combinado con datos RAPD e ISSR mediante la distancia/matriz de similitud Nei and Li/Dice- y el metodo de construccion Neighbor joining. (5), generado de los genotipos de aguacate colectados. 63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de los subgéneros de <i>Persea</i> además de <i>Persea americana</i> Mill presentes en America (Kopp, 1966 citado por Barrientos <i>et al.</i> , 2000)	7
Cuadro 2. Comparación de los 5 marcadores moleculares más usados (Tomado de Semagn <i>et al.</i> , 2006).....	20
Cuadro 3. Características de geles comúnmente usados en electroforesis.....	26
Cuadro 4. Cronología de estudios realizados mediante biología molecular en el género <i>Persea</i>	29
Cuadro 5. Técnicas de caracterización molecular actualmente disponibles.	32
Cuadro 6. Descripción de genotipos colectados.	39
Cuadro 7. Primers utilizados para la amplificación específica del ADN en aguacate.	45
Cuadro 8. Reactivos utilizados para PCR en la mezcla Master mix.	45
Cuadro 9. Reactivos utilizados para la elaboración de geles de acrilamida.....	46
Cuadro 10. Clasificación de muestras de acuerdo a su concentración de ADN (ng/μL)....	50
Cuadro 11. Cuadro comparativo de la cantidad de ADN de <i>Persea</i> antes y después del lavado.....	53
Cuadro 12. Concentraciones utilizadas para el cortado del ADN determinadas de acuerdo a la concentración de cada grupo.....	56

1. INTRODUCCIÓN

México forma parte del centro de origen del aguacate junto con otros países de Centroamérica, pero a pesar de la gran diversidad de especies, razas y tipos criollos que existen, con características deseables como producción y comercialización, prevalece prácticamente el monocultivo de la variedad Hass, la cual amenaza con la desaparición de los otros.

Existe confusión acerca de la ubicación taxonómica de especies, razas y variedades de *Persea* debido a su alto grado de hibridación que se ha dado entre ellas, llegándose a una dificultad para ubicarlas taxonómicamente. Su descripción se ha basado en caracteres morfológicos, sin embargo, esta forma de caracterización es limitada por que la expresión de sus genes está sujeta a influencia ambiental, en tanto que la caracterización molecular tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de los individuos, debido a esto al caracterizar germoplasma vegetal resulta relevante realizar una identificación más precisa a través de marcadores moleculares o mediante la combinación de ambos enfoques (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

Las colectas de aguacate que se realizan para su conservación y uso en trabajos de mejoramiento, generalmente son caracterizadas morfológicamente pero poco se sabe acerca de su base genética. En la actualidad se han realizado estudios a nivel de ADN entre individuos del aguacate para conocer las diferencias o similitudes que pudieran llegar a existir, de tal forma que sean un complemento a los marcadores morfológicos en la identificación y descripción de cada individuo colectado como parte de la diversidad genética del género *Persea*.

El presente estudio tuvo por objetivo realizar la caracterización molecular de accesiones de *Persea* colectadas en municipios de la zona sur del Estado de México mediante el uso de marcadores moleculares tipo RAPD e ISSR.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del aguacate en México

En la actualidad el aguacate es uno de los cultivos más importantes en México, país considerado como el mayor productor, consumidor y exportador en todo el mundo, cuyo principal estado productor es Michoacán con la variedad “Hass”. A pesar de su importancia es necesario mayor conocimiento acerca de su amplia diversidad genética, (López-Gómez *et al.*, 2007) manifiesta en híbridos naturales, criollos regionales y ejemplares nativos poco conocidos, la cual contrasta con el uso de casi solo un genotipo cultivado con propósitos comerciales.

2.2 Origen y Distribución

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie arbórea polimórfica, originaria de una amplia zona geográfica, que se extiende desde las sierras centrales y orientales de México y Guatemala, hasta la costa Pacífico de Centro América (Storey *et al.*, 1986).

La información arqueobotánica disponible indica que algunos genotipos antiguos ya se encontraban en las planicies del área que hoy ocupa la Sierra Nevada de California, la cual era un lugar de gran diversidad vegetal, en la que algunos genotipos eran comunes, por lo que es posible que los aguacates más antiguos se hayan originado en la zona de la Sierra Nevada de Estado Unidos (Galindo *et al.*, 2008).

2.3 Descripción Botánica y Taxonómica

El aguacate es una especie polimorfa y por ello muchos caracteres (dimensión de la hoja, tamaño del fruto, coloración del epicarpio, etc.) son variables. De acuerdo

a Calabrese (1992), el aguacate es una especie perenne de tallo aéreo (o epigeo) con características leñosas y follaje siempre verde, su raíz es bastante superficial.

Hojas. Sus hojas son simples, alternas, pecioladas y enteras. El pecíolo tiene de longitud de 1.5 a 3.5 cm. Las hojas de forma variable que van de elíptica- alargada a oval-oblonga, están provistas de yemas axilares y nervadura pinnada (de pluma).

El ápice es más o menos agudo según la raza, la nervadura principal es de color amarillo pálido; dicha nervadura es especialmente prominente en la cara inferior. Cuando la hoja es joven presenta un color rojizo, contenido de pigmentos en las vacuolas y una epidermis pubescente; al llegar a la madurez estas hojas se tornan lisas, coriáceas y de un verde intenso y oscuro (Calabrese, 1992).

La cara superior es glabra mientras que la inferior es ligeramente pubescente. Su superficie presenta numerosos puntos glandulares transparentes. La dimensión de las hojas varía de 5 a 20 cm de longitud y de 3 a 10 cm de anchura. En algunas variedades antes de la floración hay una defoliación de corto tiempo, lo que significa que están vegetando fuera de su hábitat, siendo esta una variedad no apta para la zona.

Parte aérea: Los árboles espontáneos de aguacate pueden alcanzar hasta 20 m de altura, con diámetro de tronco superior a un metro (Calabrese, 1992). Las ramas son abundantes, generalmente delgadas y frágiles por lo que pueden romperse al cargar muchos frutos y/o por la acción del viento (Calabrese, 1992).

Las yemas foliares son apicales o axilares, estas últimas en su mayor parte permanecen en estado latente o se desprenden, de tal forma que el crecimiento del aguacate tiene lugar, la mayor parte de las veces, en las yemas apicales (Calabrese, 1992).

El sistema radicular es corto y débil como la mayoría de las especies arbóreas que tienen su origen en ambientes ricos en agua de lluvia durante el periodo vegetativo. Aunque la mayor parte del sistema radical es superficial y está comprendido en los primeros 50 cm, el aguacate prefiere los suelos profundos y con un drenaje excelente que no permita la proliferación de enfermedades fungosas (Calabrese, 1992).

La raíz del aguacate se caracteriza por tener muy pocos pelos radicales, y la absorción de agua y nutrimentos se realiza principalmente en las puntas de las raíces a través de los tejidos primarios; esto determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad cuando el drenaje es deficiente induciéndose las asfixias radicales y ataques de hongos que pudren los tejidos.

Flor: Las flores son hermafroditas (poseen los dos sexos), actinomorfas (simétricas), de color verde amarillento son pequeñas, de tal forma que en el momento de su apertura suelen medir de 1 a 1.5 cm de diámetro con un pedúnculo corto y pubescente. La inflorescencia (agrupación de flores), es una panícula (racimo de racimos) que puede ser axilar o terminal. Se estiman unas 200 flores por panícula.

La flor consta de un perigonio con dos verticilos trímeros. El androceo está compuesto por 12 estambres insertos por debajo del ovario o alrededor del mismo. De estos estambres solo 9 son funcionales. El gineceo posee un solo pistilo, un ovario súpero (por encima del pedúnculo), unilocular y con un solo óvulo. En la parte superior de la panícula se encuentra una yema vegetativa que luego se desarrolla en rama (a veces se utiliza para injertar: vareta).

El perianto aparentemente carece de corola, pero las piezas que lo constituyen están dispuestas en dos series cada una formada por tres elementos. Las piezas externas son más grandes. Podría tratarse de tres pétalos y tres sépalos muy similares entre sí.

Fruto: Es una baya que posee un pericarpio (delgado, quebradizo), un mesocarpio carnoso (con un porcentaje de grasa que varía de 5 % a 30 %). El peso del fruto es diferente según el tipo ecológico, oscilando entre los 50 gramos a 2.5 kg, la parte comestible es de color amarillo pálido, con una leve cubierta verde adherida al epicarpio. A pesar de las numerosas flores que hay en una inflorescencia, menos del 1% se convierte en fruto (0.01 %). El fruto suele ser asimétrico. Externamente, la epidermis está recubierta de una ligera capa de cera y es más o menos rica en lenticelas amarillentas dependiendo del cultivar (Calabrese, 1992).

La semilla es de tamaño grande, durante la maduración del fruto puede separarse de la pulpa o germinar al interior del mismo, suele ser monoembrionica. A veces puede ser observada en la germinación de una semilla, la brotación de más de un tallo, no se trata de plantas provenientes de distintos embriones sino de ramificaciones formadas en la base de las dos mitades de la semilla. Su forma es variada, pudiendo ser: periforme, esférica u ovalada, su color varía de crema a café rojizo.

2.3.1 Taxonomía

La primer clave de identificación taxonómica completa para el género *Persea* (*Familia* Lauracea; orden ranales) fue desarrollada por Lucille Kopp en (1966), quien determinó que el aguacate pertenece al género *Persea*, el cual cuenta con alrededor de 85 especies, la mayoría distribuida desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*). Son excepciones *Persea indica* que se encuentra en las Islas Canarias (España) y otras especies del sur de Asia cuya inclusión al género *Persea* aún no está definida (Cuadro 1). Dicho género fue dividido en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodhapne* cuya principal forma de distinción entre los dos es la pubescencia de la cara interior de los sépalos; el subgénero *Persea* tiene ambas caras pubescentes, con la excepción de *P. pallida*, *P. rigens* y *P. cinerascens*. En tanto que el subgenero *Eriodhapne* tiene la cara interna sin pubescencia. El subgénero *Eriodaphne* comprende a los aguacatillos que son frutos diminutos de alrededor de

1 a 2 cm de diámetro sus hojas son lanceoladas que al estrujarse tienen un fuerte olor a alcanfor o laurel, este subgénero no es compatible sexualmente con *Persea*, sin embargo se han reportado excepciones recientes (Barrientos *et al.*, 2007).

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

El subgénero *Persea* se conoce como el de los verdaderos aguacates, cuyos frutos son de mayor tamaño que los del subgénero *Eriodhapne*. De acuerdo a Scora & Bergh (1992) en el subgénero *Persea* se reconocen tres especies; *P. schiedeana* Nees, *P. parvifolia* Williams y *P. americana* Miller (Mill); sin embargo, de acuerdo con Barrientos *et al.* (2007), también se incluyen las especies *Persea nubigena* (aguacate de monte), *Persea steyermarkii* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (chinini, chinene, chenene, yas, hib) y *Persea floccosa* (aguacate cimarrón).

Persea americana también clasificada como *Persea gratisima* por Gaertner (1805), es una especie poliforme constituida por varios taxones separados, considerados variedades botánicas o subespecies descritas como razas hortícolas, que en resumen su taxonomía de acuerdo con Cronquist (1981), es la siguiente:

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Lurales
Familia	Lauráceas
Género	<i>Persea</i>

2.3.2 Especies del género *Persea* reportadas en América

En México existen al menos 20 diferentes especies relacionadas con el género *Persea* y cerca de 80 reportadas en toda América (Cuadro 1). Ubicadas de acuerdo a la variabilidad de condiciones ambientales, su naturaleza les ha conferido mecanismos que han maximizado su cruzamiento y variabilidad genética (Bergh, 1992).

Cuadro 1. Especies de los subgéneros de *Persea* además de *Persea americana* Mill presentes en America (Kopp, 1966)

País (número de especies)	Especie del subgénero <i>Persea</i>	Especie del subgénero Eriodhapne
México (20)	<i>Persea floccosa</i> Mez (1889) (Veracruz, Puebla, Oaxaca, Chiapas). <i>Persea steyermarkii</i> Allen (1945) (Chiapas). <i>Persea nubigena</i> Willians (1977), Koop (1966) (Chiapas) <i>Persea schiedeana</i> C.G. Nees (1836) (Veracruz, Tabasco, Chiapas). <i>Persea</i> sp. (aún no clasificada, Motozintla, Chiapas)	<i>Persea cinerascens</i> (Veracruz, Michoacán). <i>Persea borbonia</i> (Tamaulipas, México). <i>Persea palustris</i> (Tamaulipas, San Luis Potosí). <i>Persea longipes</i> (Veracruz). <i>Persea standleyi</i> (Chiapas). <i>Persea sessilis</i> (Oaxaca). <i>Persea podadenia</i> (Sonora, Chihuahua, Durango, Jalisco). <i>Persea hintonii</i> (Sinaloa, Nayarit, Edo. de México, Guerrero). <i>Persea chamissonis</i> (Hidalgo, Puebla). <i>Persea purpusii</i> (San Luis Potosí). <i>Persea vesticula</i> (Chiapas). <i>Persea donnell-smithii</i> (Chiapas). <i>Persea liebmanni</i> (Oaxaca, Chiapas, San Luis Potosí). <i>Persea pachypoda</i> (Tamaulipas, Guanajuato). <i>Persea parvifolia</i> L.(Willians, 1977) (Veracruz)
Brasil (18)		<i>Persea alba</i> <i>Persea obovata</i> <i>Persea fuliginosa</i> <i>Persea fulva</i> <i>Persea rigida</i> <i>Persea venosa</i> <i>Persea pyrifolia</i> <i>Persea pyrifolia</i> <i>Persea microphylla</i> <i>Persea major</i> <i>Persea pedunculosa</i> <i>Persea rufotomentosa</i>

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

		<i>Persea pseudofasciculata</i>
		<i>Persea caesia</i>
		<i>Persea splendens</i>
		<i>Persea aurata</i>
		<i>Persea punctata</i>
		<i>Persea fusca</i>
Venezuela (13)	<i>Persea steyermarkii</i>	<i>Persea rigens</i>
		<i>Persea caerulea</i>
		<i>Persea subcordata</i>
		<i>Persea jenmani</i>
		<i>Persea mutisii</i>
		<i>Persea meridensis</i>
		<i>Persea hexathera</i>
		<i>Persea fastigiata</i>
		<i>Persea grandiflora</i>
		<i>Persea benthamiana</i>
		<i>Persea nivea</i>
		<i>Persea maguirei</i>
Colombia (13)	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea caerulea</i>
		<i>Persea cuneata</i>
		<i>Persea chrysophylla</i>
		<i>Persea subcordata</i>
		<i>Persea costata</i>
		<i>Persea mutisii</i>
		<i>Persea sericea</i>
		<i>Persea ferruginea</i>
		<i>Persea hexathera</i>
		<i>Persea fastigiata</i>
		<i>Persea cuatrecasaii</i>
		<i>Persea bernardii</i>
Perú (13)		<i>Persea caerulea</i>
		<i>Persea stricta</i>
		<i>Persea haenkeana</i>
		<i>Persea hirta</i>
		<i>Persea subcordata</i>
		<i>Persea boldufoia</i>
		<i>Persea corymbosa</i>
		<i>Persea ruizii</i>
		<i>Persea ferruginea</i>
		<i>Persea peruviana</i>
		<i>Persea hexathera</i>
		<i>Persea raimondii</i>
		<i>Persea weberbaueri</i>
Guatemala (10)	<i>Persea nubigena</i>	<i>Persea rigens</i>
	<i>Persea steyermarkii</i>	<i>Persea standleyi</i>
	<i>Persea tolimanensis</i>	<i>Persea sessilis</i>

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

	<i>Persea zentmyerii</i>	<i>Persea vesticula</i>
	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea donnell-smithii</i>
Costa Rica (10)	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea povedae</i>
	<i>Persea</i> sp. (aún no clasificada, Monte Verde)	<i>Persea pallida</i>
		<i>Persea caerulea</i>
		<i>Persea longipes</i>
		<i>Persea veraguasensis</i>
		<i>Persea brenesii</i>
		<i>Persea silvatica</i>
		<i>Persea albida</i>
Ecuador (9)		<i>Persea rigens</i>
		<i>Persea bullata</i>
		<i>Persea subcordata</i>
		<i>Persea mutisii</i>
		<i>Persea brevipes</i>
		<i>Persea sericea</i>
		<i>Persea conferta</i>
		<i>Persea ferruginea</i>
		<i>Persea campii</i>
Bolivia (8)		<i>Persea buchtienii</i>
		<i>Persea caerulea</i>
		<i>Persea bilocularis</i>
		<i>Persea haenkeana</i>
		<i>Persea subcordata</i>
		<i>Persea peruviana</i>
		<i>Persea pseudofasciculata</i>
		<i>Persea trollii</i>
Honduras (5)	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea caerulea</i>
		<i>Persea longipes</i>
		<i>Persea vesticula</i>
		<i>Persea donnell-smithii</i>
Panamá (4)	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea rigens</i>
		<i>Persea veraguasensis</i>
		<i>Persea obtusifolia</i>
Puerto Rico (2)		<i>Persea krugii</i>
		<i>Persea urbaniana</i>
Haití (2)		<i>Persea anómala</i>
		<i>persea krugii</i>
Cuba (2)		<i>Persea hypoleuca</i>
		<i>Persea anómala</i>
Guyana Británica (2)		<i>Persea jenmani</i>
		<i>Persea nívea</i>
El Salvador (2)	<i>Persea steyermarkii</i>	
	<i>Persea schiedeana</i>	
USA (2)		<i>Persea borbonia</i>
		<i>Persea palustris</i>

Chile (2)	<i>Persea lingue</i>
	<i>Persea meyeniana</i>
Rep. Dominicana (1)	<i>Persea krugii</i>
Sto Domingo 1	<i>Persea oblongifolia</i>
Dominica 1	<i>Persea urbaniana</i>
Isla de Gpe 1	<i>Persea urbaniana</i>
Montserrat 1	<i>Persea urbaniana</i>
Santa Lucía 1	<i>Persea urbaniana</i>
Martinica 1	<i>Persea urbaniana</i>
Nicaragua 1	<i>Persea caerulea</i>
Guyana Fran. 1	<i>Persea nivea</i>
Surinam 1	<i>Persea nivea</i>
Jamaica 1	<i>Persea alpigena</i>
Sin definir (7)	<i>Persea angustifolia</i>
	<i>Persea ayui-y</i>
	<i>Persea intermedia</i>
	<i>Persea nitens</i>
	<i>Persea racemosa</i>
	<i>Persea sylvestris</i>
	<i>Persea yacupeti</i>

Tomado de Barrientos e. al., 2000.

2.4 Características de algunas especies del subgénero *Persea* y del género afín *Bleishmiedia*.

2.4.1 *Persea nubigena*

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

2.4.2 *Persea steyermarkii*

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

2.4.3 *Persea schiedeana*

Son árboles de hasta 30 m de altura, de copa ancha, ramillas gruesas, rugosas cerca de las cicatrices de las hojas y de las brácteas de las yemas, con densas pilosidades ferruginosas.

Hojas: Coriáceas a subcoriáceas, con limbos de 8 a 35 cm de largo por 4 a 25 cm de ancho, generalmente elípticas a abovadas, de ápice redondeado a obtuso y base obtusa a redondeada, con superficie adaxial glabra y superficie abaxial con pilosidad ferruginosa, moderada a densa, especialmente en las hojas jóvenes; hojas con 6 a 15 pares de venas secundarias, divergentes entre 40 y 70°, muy marcadas en la superficie abaxial; pecíolos de 2 a 5 cm de largo, delgados con densa pilosidad ferruginosa.

Flor: Inflorescencia subterminal tirsoide, múltiple, rodeada de brácteas de yemas con bordes irregulares y ancha. Flores de 6 a 10 mm de longitud, tomentosas, filamentos del primer y segundo verticilo de color marrón, tomentosos y del tercer verticilo densamente tomentosos.

Fruto: Uno a dos frutos terminales por rama, de forma variable que puede ser alargada, periforme o casi redonda, alcanzando entre 5 a 10 cm de largo en la madurez, con pubescencia que persiste durante la etapa de fructificación; exocarpo de menos de 3 mm de grosor, de color verde claro u oscuro, amarillento, marrón, negro o morado, la semilla varía de esférica a ovada y normalmente es de gran tamaño (Whiley *et al.*, 2007).

2.4.4 *Persea floccosa*.

Son árboles de hasta 30 m de altura; ramillas que van de poco a densamente tomentosas de color marrón, gruesas y lenticeladas. Hojas coriáceas a subcoriáceas, ovadas a elípticas o subrotundas, con limbos de 6 a 16 cm de largo por 3 a 14 cm de ancho, con 6 a 8 pares de venas divergentes a 40 o 50 °.

Flores: van de 4 a 5 mm de largo, de color marrón, tomentosas en ambos lados; estaminadas de 2 a 3 mm de largo, con filamentos de los verticilos I, II y III, densamente tomentosos.

Fruto: Dos a cuatro frutos terminales por rama, de 4 a 7 cm de largo subglobosos, con cascara de más de 4 mm de grosor, lenticelada y de color verde oscuro; semilla grande y esferoidal.

Especie poco común de la montaña, está emparentada con la var. *drymifolia* y la var. *nubigena*. Se diferencia de ambas por la pubescencia floccosa de sus brotes y hojas nuevas y por los frutos pequeños y más subglobosos de cerca de 5 cm de largo, con un exocarpo delgado y verde (Whiley *et al.*, 2007).

2.4.5 *Persea cinerascens*.

En la región de Tacámbaro, Michoacán, se le conoce con el nombre de canelillo, se han encontrado ejemplares de hasta 20 m de altura, pero su tamaño normal es de 6 a 8 m, tiene un olor característico a canela en la madera y en las hojas al ser frotadas. El pedúnculo de la infrutescencia es de 7 a 10 cm de longitud, con 20 y en algunos casos hasta de 30 frutos. Los segmentos del perianto son persistentes a la madurez, y fácilmente observables; los frutos son baciformes, ligeramente elípticos: 0.9 X 1.2 cm de mesocarpio carnosos y ligero sabor a aguacate, el epicarpio es de color violeta en la madurez y el embrión es muy pequeño, es incompatible con las variedades Fuerte y Hass (García, 1970).

2.4.6 *Beilschmiedia spp.*

El género *Beilschmiedia* es representado en México por *B. americana*, *B. anay*, *B. mexicana*, *B. ovalis*, *B. pendula*, *B. schiedeana*, *B. steyermakii*. El fruto de *Beilschmiedia anay* es de forma obovada, de color verde y negro, la epidermis del

tipo verde es relativamente gruesa (0.4 mm) y el negro de piel delgada, lo que impide su separación de la pulpa, ambos producen frutos de similar tamaño, de piel brillante y atractivo (Borys *et al.*, 1993)

2.5 Razas del Aguacate de la especie *Persea americana*.

La especie *Persea americana* es la más ampliamente distribuida y utilizada ya que sus razas e híbridos han sido mundialmente utilizados para el consumo humano. Kopp (1966), consideró tres grupos de aguacates dentro de esta especie, denominándolos: *P. americana* var. *drymifolia* (conocido como aguacate mexicano, *P. americana* var. *guatemalensis* (los tipos guatemaltecos) y *P. americana* var. *americana* (antillanos), los tres grupos pertenecientes a *Persea americana* Mill., una característica de esta especie es su pronunciada pubescencia en tallos, hojas y flores (Schroeder, 1974). Estos grupos hortícolas se conocen como razas de aguacate; Mexicana, Guatemalteca y Antillana distribuidas ampliamente en todo América. La clasificación botánica de estas razas ha sido variada, algunos indican a la raza Mexicana como a una especie por separado; *Persea drymifolia* (Kopp, 1966), otros como Williams (1977) clasificó a la raza guatemalteca como *Persea nubigena* var. *Guatemalensis*, sin embargo, actualmente se considera a las tres razas dentro de la especie *Persea americana* Mill. Bergh y Ellstrand (1987) hicieron una clasificación muy acertada de las razas de aguacate, agrupando a la raza mexicana como la variedad botánica *drymifolia* (*Persea americana* var. *drymifolia*) (Figura 1), la raza guatemalteca como la variedad *guatemalensis* (*Persea americana* var. *guatemalensis*) (Figura 2) y la raza antillana como la variedad *americana* (*Persea americana* var. *americana*) (Figura 3). Por otra parte Bergh (1992), indicó que las tres razas de aguacate son genéticamente equidistantes de acuerdo con un análisis de marcadores genéticos de ADN mediante la técnica de RAPD (amplificación polimórfica de ADN genómico) por Blufer y Fiedler (1966) y análisis citogenéticos en diferentes especies (García, 1975).



Figura 1. Fruto de aguacate de la raza mexicana *P. americana* var. *drymifolia*.



Figura 2. Fruto de aguacate de la raza guatemalteca *P. americana* var. *guatemalensis*.



Figura 3. Fruto de aguacate de la raza antillana *P. americana* var. *americana*.

2.5.1 *Persea americana* var. *guatemalensis*.

De acuerdo con Williams (1977), esta raza o variedad botánica presenta las siguientes características: árboles de hasta 30 metros de altura; de ramillas escasamente tomentosas.

Hojas: Subcoriáceas, con limbos de 8 a 20 cm de largo y 10 a 24 cm de ancho, ovales, ovoides u oblongas; ápices acuminados, obtusos o redondeados, bases acuminadas, superficie adaxial moderadamente pubescente; superficie abaxial, pubescente especialmente en la nervadura central.

Flores: De 3 a 7 mm de largo, tomentosas de color marrón; estámenes de 2 a 3 mm de largo, con filamentos pubescentes en el primer y segundo verticilo.

Fruto: Dos a cuatro frutos terminales por rama, de 10 a 18 cm de largo, oblatos a ligeramente periformes, con cáscara de más de 4 mm de espesor, de color verde

claro, verde oscuro o marrón a negro; semilla pequeña, esferoidal, de superficie suave.

Esta raza se encuentra distribuida en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, Veracruz y en Centroamérica en Guatemala, donde el clima es tropical o cálido de 22 °C en adelante o subtropical o semi-cálido de 18 °C a 22 °C, comprendido entre los 32° y 34° de latitud norte o sur y una altitud entre los 500 y 1100 m . 1100 m, sin grandes variaciones de una estación a otra con una precipitación pluvial de 1200 mm como mínimo, esta especie prefiere un clima regular en todas las estaciones, sin variaciones importantes del paso de una estación a otra en cuanto a temperatura con una media invernal de 15 °C sin descender a menos de 1 °C; debajo de -2.3 °C se manifiestan daños a los tejidos. Este grupo ecológico necesita un régimen de lluvia continuo sin que haya periodos prolongados de sequía.

2.5.2 *Persea americana* var. *americana*.

Whiley *et al.* (2007), indica que estos árboles tienen hasta 30 m de altura, con ramillas ligeras a moderadamente pubescentes, con pilosidades de color marrón a ferruginoso. Hojas: Coriáceas, angostas o elípticas, con limbos de 10 a 30 cm de largo por 3 a 19 cm de ancho, de ápices acuminados.

Flores: De 3 a 6 mm de largo, de color verde amarillentas, densamente tomentosas en ambas superficies.

Fruto: Produce 1- 3 frutos terminales por rama, de 10- 25 cm de largo, de forma periforme anchos o estrechos, exocarpo verde claro o verde oscuro, marrón a morado, la pulpa es de color marfil; la semilla es ovada, variable en tamaño y con superficie áspera.

El clima tropical es el propicio para esta raza, sin variaciones en el paso de las estaciones, su precipitación pluvial va de 1800 a 2000 mm anuales como mínimo. Su latitud está dentro de los 32° de latitud norte o sur. La altitud está entre los 0 y

500 msnm. Las variedades comprendidas dentro del grupo ecológico antillano exigen temperatura media anual superior a los 22 °C el invierno es inexistente y la temperatura media en el año no debe descender los 16 °C. Esta raza se encuentra distribuida en las regiones tropicales de México tanto en las costas del Atlántico como del Pacífico, así como en Centroamérica.

2.5.3 *Persea americana* var. *drymifolia*.

Corresponde a árboles de hasta 15 m de altura, con ramillas escasas a moderadamente pubescentes, con pilosidades pálidas de color marrón.

Hojas: De color verde oscuras, aromáticas al igual que la corteza (su intenso olor a anís las convierte en un elemento útil en la gastronomía de algunas regiones), con limbos de 5- 20 cm de largo por 3- 12 cm de ancho, elípticas con ápices agudos, raramente acuminadas.

Flores: Son regulares, estámenes de 2-3 mm de largo, filamentos pubescentes en el primer y segundo verticilo; Fruto: Con 3-6 frutos terminales por rama, de 4-12 cm de largo, ovoides o anchos y periformes; exocarpo delgado de color verde oscuro, marrón, morado o negro; pulpa con olor a anís, semilla grande, ovada de superficie lisa.

Se encuentra distribuido en las laderas orientales de las sierras altas mexicanas y en la cadena montañosa del sur, a altitudes sobre los 1000 m. en climas cálidos, húmedos a semiáridos, tanto en suelos fértiles como pobres y ácidos. Su ambiente ideal es el clima subtropical o templado-cálido, de invierno benigno con raras heladas, con los meses de invierno a primavera sin lluvias y con lluvias regulares de verano a otoño. La precipitación pluviométrica debe ser de un mínimo 800 mm. Tiene un rango del ecuador hasta los 35 a 36 ° Latitud norte sur, una altitud entre los 1000 y 1800 m de altura sobre el nivel del mar. Prefiere las temperaturas medias anuales de 18 °C a 22 °C. La temperatura media en invierno no debe descender menos de - 4 °C, pues comienza a sufrir daños

orgánicos irreversibles cuando la temperatura desciende más allá de los -6.7°C . Prefiere un ambiente atmosférico semi-seco, por lo que obliga a seleccionar áreas geográficas cuyo régimen pluvial este bien definido, lluvias en verano a otoño y sequía relativa en invierno y primavera, los vientos violentos ocasionan defoliación, caída de flor y fruto causando también desgajamientos si éstos son muy fuertes.

2.6 Caracterización molecular en plantas

En cuanto a la descripción de las plantas, la manera tradicional es por caracterización fenotípica (morfológica), procedimiento lento y limitado, donde la expresión de los caracteres cuantitativos está sujeta a fuerte influencia ambiental, por lo que con el empleo de marcadores moleculares se elimina este efecto ya que identifica y estudia la diversidad genética considerando el genoma de la planta de aguacate, a través de marcadores moleculares (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

De acuerdo con Hidalgo (2003), el objetivo particular de la caracterización molecular es la identificación de especies y/o cultivares, así como la evaluación de la diversidad y/o de la variabilidad genética, el estudio de la estructura genética de las poblaciones, el establecimiento de la representatividad de colecciones regionales, la detección de duplicidades de accesiones de bancos de germoplasma, la identificación de genes o secuencias específicas, entre otros.

De acuerdo con Valadez y Kahl (2000), un marcador molecular es cualquier tipo de molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirva para monitorear o calibrar la separación de las mismas, utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético, como cualquier gen cuya expresión permita un efecto fenotípico que pueda ser detectado fácilmente.

Para Karp y Edwards (1998), los marcadores de ADN se basan en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias de ADN entre individuos. Las técnicas

empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante.

Los datos moleculares tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de la mayoría de los caracteres morfológicos solamente se asume, de esta forma los diferentes tipos de marcadores como se observa en el Cuadro 2, se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y si son de tipo dominante o codominante (Rentarías, 2005).

Cuadro 2. Comparación de los 5 marcadores moleculares más usados (Tomado de Semagn *et al.*, 2006).

	RFLP	Micro satélite	RAPD	AFLP	ISSR
Abundancia genómica	Alto	Medio	Muy alto	Muy alto	Medio
Parte de genoma examinado	Baja copia de regiones codificadas	Genoma entero	Genoma entero	Genoma entero	Genoma entero
Cantidad de ADN requerido	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Bajo
Tipo de polimorfismo	Cambios de base individual Inserción/ Delección	Cambios en longitudes de repeticiones	Cambios de base individual Inserción/ Delección	Cambios de base individual Inserción/ Delección	Cambios de base individual Inserción/ Delección
Nivel de polimorfismo	Medio	Alto	Alto	Muy alto	Alto
Efecto múltiple de proporción	Bajo	Medio	Medio	Alto	Medio
Índice de marcador	Bajo	Medio	Medio	Alto	Medio
Herencia	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Dominante
Detección de alelos	Si	Si	No	No	No
Facilidad de uso	Labor intensiva	Fácil	Fácil	Difícil de iniciar	Fácil
Reproducibilidad (fiabilidad)	Alto	Alto	Intermedia	Alto	Medio a alto
Tipo de sonda/ primers	Baja copia genómica de ADN o clones cADN	Secuencia específica de repetición de ADN	Usualmente 10 pb Nucleótidos hechos al azar	Secuencia específica	Secuencia específica repetición de ADN

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

Clonación y/o secuenciación	Si	Si	No	No	No
Detección radioactiva	Si usualmente	No	No	Si/no	No
Desarrollo/presenta alto costo	Alto	Alto	Bajo	Medio	Medio
Utilidad para cartografía genética	Especies específicas	Especies específicas	Cruzas específicas	Cruzas específicas	Cruzas específicas
Propiedad posición correcta	No	No (algunos son licencias)	Licencia	Licencia	No

La mayoría de los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías de técnicas que se basan en la hibridación o en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); los marcadores identificados por amplificación del ADN están basados en la PCR. Esta técnica permitió desde su desarrollo nuevas posibilidades para la detección de polimorfismos genéticos. El polimorfismo se observa debido a que la variación en la secuencia del gen, altera los sitios de reconocimiento del iniciador (“primer” “oligonucleótido” o “cebador”), permitiendo la generación de grandes números de marcadores, utilizando cantidades mínimas de material genético. Los marcadores de PCR emplean iniciadores de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica (Watson *et al.*, 1992; Velasco, 2005).

Según Torres y Baca (1995), la técnica de PCR permite producir un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica (amplificación), sin recurrir a la clonación. Al final del proceso se obtendrán dos moléculas de ADN, cada una de ellas formada por una cadena original y una cadena complementaria que ha sido sintetizada. La enzima que realiza este proceso se denomina ADN polimerasa. La PCR contribuye al conocimiento de la variabilidad de grupos de organismos, ya que al diseñar oligonucleótidos adecuados, esta será evidente en el análisis del resultado de la amplificación.

Todo organismo contiene información almacenada en el ADN de todas las células de su genoma en subunidades llamadas genes. Cada gen contiene la información necesaria para que la célula sintetice una proteína, así, el genoma va a ser el responsable de las características del individuo (Obeso, 2010).

La carga genética de un determinado organismo no puede ser idéntica a la de otro, aunque se trate de la misma especie, pero en rasgos generales debe ser similar para que la reproducción se pueda concretar, una de las propiedades más importantes del ADN gracias a la cual fue posible la evolución, es la de dividirse y fusionarse con el ADN de otro individuo de la misma especie para lograr diversificación de su descendencia (Obeso, 2010).

2.7 TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

Existen distintos tipos de marcadores moleculares los cuales tienen ventajas y desventajas por lo que cada uno de ellos tiene diferentes objetivos en la caracterización molecular, por lo cual se hace referencia a algunos de ellos.

2.7.1 Izoenzimas

La aplicación de las izoenzimas está dirigida a la cuantificación de heterocigosis, diversidad genética, diferenciación genética y otras medidas de variación genética intra e interpoblacional, han sido utilizadas para evaluar y entender aspectos de biología evolutiva como las relaciones entre fenotipo y ambiente (Rentarías, 2005).

2.7.2 Microsatélites (SSR)

Estos han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a que, tienen el más alto grado de polimorfismo, segregan de manera mendeliana y son codominantes, por su parte la presencia de un sólo locus genético por microsatelite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar. Son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, por lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo (Rentarías, 2005).

2.7.3 RFLPs-PCR

El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) fue el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales. Los RFLPs se han usado generalmente para construir mapas genéticos, para la clonación de genes basados en mapas y para ayudar a resolver problemas taxonómicos y filogenéticos.

Unas de las desventajas que tienen estos marcadores es el requerimiento de grandes cantidades de ADN de buena calidad para la detección de loci de copias únicas, requiere de muchas manipulaciones y sólo detecta una fracción de la variabilidad en el genoma por lo que su información es limitada (Rentarúa, 2005).

2.7.4 AFLPs

Conocidos como polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados, son la técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, normalmente MseI que reconoce 4 pares de bases (pb) y EcoRI que corta 6 pb dentro de una secuencia, esta técnica detecta múltiples loci polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo. Una de sus ventajas es que no requiere información previa de la secuencia para su análisis.

Produce gran cantidad de bandas polimórficas, las bandas observadas en los geles de AFLPs son clasificadas como presencia o ausencia de cada individuo y el análisis de estas se desarrolla como un sistema dominante recesivo.

2.7.5 Marcadores moleculares tipo RAPD

De acuerdo a la clasificación de los tipos de marcadores observados en el Cuadro 2, se describe con mayor detalle a los marcadores tipo RAPD e ISSR debido a que estos fueron los utilizados en la presente investigación.

La Tecnología RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) comprende la amplificación simultánea de varios loci anónimos en el genoma utilizando para ello “primers” de secuencia arbitraria. Los RAPD son ampliamente empleados en análisis genómicos de individuos y poblaciones, debido a que estos marcadores permiten detectar un mayor porcentaje de loci polimórficos que las aloenzimas. Otras ventajas que presentan estos marcadores es que no se necesita del conocimiento previo de la secuencia del ADN para poder aplicarlos, sin embargo

una de las limitantes del empleo de esta técnica, es el bajo contenido de información genética por locus que genera (Nieto *et al.*, 2005).

De igual forma Rentarías (2005), comenta que los RAPD son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN, basándose en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de los pb (pares de bases) a lo largo del genoma. Son útiles en la elaboración de mapas genéticos en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional. Los marcadores tipos RAPD son dominantes y amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación altos.

2.7.6 Marcadores moleculares tipo ISSR

Los ISSR son marcadores moleculares conocidos como (secuencias repetidas intersimples), son similares a los RAPD, en los ISSR el iniciador es un di o trinucleotido repetido. Los métodos que se utilizan en la electroforesis de ISSR son gel de agarosa visualizados con bromuro de etidio y geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 1000 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSR consiste de la presencia o ausencia de los productos amplificados comparada con los iniciadores de los RAPD, la secuencia de los ISSR usualmente es larga lo que resulta en una mayor reproducibilidad de las bandas (Rentarías, 2005).

Reyes (2008), al trabajar con marcadores moleculares en el cultivo de aguacate comenta que los RAPD pueden ayudar a elucidar la variación genética de todo el subgénero *Persea*, ya que se ha demostrado la detección de fragmentos monomórficos específicos para cada especie de *Persea*, lo cual no se ha encontrado con los ISSR. Pero en el caso de los ISSR lejos de mostrar la variabilidad genética, se refleja la cercanía entre los individuos analizados; tiende a proporcionar mayor cantidad de fragmentos monomórficos. Los marcadores ISSR son particularmente útiles para el estudio de individuos relativamente cercanos que exhiben bajos niveles de polimorfismos y se han utilizado

exitosamente como una buena alternativa para obtener la huella genética y análisis genético en especies frutales.

2.8 Principios de la electroforesis

Son varias las técnicas para estudiar la estructura del ADN, pero la electroforesis es posiblemente la más usada en el laboratorio debido a que es una técnica efectiva, bastante fácil de hacer y relativamente económica. Con esta técnica se separan macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) a través de un flujo de corriente eléctrica (Watson *et al.*, 1992).

Los fragmentos de una molécula de ADN cortada con enzimas de restricción se separan a través de la electroforesis de acuerdo a las siguientes características:

- a) El tamaño de la molécula o masa.
- b) La forma o conformación del ADN (ej. ADN súper-enrollado vs. ADN lineal).
- c) El tamaño de los poros del gel.
- d) La magnitud de la carga eléctrica neta de la molécula.

Para llevar a cabo la electroforesis, se utiliza un gel que puede estar hecho de agarosa o poliacrilamida. En el Cuadro 3 se muestran las características de ambos geles:

Cuadro 3. Características de geles comúnmente usados en electroforesis.

AGAROSA	POLIACRILAMIDA
1. Polisacáridos extraídos de algas.	1. Los geles de poliacrilamida son generados al mezclarse polímeros de acrilamida y bisacrilamida.
2. No tóxico	2. Tóxico.
3. Se puede variar el tamaño de los poros ajustando la concentración de agarosa.	3. El tamaño de los poros depende de la concentración de acrilamida y bisacrilamida.

- | | |
|---|---|
| 4. Separa fragmentos de ADN de 200 a 50,000 pb. | 4. Usado para fragmentos de ADN de menos de 500 pb. |
| | 5. Usado para separar mezclas de proteínas. |
-

En el desplazamiento durante la electroforesis, la muestra en el gel se realiza de la siguiente manera: Los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos del ADN son ionizados y migran al electrodo positivo (ánodo) cuando se colocan en presencia de un campo eléctrico. La carga neta del ADN es negativa (por la presencia de los grupos fosfatos), lo que permite que migre del electrodo negativo (cátodo) al electrodo positivo (ánodo) (Watson *et al.*, 1992).

Los fragmentos de ADN migrarán a una razón inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño o peso molecular. A mayor tamaño, menor será la migración del fragmento y a menor tamaño mayor será la migración del fragmento. El movimiento de los fragmentos de ADN va a producir un patrón de bandas, donde cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño particular. El tamaño de cada fragmento puede ser calculado utilizando un marcador de peso molecular cuyos fragmentos y sus pesos moleculares son conocidos. El marcador sirve de referencia y migrará paralelo a las bandas de ADN que se analizan. En ocasiones para generar más polimorfismos visualizados después de la electroforesis se recomienda el cortado del ADN mediante enzimas de restricción.

2.9 Cortado del ADN

Dado que la molécula del ADN es muy grande, es más difícil trabajar con toda la hebra, por lo que se puede trabajar cortando la molécula mediante enzimas de restricción que permitiría obtener mayor nitidez del ADN durante la separación: Al cortar el ADN, las enzimas de restricción pueden producir dos tipos de cortes: los cohesivos (o pegajosos) y los abruptos. Los cortes cohesivos o pegajosos cortan a

manera escalonada, mientras que los cortes abruptos cortan a las dos cadenas del ADN en el mismo lugar como se observa en la Figura 4.

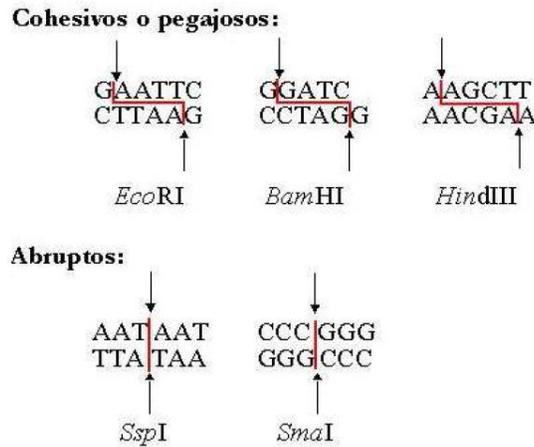


Figura 4. Cortes cohesivos o abruptos de ADN.

2.10 Experiencias en la manipulación de ADN del género *Persea* y otras especies.

En la técnica de extracción de ADN, Ramírez *et al.* (2004), reportan aislamiento del ADN genómico de aguacate con suficiente calidad para ser usado en tecnologías de marcadores moleculares basadas en PCR; probaron diferentes protocolos de extracción y purificación del ADN en cuatro frutales tropicales: guayabo (*Psidium guajava* L.), aguacatero (*Persea americana* Mill.), mango (*Mangifera indica* L.) y cocotero (*Cocos nucifera* L.).

El protocolo de Doyle y Doyle (1990), logró buenos rendimientos y calidad del ADN para la amplificación de PCR en mango y cocotero, pero no en guayaba y aguacatero. Las modificaciones del método CTAB, permitieron la extracción exitosa del ADN con la calidad suficiente para aplicar las técnicas de AFLP, SSR e ISSR, en guayabo y aguacatero con diferentes marcadores.

Lavi *et al.* (1991), trabajaron con huellas genómicas en aguacate, realizaron el aislamiento del ADN de hojas jóvenes mediante el método de Murray y Thompson, (1980) que es una modificación al método del CTAB.

Gutiérrez-Díez *et al.* (2009), al realizar estudios sobre la diversidad genética del aguacate nativo de Nuevo León, hizo la extracción del ADN foliar por el método del ruptor celular con el kit Fast® (Qbiogene, Inc., CA) determinando la calidad del ADN en geles de agarosa.

2.10.1 Cronología de estudios sobre biología molecular en aguacate.

En el Cuadro 4 se muestra una secuencia cronológica de los estudios recientes en aguacate.

Cuadro 4. Cronología de estudios realizados mediante biología molecular en el género *Persea*.

Autores	Temática	Conclusiones
Buffler y Fiedler (1992)	Abordaron las principales cuestiones metodológicas sobre la conservación de las hojas, aislamiento y purificación del DNA.	La técnica RAPD, es una herramienta útil en la colección y manejo del germoplasma de aguacate, usaron 3 métodos para secar hojas de aguacate y compararon la cantidad y calidad del ADN obtenido.
Buffler y Fiedler (1996)	Analizaron la variación genética de un banco de germoplasma de aguacate mediante NTS y RAPD.	Concluyeron que los marcadores RAPD son útiles para la clasificación del aguacate y para estudiar la diversidad genética de las colecciones en los bancos de germoplasma, pero concluyeron que para 'Hass' sin embargo son necesarios otros marcadores
Mhameed <i>et al.</i>, (1997)	Utilizó marcadores VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) y análisis genéticos para medir las relaciones genéticas entre cultivares de <i>P. americana</i> y obtuvo un árbol filogenético de las especies de <i>Persea</i> .	El árbol filogenético obtenido muestra el alto valor de la variación entre cultivares de aguacate y especies del género <i>Persea</i> , se sugiere que la validez de raza y definición de especies entre <i>Persea</i> , debe ser tratado con precaución, ya que tanto el análisis genético como los VNTR presentaron un alto nivel de heterocigocidad como sugirió Mhameed en 1996 y Lavi en 1991, mostrándose una alta variación en la misma progenie así como entre especies y razas.
Sharon <i>et al.</i>, (1997)	Presentó la generación de marcadores SSR específicos	Los resultados se analizaron mediante varios programas de mapeo genético para

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

	para aguacate, estos marcadores fueron integrados mediante marcadores de DNA: RAPD y SSR, para construir el primer mapa genético de aguacate	establecer que programa era mejor para la progenie de los padres heterocigóticos. El análisis resultó en 12 grupos de unión con 34 marcadores (25 SSRs, 3 RAPDs y 6 bandas DFP) cubriendo 352.6 cM (centi Morgans). El mapa puede servir para desarrollar un mapa genómico más completo para identificación de la unión entre marcadores y loci de caracteres cuantitativos.
Sharon et al., (1998)	Detectaron los probables loci de características cuantitativas (SSR, RAPD, DNA).	Encontraron que seis características se asocian con al menos uno de los 90 marcadores.
Fiedler et al., (1998)	Estudiaron la relación genética de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill) usando marcadores RAPD	Se ha encontrado que las razas; Mexicana, Antillana y Guatemalteca son genéticamente diferentes al emplear análisis de marcadores genéticos de ADN mediante la técnica de RAPD (amplificación al azar de ADN genómico) encontrando una adecuada separación y confirmando distante a la especie <i>P. schiedeana</i>
Davis et al., (1998)	Fragmentos anónimos de DNA del genoma de aguacates cultivados (<i>Persea americana</i> Mill) se clonaron en un vector plásmido y se usaron para escanear un total de 36 cultivares.	Se encontró un alto nivel de polimorfismos, un análisis de los conglomerados de las similitudes genéticas reveló tres grupos raciales de aguacate cultivado, un cluster adicional refleja que los cultivares provienen de una hibridación racial.
Clegg et al., (1999)	Uso de marcadores moleculares en manejo y mejoramiento de aguacate	Mediante técnicas de marcadores moleculares con patrones RFLP separó adecuadamente las diferentes razas así como a híbridos entre ellas determinando su ascendencia.
Shnell et al., (2003)	Determinó la variación genética en y entre razas hortícolas de aguacate (SSR).	Identificaron materiales, no determinaron marcadores útiles asociados a alelos únicos para separar entre razas. La agrupación hortícola de las razas es congruente con la agrupación generada por los marcadores.
Rodríguez-Medina et al., (2003)	Caracterizaron morfológica, bioquímica y de manera molecular cultivares de aguacatero (<i>Persea americana</i> Mill) en Cuba.	Realizaron un estudio morfológico, bioquímico y molecular del género <i>Persea</i> .
Tsu-Liang et al., (2003)	Analizaron la diversidad genética de accesiones de Aguacates en Taiwán	Construyeron dendogramas mediante UPGMA, analizaron 42 cultivares de aguacate basándose en índices de similitud, los cuales se correlacionaron bien con sus sitios de origen.
Ashworth y Clegg (2003)	Estudiaron 25 marcadores de microsatélites creados para	El estudio sugirió la existencia de hibridaciones ancestrales que sucedieron

	aguacate los cuales sirvieron para diferenciar 35 cultivares y 2 especies silvestres usando Microsatélites (SSR) y QTL.	en <i>Persea</i> , hay una complejidad en el status de la hibridación (múltiple backcrossing), y que las razas botánicas se originaron más recientemente que lo que se suponía.
Ashworth et al., (2003)	Trataron de desarrollar marcadores de microsatélites para facilitar el mejoramiento.	Ya que hay disponibles pocas secuencias de ADN de lauráceas en los bancos públicos de secuencias (GIS). Trataron de comparar la eficiencia de marcadores desarrollados a partir de una librería enriquecida con dinucleótidos y trinucleótidos. Se encontró que las modificaciones a la PCR y el rediseño de iniciadores, raramente condujo a mejoras significativas en la interpretabilidad de las bandas. Aunque de manera menos frecuente las repeticiones loci de trinucleótidos son más fácil de interpretar que los de dinucleótidos.
Borrone et al., (2006)	Estudiaron segmentos de secuencias expresados para <i>Persea americana</i> Mill, e investigaron expandir el número de marcadores de microsatélites informativos disponibles para aguacate.	Se detectaron un número 17 a 7.1 alelos por locus. Los iniciadores exitosamente amplificaron los productos en las diferentes variedades de <i>P. americana</i> , híbridos y especies relacionadas como <i>Persea shiedeana</i> . Dichos iniciadores pueden ser muy bien utilizados para caracterización de germoplasma, determinación de las relaciones genéticas de accesiones cultivadas y para el desarrollo de portainjertos antillanos tolerantes hacia <i>Phythophthora. cinnammomi</i> asistido por marcadores moleculares.
Chen et al., (2007) (en impresión)	Los niveles de polimorfismo de nucleótidos y desequilibrio de la unión de cuatro loci nuclear fueron investigados en una muestra de 21 accesiones de aguacate silvestre y 33 cultivados.	Diferencias genéticas significativas se encontraron entre 3 grupos geográficos de aguacate silvestre y el conglomerado asignó a 33 cultivares en 3 poblaciones "México Central", "Sur de México/Guatemala", y el "Caribe (antillanos)".
Gutiérrez-Díez, et al., (2009)	Estimó la diversidad genética de <i>P. americana</i> Mill. spp. <i>Drymifolia</i> en los municipios de Aramberri y Zaragoza del Estado de Nuevo León, mediante caracteres morfológicos de frutos y marcadores moleculares tipo AFLP.	La utilización de AFLP permite estimar la diversidad genética intervarietal de la raza mexicana de <i>P. americana</i> cuando los datos moleculares se combinan con los datos morfológicos. Cuando sólo se utilizan datos moleculares generados por los AFLP, la diferenciación entre variedades es ambigua, por lo que es necesario utilizar marcadores moleculares más específicos como los SSR.
Cuiris et al., (2009)	Determinaron la existencia de diversidad genética dentro de una colección de	El estudio demostró la utilidad del análisis mediante ISSRs para la determinación de diversidad genética en aguacate.

	germoplasma de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.), perteneciente al INIFAP del campo experimental de Uruapan.	
Galindo Tovar, et al., (2011)	Analizaron las relaciones genéticas de <i>Persea americana</i> en la zona Centro del Estado de Veracruz, mediante Microsatélites.	Los cuatro iniciadores para microsatélites utilizados para el análisis molecular de <i>P. americana</i> mostraron alto polimorfismo y reproducibilidad en todas las poblaciones estudiadas en el Centro del Estado de Veracruz.
Reyes et al., (2013)	Realizaron un estudio de diversidad genética en colectas de un banco de germoplasma. Mediante marcadores moleculares de genotipos representativos del subgénero <i>Persea</i> y <i>Eriodaphne</i> , desarrollan una distinción entre genotipos y especies.	Tanto los marcadores basados en RAPD e ISSR fueron útiles para diferenciar los diferentes individuos de <i>Persea</i> estudiados. Sin embargo, los marcadores RAPD presentaron un amplio polimorfismo y permitieron una agrupación congruente en general con la taxonomía.

2.11 Tendencia mundial en el uso de marcadores moleculares.

En el Cuadro 5 se enlistan las ventajas y desventajas de algunos marcadores moleculares actuales. En la Figura 5 se observa la tendencia en su uso y las técnicas que han decaído y las que se han ido incrementando su utilización y disponibilidad en años recientes.

Cuadro 5. Técnicas de caracterización molecular actualmente disponibles.

Marcador	Ventajas	Desventajas
Aloenzimas e Isoenzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Baratos • Protocolos universales 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de material fresco o congelado • Algunos loci presentan inestabilidad proteica • Número limitado de marcadores disponibles
RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) y derivados	<ul style="list-style-type: none"> • Baratos • Produce un gran número de bandas, las cuales pueden ser caracterizadas individualmente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja reproducibilidad • Principalmente dominantes • Difíciles de analizar • Difíciles de automatizar • La comparación cruzada entre estudios es difícil
Microsatélites (SSR: simple sequence repeat)	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente informativos; gran número de alelos y alta heterocigocidad • bajo sesgo en su evaluación • Fácil de aislar 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta tasa de mutación • De comportamiento complejo de mutación • No de gran abundancia • La comparación cruzada entre estudios requiere de preparación especial

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

Polimorfismo de nucleótido simple (SNPs)	<ul style="list-style-type: none"> • Baja tasa de mutación • Alta abundancia • Fácil de tipificar • Actualmente se desarrollan nuevos enfoques analíticos • La comparación cruzada de resultados es fácil y existen repositorios de datos 	<ul style="list-style-type: none"> • Existe una sustancial tasa de heterogeneidad entre sitios • Son costosos para aislar • Bajo contenido de información de un SNP individual
Secuenciación de ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Da la más alta resolución posible • Sin sesgo • La comparación cruzada entre estudios es fácil; existen repositorios de datos 	<ul style="list-style-type: none"> • Todavía más caro que otras técnicas

Fuente: Barrientos-Priego, 2014. Seminario sobre protección al derecho de obtentor. Oportunidades para el fitomejoramiento y el desarrollo del sector agrícola.

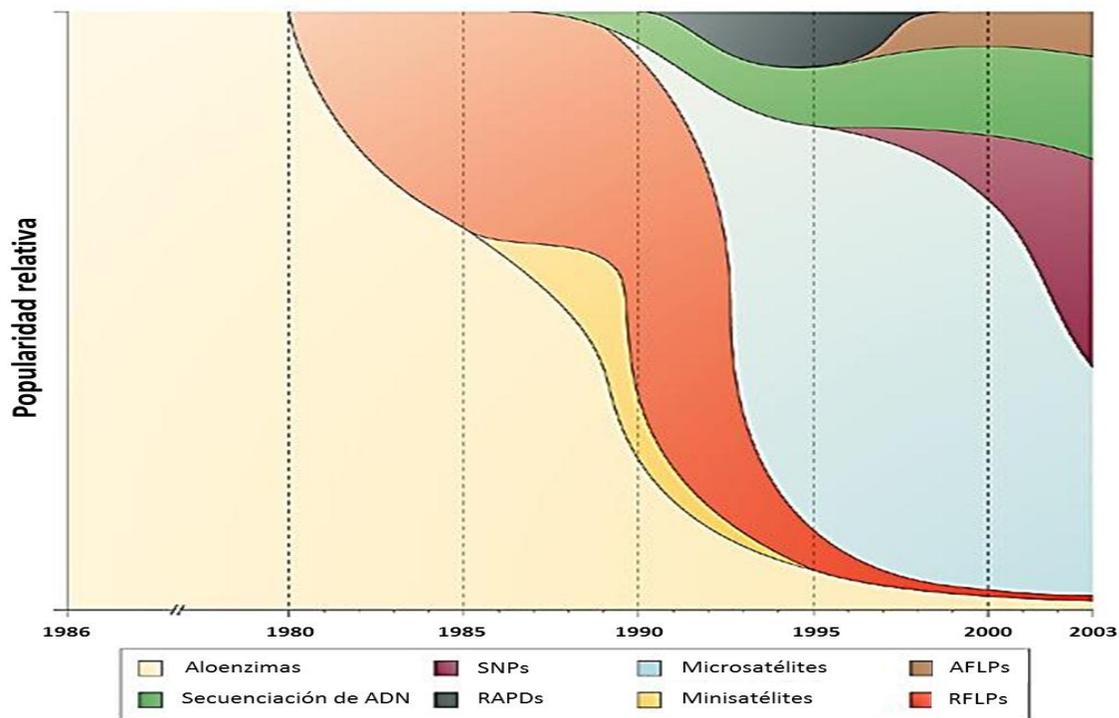


Figura 5. Cronología de técnicas de caracterización. Tomado de Barrientos-Priego, 2014. Seminario sobre protección al derecho de obtentor. Oportunidades para el Fito mejoramiento y el desarrollo del sector agrícola.

3. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México prevalecen formas nativas de genotipos de aguacates pertenecientes al género *Persea* al ser una región que forma parte del sitio de origen y dispersión de algunas especies y razas de este género como: *P. americana* (raza mexicana), *Persea cinerascens* (aguacatillos silvestres), *Persea hintonii* y *Persea floccosa*.

Los RAPD (random-amplified polymorphic DNA) pueden ayudar a elucidar la variación genética de individuos del género *Persea*, ya que se ha demostrado la detección de fragmentos monomórficos específicos para diferentes especies y razas de este género con esta técnica, lo cual hasta el momento no resulta tan eficiente que con el caso de los marcadores ISSR (Intersimple Sequence Repeat) (Reyes, 2008).

Al tener en cuenta que las técnicas moleculares ofrecen la posibilidad de distinguir inter e intra específicamente individuos, el uso de marcadores moleculares podría brindarnos la posibilidad de conocer la identidad de las colectas de aguacate realizadas, con el objetivo de tener un conocimiento mayor sobre la diversidad genética de *Persea* prevaleciente en el Estado de México, esto nos permitiría identificar relaciones entre colectas al generar agrupamientos entre individuos. De esta manera, se pretende reforzar el trabajo de caracterización morfológico que se inició en el Centro Universitario Tenancingo y al mismo tiempo brindar elementos para el estudio futuro de la diversidad genética en esta especie y genotipos relacionados que prevalecen en la región y estados vecinos.

4. HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares permitirán identificar diferencias genómicas entre genotipos del género *Persea*.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar mediante marcadores moleculares tipo RAPD e ISSR colectas de aguacate realizadas en la zona sur del Estado de México.

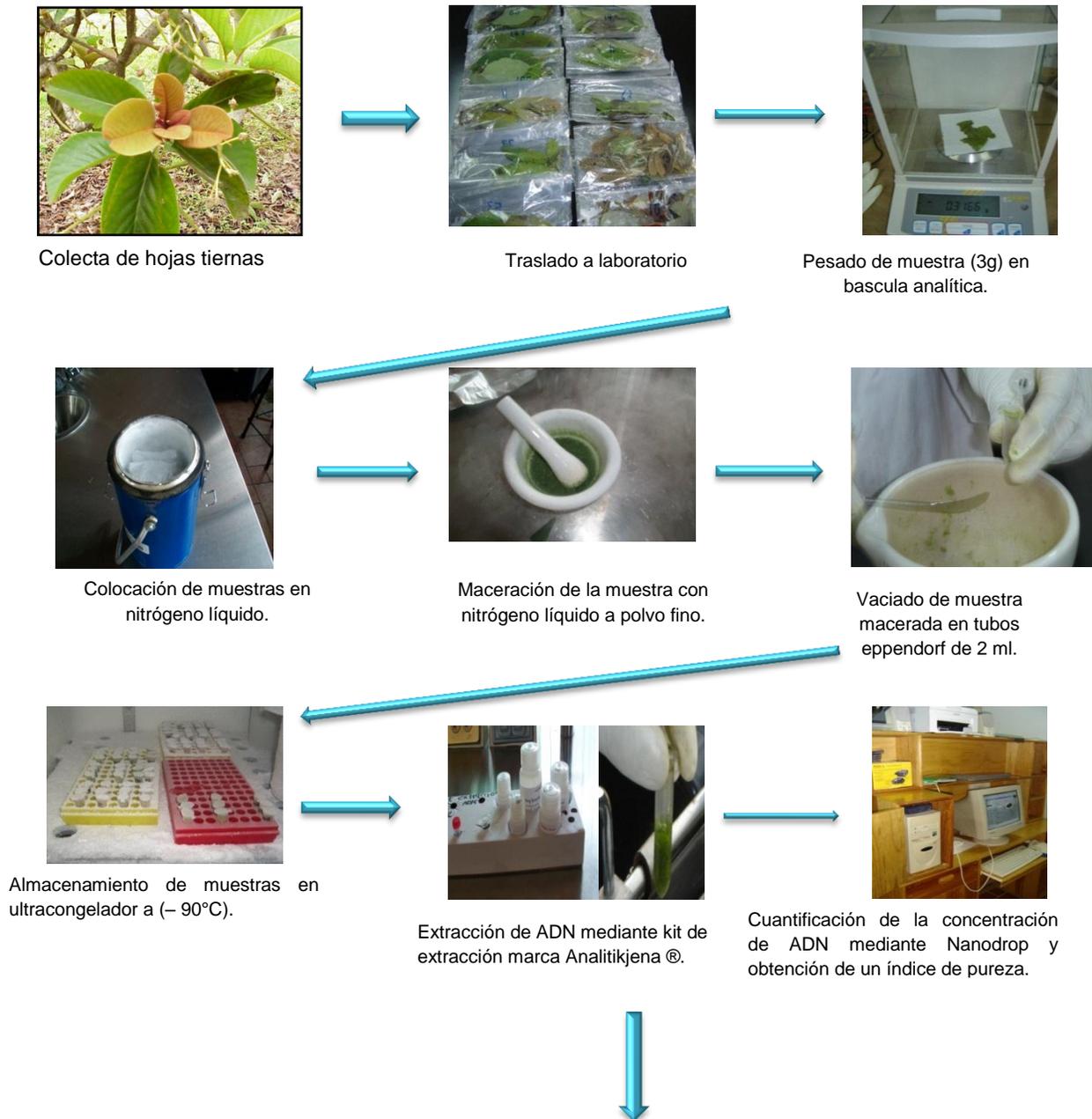
5.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar mediante marcadores moleculares tipo RAPD e ISSR a genotipos de aguacate generando agrupamientos y dendogramas.
2. Identificar mediante RAPD e ISSR la posible diversidad o variabilidad genética existente entre los genotipos de interés colectados.
3. Analizar por programas estadísticos Free Tree y Tree View, la diversidad genética observada de los marcadores moleculares.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Esquema general del trabajo

En la Figura 6 se esquematizan los pasos de manera secuencial resaltando los procesos principales del trabajo.



Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México



Lavado y centrifugado de las muestras de ADN, para eliminar impurezas.



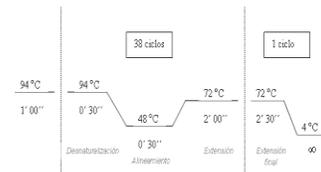
Digestión de las muestras de ADN mediante enzimas.



Preparación de mezclas de reacción para la PCR.



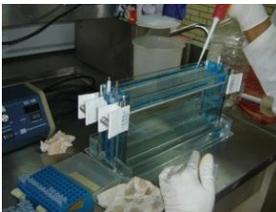
Programa de termociclaje para RAPD



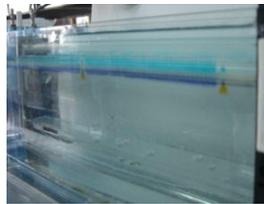
Programa de termociclaje para ISSR



Desarrollo de la PCR en Termociclador



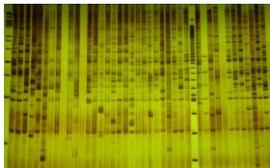
Elaboración de geles de acrilamida y colocación de muestras en la cámara de electroforesis.



Corrimiento de muestras de ADN en geles de acrilamida.



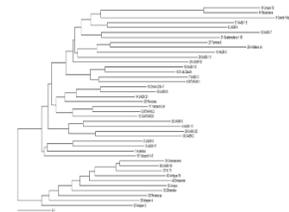
Tinción de geles con sales de plata



Revelado del gel mostrando bandas de ADN.



Construcción de matriz binaria para análisis de datos.



Generación de dendogramas.

Figura 6. Secuencia grafica del proceso operativo del estudio realizado.

6.2 Localización de los laboratorios donde se realizó el estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario UAEM-Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México en Santa Ana Ixtlahuatzingo, municipio de Tenancingo, Estado de México, localizado a los $18^{\circ} 58' 3''$ N y $99^{\circ} 36' 44''$ O, y en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Chapingo.

6.3 Material vegetal

Se utilizó material vegetal de diferente origen (Cuadro 6), proveniente de; colectas de aguacate conservadas *in situ* por pobladores en la faja aguacatera del Estado de México (Figura 7), se incluyeron ejemplares ubicados en el huerto del Centro Universitario UAEM Tenancingo, se incluyeron colectas de otros estados del Centro de México y algunas consideradas como de referencia solicitadas al banco de germoplasma de aguacate de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEXS.C.

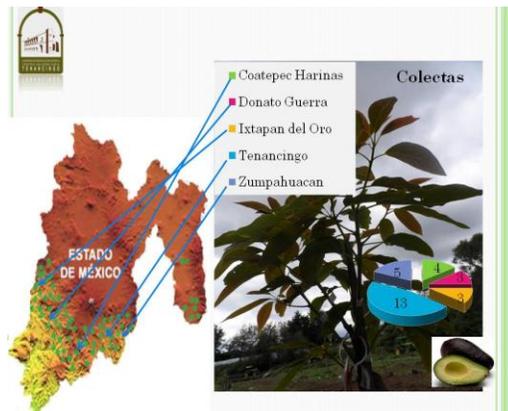


Figura 7. Franja aguacatera en el Estado de México, con algunos municipios que la comprenden, denotada por puntos verdes.

Cuadro 6. Descripción de genotipos colectados.

	Nombre / del genotipo	Sitio de colecta	Material colectado	Probable raza o parentesco
1	Ixtapan / 1	Ixtapan del Oro Estado de México	Hoja	<i>Persea floccosa</i>
2	Ixtapan / 2	Ixtapan Del Oro Estado de México	Hoja	<i>Persea floccosa</i>
3	Ixtapan/ 3	Ixtapan del Oro Estado de México	Hoja	<i>Persea floccosa</i>
4	Ixtapan / 4	Ixtapan del Oro Estado de México	Hoja	<i>Persea Floccosa</i>
5	UAEM /2	Centro Universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
6	UAEM /3	Centro Universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
7	UAEM/ 4	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
8	UAEM/5	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
9	UAEM/6	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
10	UAEM/7	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
11	UAEM/8	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
12	UAEM/9	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
13	UAEM/10	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
14	UAEM/ 11	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
15	UAEM/12	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
16	UAEM/13	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
17	UAEM/15	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
18	UAEM/16	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
19	UAEM/ 17	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
20	UAEM/ 18	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. derymifolia
21	UAEM/21	Centro universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
22	UAEM/ 22	Centro Universitario UAEM Tenancingo	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
23	Aceitoso	San Francisco Villa Guerrero Edo. México	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
24	Cantaros	San Francisco Villa Guerrero, Edo. México	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
25	Cascle viejo	Oaxaca	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
26	Yatzachi /1- 5	Oaxaca	Hoja	Probable <i>Persea floccosa</i>
27	Yatzachi/ 2- 9	Oaxaca	Hoja	Probable <i>Persea floccosa</i>
28	Zimatlan/ 1	Oaxaca	Hoja	Probable <i>Persea floccosa</i>
29	Mercado de Zaachila	Oaxaca	Hoja	<i>Persea americana</i> var. drymifolia
30	Anayo	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México	Hoja	<i>Bleishmiedia anay</i>
31	Cineraseens	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de Mexico	Hoja	<i>Persea cinerascens</i>
32	Tantima/ II	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México	Hoja	

33	Gua- t- 116	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México	Hoja	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
34	Antillano Ixtapan	Rancho la Cruz, Harinas, Estado de México	Hoja	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>
35	Floccossa	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México	Hoja	<i>Persea floccossa</i>
36	Chinini 236- F Ixtapan		Hoja	<i>Persea shiedeana</i>

6.4 Colecta y traslado de material vegetal

El material vegetal utilizado fueron hojas jóvenes completamente desplegadas y fotosintéticamente activas libres de plagas o enfermedades colectados en recorridos de campo. Para su traslado las muestras se conservaron envueltas en papel húmedo dentro de una bolsa de plástico dentro de una hielera con los siguientes datos; nombre del genotipo, lugar de la colecta, fecha y nombre del colector (Figura 8).

Inmediatamente de colectadas fueron trasladadas al laboratorio del Centro Universitario y mantenidas a 6 °C en refrigerador por un lapso no mayor a 24 horas previo a la extracción del ADN.



Figura 8. Colecta de hojas de los materiales de interés

6.5 Metodología

6.5.1 Maceración y almacenamiento de muestras

Las muestras fueron congeladas y maceradas a polvo fino con mazo y mortero en nitrógeno líquido. El producto macerado se depositó y conservó en tubos eppendorf de 1.5 mL a cantidades de aproximadamente 200 mg a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ultra congelador (Modelo DF8514, marca Ilshinbiobase®) hasta el momento de la extracción (Figura 9).



Figura 9. Proceso de maceración de las muestras de hojas de aguacate con nitrógeno líquido y conservación del tejido

6.5.2 Manipulación del ADN

La extracción del ADN se realizó mediante el kit comercial innuPREP Plant DNA Kit analytikjena de Biometra®, de acuerdo a la metodología marcada por el fabricante cuyo proceso se describe a continuación:

Se agregaron 400 μ l de la solución SLS (Lysis Solution) a la muestra macerada y 25 μ l de proteinasa K, se mezcló mediante vortex por 5 segundos y se colocó en la estufa por 35 minutos a 50 °C, con intervalos de agitación con vortex por 5 segundos cada 7 minutos.

Posteriormente se colocó un tubo con filtro al cual se agregó la muestra incubada que se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto.

Se desechó el prefiltro y al sobrenadante se le agregaron 200 μ l de la solución SBS (Binding Solution) que se mezcló mediante pipeteo sucesivo. La mezcla se colocó en un segundo tubo con filtro (verde), centrifugándose a 12,000 rpm por 2 minutos.

El filtro que contuvo la muestra de ADN, se introdujo en un nuevo tubo receiver y se le adicionaron 500 μ l de la solución HS (Washing Solution), se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, al sacarse se desechó el tubo y el filtro se puso en un nuevo tubo agregando 750 μ l de la solución MS (Washing Solution), centrifugando a 12,000 rpm durante 1 minuto.

La muestra en el filtro se cambió nuevamente de tubo y se centrifugó a la máxima velocidad durante 2 minutos, al momento de sacarse se colocó la muestra en un tubo eppendorf agregándose 200 μ l del tampón de elución, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugo 1 minuto a 8000 rpm quedando en el tubo eppendorf el ADN extraído. La muestra se conservó en refrigeración a -20 °C para su análisis posterior.

6.5.3 Cuantificación de la concentración de ADN mediante termociclaje

Mediante el uso del espectrofotómetro modelo ND-1000 Nano Drop, se utilizó un parámetro de 260 a 280 ng/ μ L que permitió medir la cantidad y calidad del ADN de cada una de las muestras. Una muestra de buena calidad fue aquella cuyos

valores fueron de 1.6 a 2.0 μl de la relación indicada 260/280. La espectrofotometría permite la cuantificación de muestras de ácidos nucleicos y proteínas basados en la absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente y se refiere a la transmitancia de la luz en un medio líquido y se expresa en nanogramos de partículas detectadas por microlitro ($\text{ng}/\mu\text{l}$) (Riepl *et al.*, 2011).

Si se rebasan dichos rangos se considera que la muestra tiene impurezas, para asegurar su pureza, en un duplicado de cada muestra se realizó un lavado.

6.5.4 Purificación y digestión del ADN

6.5.4.1 Lavado de las muestras para eliminar impurezas

Después de haber observado la calidad y concentración del ADN de las muestras mediante el uso del equipo Nanodrop®, no se obtuvo el rango de calidad y concentración establecidos, por lo que se hizo un lavado de las muestras con la finalidad de eliminar impurezas como polisacáridos, grasas, proteínas u otros para mejorar su calidad. La digestión se realizó siguiendo el protocolo de Weising *et al.*, (2005), el cual consistió en lavar con agua destilada estéril, adicionando 0.05 volumen de NaCl 5 M a cada muestra en tubo eppendorf, posteriormente se agrega etanol y se mete en hielo durante 10 minutos con la finalidad de precipitar polisacáridos, etc., se centrifugó a 8000 rpm y se agregó isopropanol, se mezcló por inversión y se almaceno durante 1 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, al sacarse se centrifugó nuevamente y se decantó el alcohol lavando la pastilla de ADN con etanol al 70 % (100 μL), finalmente se centrifugo y escurrió la pastilla durante 6 h para finalmente ser disuelta en DNA Rehydration Solution 10 mM Tris, 1 mM EDTA de Promega (50 μl).

6.5.4.2 Digestión del ADN

Esta técnica consistió en cortar o digerir el material genético a partir de la separación de sus fragmentos, con la ayuda de la enzima de restricción EcoR1. El cortado tiene la finalidad de digerir el material genético a partir de una secuencia que reconoce, la mayoría de estas secuencias son palindrómicas (es decir que se leen igual en ambas direcciones), una vez cortado el ADN, podría emplearse para diferentes fines, en nuestro caso fue para separar fragmentos por electroforesis y distinguir accesiones de aguacate.

6.5.5 Amplificación del ADN

Mediante la técnica de PCR se amplificaron fragmentos de ADN del genoma de aguacate con 8 primers de RAPD y 6 de ISSR (Cuadro 7) probados previamente en la detección de fragmentos monomórficos específicos en 8 especies y las 3 razas reconocidas de *Persea* (Reyes, 2008).

6.5.5.1 Programa de termociclaje

Los programas de termociclaje comprendieron: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 1 min a 94 °C; 35 ciclos [comprendiendo la desnaturalización, alineamiento y extensión de 30 s a 94 °C, 30 s a 40 °C y 1.5 min a 72 °C, respectivamente] y al final 1 ciclo de extensión de 2.5 min a 72 °C]. Para ISSR un ciclo a 94 °C por 1 min; 38 ciclos [94 °C, 30 s; 48 °C, 30 s; 72 °C, 2 min] y un ciclo de extensión final de 72 °C por 2.5 min. Se utilizó el equipo de termociclaje marca Gene Amp® PCR System 2700 AB Applied Biosystems.

Cuadro 7. Primers utilizados para la amplificación específica del ADN en aguacate.

Primers RAPD	Secuencia
A 15	TTC CGA ACC C
C 10	TGT CTG GGT G
C 13	AAG CCT CGT C
C 08	TGG ACC GGT G
E 07	AGA TGC AGC C
E 14	TGC GGC TGA G
E 16	GGT GAC TGT G
E 18	GGA CTG CAG A
Primers ISSR*	
	AC(GACA) ₄
	DBDA (CA) ₇
	(AC) ₈ YG
	(GA) ₈ YC
	(TCC) ₅ RY
	(GACA) ₄

*B = G, T, C; D = G, A, T; Y = C, T; R = A, G

G: Guanina

T: Timina

C: Citocina

A: Adenina

6.5.5.2 Desarrollo de la PCR en termociclador

La reacción de PCR se realizó utilizando la mezcla que consiste de los reactivos enlistados en el Cuadro 8, mediante el programa de termociclaje para RAPD e ISSR mencionado en el apartado anterior.

Cuadro 8. Reactivos utilizados para PCR en la mezcla Master mix.

Mezcla	Final	1 X	3 X
Agua HPLC		4.7 µl	14.1 µl
10 X PCR Buffer	1x	2.5 µl	7.5 µl
25 mM Mg Cl	1.5 – 3.5 mM	2.5 µl	7.5 µl
dNTPs 10 mM	200 µM	10 µl	30 µl
Primer	20 ppm/µl	1 µl	3 µl
Taq DNA Polimerasa	1.5 unit/µl	0.3 µl	1 µl
DNA	20 µl	2 µl	6 µl
Total		23 µl	69 µl

6.5.6 Elaboración de geles de acrilamida

En geles de acrilamida, que a diferencia de la agarosa facilita la observación, se realizaron corrimientos previos para verificación de la calidad del bandeado y de esta forma determinar la calidad y pureza del ADN extraído evidenciándose por la obtención de bandas nítidas y sin barridos.

Las cantidades de reactivos utilizados para la elaboración de geles de acrilamida, fueron las mencionadas en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Reactivos utilizados para la elaboración de geles de acrilamida.

Reactivo	Concentración
Acrilamida	26 ml
Agua destilada	70 ml
TBE 5X ¹	24 ml
APS 10% ²	840 ml
Temed ³	70 µl

¹Tris, borato y EDTA; ²Persulfato de amonio; ³Tetramethylethilenediamina

La mezcla de estos reactivos se realizó en un envase de vidrio de 1 L y se vertió en medio de los 2 cristales que conforman el sistema de la **Cámara de Electroforesis Vertical**, los cristales fueron previamente lavados y desinfectados y se les colocó el peine para la formación de los pozos. Una vez solidificado el gel en los cristales se colocó en la cámara de electroforesis para comenzar a cargar las muestras de los productos amplificados con un marcador de peso molecular de 1 kb de (Gibco®).

6.5.6.1 Tinción de geles

La tinción del gel se llevó a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento; se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se colocó en una charola con una solución fijadora con base de etanol al 10 % y ácido acético al 1 %, se puso en el agitador durante 10 minutos con la finalidad de que la solución fuera fijándose en el gel, posteriormente se retiró el sobrante de la solución que se había puesto en la charola y se le agregó nitrato de plata hasta cubrir el gel, por lo cual nuevamente se colocó en el agitador para que la solución penetrará bien al gel.

6.5.6.2 Revelado del gel

Al retirarlo del agitador se quitó la solución y se agregó la solución reveladora NaOH al 3 % con formaldehído en agitación durante 30 minutos el cual se distribuyó alrededor del gel, con la finalidad de teñir al gel y resaltar las bandas, se retiró el líquido que contenía la charola y se procedió a lavar el gel con H₂O destilada, el gel se pasó a una nueva charola la cual se colocó en el transiluminador que permitió la visualización de las bandas.

6.5.7 Construcción de dendogramas

6.5.7.1 Matriz Binaria para análisis de datos

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

Mediante los perfiles de bandas obtenidos en los geles se elaboró una matriz básica de datos para cada iniciador.

6.5.7.2 Generación de dendogramas

Para el estudio de similitud entre los datos generados, se construyeron veinte dendogramas en el programa Free Tree versión 0.9.1.50 (Pavlíček *et al.*, 1999), tanto para RAPD como para ISSR y para ambos combinando los métodos de construcción mediante la distancia/matriz de similitud Nei and Li / Dice y el método de construcción del árbol Neighbor – joining, así como con la matriz de similitud Jaccard y el método de construcción del árbol UPGMA y Jaccard con Neighbor-joining, con un remuestreo (“Bootstrapping”) de 1000 repeticiones. De dichas combinaciones se seleccionaron los mejores árboles de consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir *et al.*, 2001); para visualizar los dendogramas obtenidos se utilizó el programa Tree View 1.6.6.

7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

7.1 Calidad del ADN

La extracción de ADN de aguacate resultó ser un proceso complicado para algunos genotipos probablemente por su alto contenido de polisacáridos, componentes volátiles u otros en sus hojas lo que dificultó su separación, dicho resultado fue similar a lo reportado por Ramírez, *et al.* (2004), pues al realizar extracciones de ADN en aguacate observó que es necesario hacer modificaciones al método CTAB, protocolo de Doyle y Doyle (1990), al hacer dichas modificaciones logró una extracción exitosa del ADN con calidad suficiente en esta especie.

De acuerdo a lo anterior, en el presente estudio resultó difícil la extracción de ADN para algunos genotipos de las especies *Persea shiedeana*, *Persea steyermarkii*, *Persea nubigena*, y ejemplares de *Persea americana* como “Tantima II, “Antigua”” pertenecientes los dos últimos a la raza antillana, e incluso con la variedad comercial “Hass” como lo reporta Reyes *et a.*, (2013), por tal motivo se realizaron algunas prácticas complementarias como lavados y cortado de ADN para mejorar su calidad en las especies y genotipos estudiados. De manera similar Gutiérrez, *et al.* (2009), trabajaron con la diversidad genética del aguacate en Nuevo León y adecuaron la técnica de extracción de ADN foliar mediante el método del ruptor usando un Kit comercial con resultados exitosos.

Los geles generados en el estudio se muestran en las Figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19, en estos se visualizan bandas nítidas, que permitieron diferenciar polimorfismos entre genotipos, sin embargo, en algunos de ellos no se detectó bandeo probablemente porque su ADN se degeneró por los lavados, tal es el caso de Floccosa 10, Cantaros, Cascle, Anayo, Cinerascens, Ixtapan 4, Antillanos, Guatemaltecos y los UAEM 3, 6, 7, 10, 16 y 4 cuyas bandas no se observaron. Es importante destacar que trabajar con diversidad genética en aguacate implica

características diferentes en las muestras que tienen que ver con la composición química particular de sus hojas a la que se atribuye la probable dificultad para la extracción de ADN, al respecto Buffler y Fiedler (1992), reportaron la utilización de 3 metodologías diferentes para secar hojas de aguacate y realizar el aislamiento y purificación del ADN comparando su calidad y cantidad, posteriormente analizaron la variación genética de un banco de germoplasma mediante NTS y RAPD (Buffler y Fiedler, 1996).

7.2. Cuantificación de ADN

Se observó que la mayoría de los materiales UAEM se encuentran agrupados en el mismo grupo de concentración de ADN de acuerdo a los datos observados, lo que sugiere disrupción celular similar con concentraciones semejantes de otros componentes como; polisacáridos, probablemente porque pudieran pertenecer a la misma raza, en este caso a *Persea drymifolia*; de igual forma en el grupo A es en donde más materiales se agrupan se supondrían más similitudes, sin embargo, esto pudiera ser simplemente variación en la calidad de las muestras colectadas como lo reporta Riepl, *et al.* (2011). En la Figura 13 se muestra el número de genotipos que hay en cada agrupamiento de acuerdo al nivel de concentración de ADN de los materiales. Las cantidades cuantificadas en las muestras se observan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Clasificación de muestras de acuerdo a su concentración de ADN (ng/ μ L).

Grupo A 34.75 a 63.53	Grupo B 11.9 a 29.57	Grupo C 1.58 a 10.62	Grupo D 66.31 a 205.41
UAEM 8	Ixtapan 2	Aceitoso	UAEM 4
UAEM 17	UAEM 10	Cantaros	UAEM 6
UAEM 13	M. de Zaachila	Floocosa	UAEM 21
UAEM 3	Chinini 236- F- Ixtapan	Ixtapan 3	Yatzachi 2-9
Ixtapan 1	UAEM 2	Tantima 2	UAEM 9
Cascle viejo	UAEM 18	Antigua 19	UAEM 15
UAEM 7	Lingüe 32	Meyeniana	Zimatlan
Yatzachi 1- 5			UAEM 16
UAEM 11			Otra

Guatemalteco 116
UAEM 5
Ixtapan 4
UAEM 22
Antillano Ixtapan
UAEM 2
Anayo
Cinirascens
M. 71
Persea sp.

Hass

En las figuras 10, 11 y 12, se muestra la variación en la concentración de ADN, las curvas más elevadas representan a las muestras con mayor concentración de ADN.

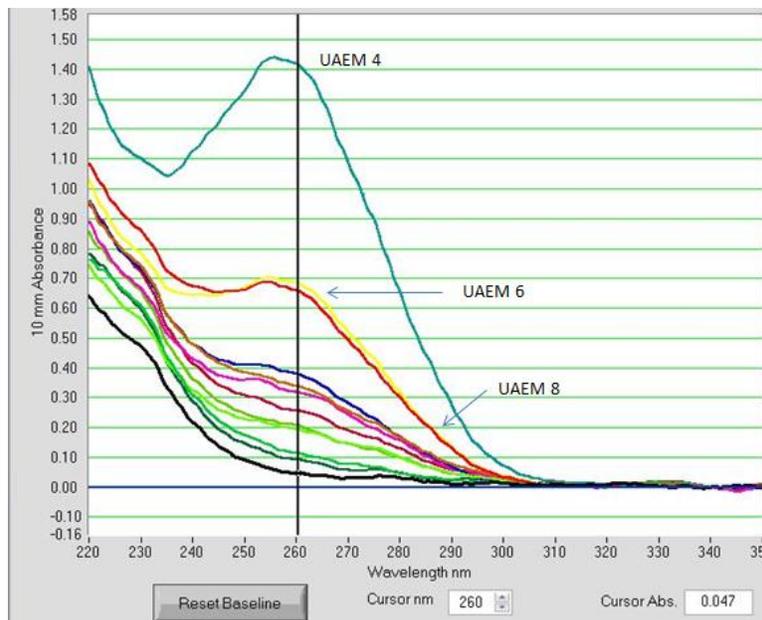


Figura 10. Concentración de ADN de las muestras del 1 al 12, ilustrándose a las de mayor concentración a los materiales UAEM 4, UAEM 6 Y UAEM 8.

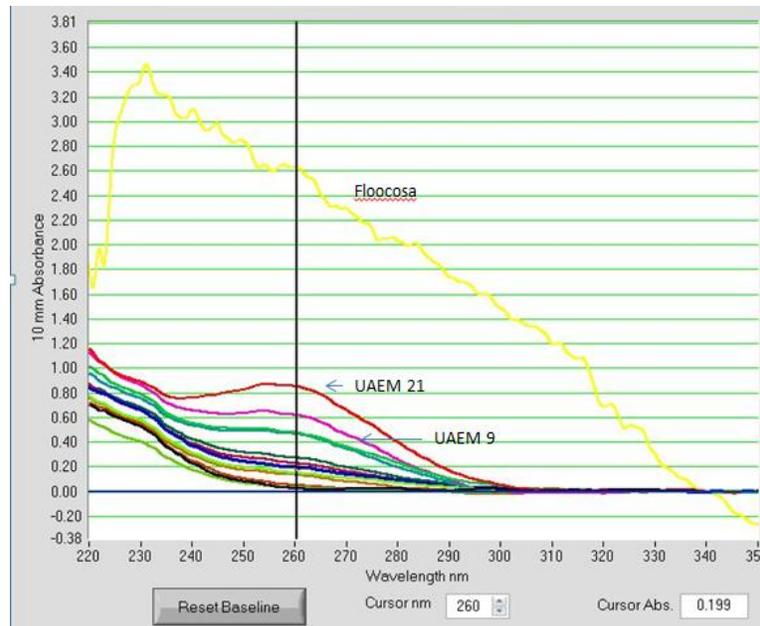


Figura 11. Concentración de ADN de las muestras del 13 al 26, ilustrándose a los de mayor concentración a los materiales floccosa, UAEM 21 y UAEM 9.

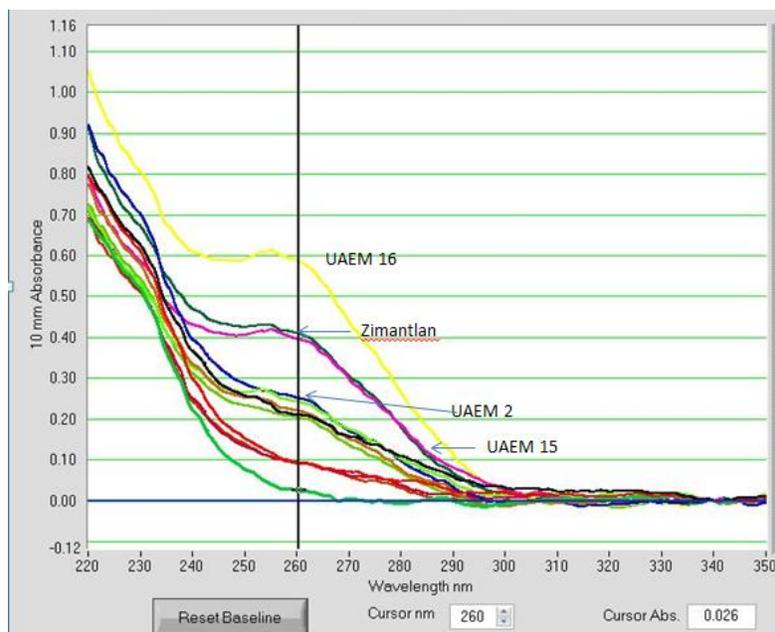


Figura 12. Concentración de ADN de las muestras del 27 al 36, ilustrándose las de mayor concentración a los materiales UAEM 16, Zimatlán, UAEM 2 y UAEM 15.

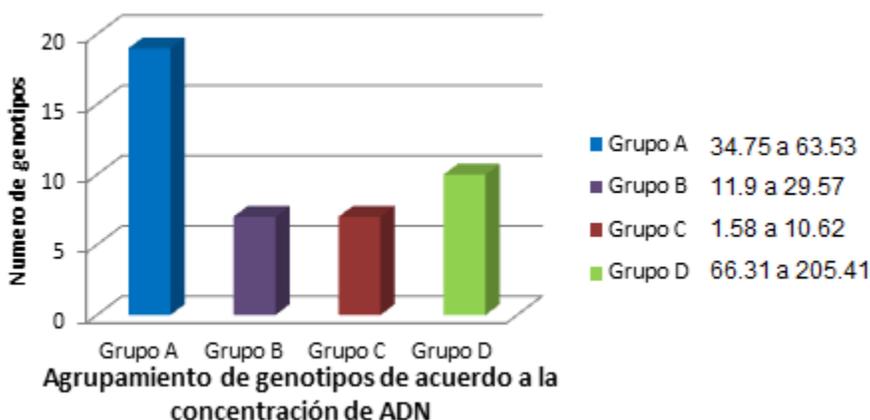


Figura 13. Concentración de ADN de los genotipos usados (ng/μL).

Con los lavados de ADN se eliminaron algunos componentes de la muestra de cada uno de los genotipos de aguacate, lo que incrementó su calidad (Cuadro 11) es decir, aumentó la transmitancia de luz basada en la absorbancia a través de un medio líquido a 260 y 280 nm. Se observó que al disminuir la concentración (ng/μl) de la muestra también se redujo el contenido de ADN, si se rebasan dichos rangos se considera que la muestra tiene impurezas (Riepl, *et al.*, 2011). En el cuadro 11 se muestran las concentraciones obtenidas originalmente y de aquellas en que posteriormente se realizó un lavado.

Cuadro 11. Cuadro comparativo de la cantidad de ADN de *Persea* antes y después del lavado.

No. De Muestra	Nombre	Sin lavado		Con lavado	
		Calidad de 260/280	ng/μl	Calidad de 260/280	ng/μl
1	Aceitoso	1.87	6.45	1.49	2.33
2	UAEM 8	2.08	54.49	2.18	32.96
3	UAEM 17	2.2	60.43	2.54	5.75
4	UAEM 13	2.22	46.49	2.04	16.94
5	Ixtapan 2	2.07	29.57	1.95	9.72
6	UAEM 4	2.17	205.41	2.15	70.93
7	UAEM 3	2.1	57.8	2.26	18.99
8	Ixtapan 1	2.25	54.85	2.03	15.92
9	Cascle Viejo	2.05	36.06	1.99	12.86

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

10	UAEM 10	2.18	14.85	1.98	4.55
11	UAEM 6	2.12	106.46	2.15	34.19
12	UAEM 7	2.16	42.89	2.13	10.43
13	Cantaros	2.13	1.58	1.24	1.3
14	UAEM 21	2.16	110.95	2.12	42.72
15	Yatzachi 1-5	2.12	48.85	2.05	23.9
16	M. de Zaachila	2.35	17.4	2.09	7.56
17	Yatzachi 2-9	2.17	68.96	2.37	23.38
18	Chinini	1.9	19.73	2.1	10.01
19	UAEM 9	2.25	86.33	2.39	31.05
20	UAEM 11	2.22	48.51	2.39	11.45
21	Guatemalteco	1.87	47.62	2.34	13.8
22	Floccosa	12.91	1.74	1.3	131.71
23	Ixtapan 3	3.77	7.12	3.58	2.58
24	UAEM 12	2.2	26.39	4.25	6.83
25	UAEM 5	2.23	35.4	1.93	10.54
26	Ixtapan 4	1.68	35.99	1.99	4.72
27	Tantima	4.33	2.41	-3.68	1.35
28	UAEM 22	2.09	36.62	2.88	11.06
29	Antillano	2.14	48.12	2.36	12.15
30	UAEM 2	2.11	34.75	2.57	12.61
31	UAEM 15	2.04	133.72	2.13	19.8
32	Anayo	1.89	38.24	2.53	4.62
33	Zimantlán	2.13	66.31	2.26	20.54
34	UAEM 16	2.04	97.45	2.21	29.43
35	Cinerascens	2.15	57.03	2.9	10.2
36	UAEM 18	1.89	11.9	3.04	4.55

En algunas muestras disminuyó el rango de concentración luego del lavado, en los genotipos en que no se logró obtener ADN, es probable que los lavados realizados para la eliminación de impurezas, polisacáridos, etc., hayan contribuido a que la cantidad del ADN disminuyera.

7.2.3 Cortado del ADN

En las **Figuras 14 y 15** se observa un mayor número de bandas en los carriles del gel correspondientes al ADN cortado en comparación con el no cortado, posiblemente sea debido a los lavados y a la digestión que se hizo, ya que el lavado ayudo a eliminar impurezas y el cortado a separar la molécula del ADN para hacer más fácil su visualización.

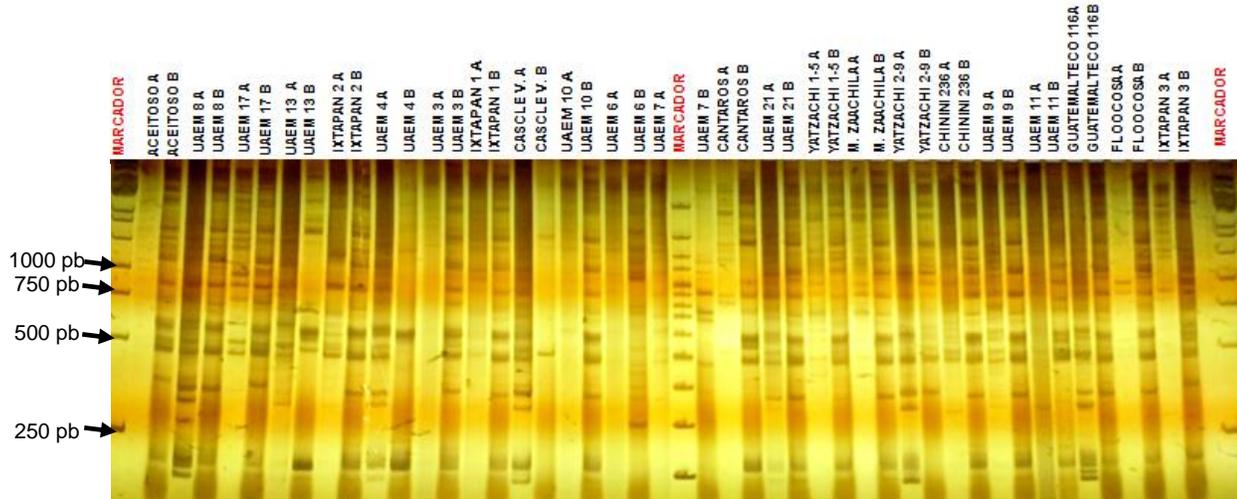


Figura 14. Gel de acrilamida con 23 muestras de ADN sin cortar "A" y cortado "B" con el primer A 15.

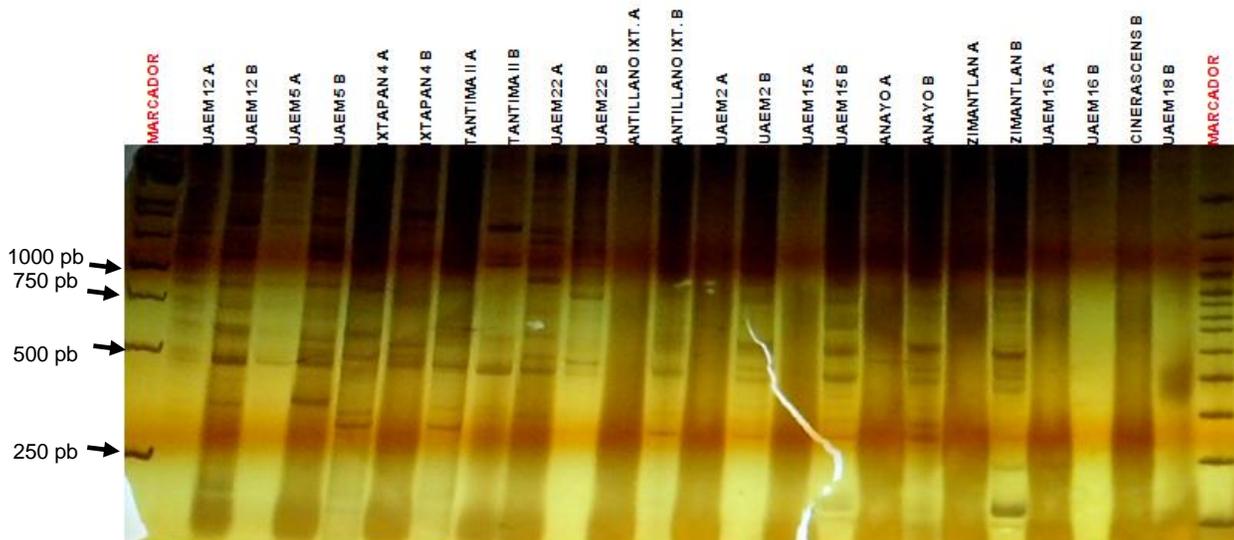


Figura 15. Gel de acrilamida con 13 muestras con ADN sin cortar y cortado con el primer A 15.

La letra "A" se refiere a las muestras de ADN sin cortar y la "B" a las muestras cortadas, Las muestras con letra "B" presentan una mejor nitidez lo cual indica que el ADN cortado brindó mejores resultados para el caso de aguacate (Figuras 14 y 15).

Mediante los agrupamientos realizados en el Cuadro 11 referente a la concentración de ADN de las muestras, fue como se determinó que concentraciones de la mezcla se utilizarían para el cortado del ADN del resto, tal como se describe en el Cuadro 12 ya que cada grupo contó con diferente concentración.

Cuadro 12. Concentraciones utilizadas para el cortado del ADN determinadas de acuerdo a la concentración de cada grupo.

Reactivos	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
ADN	11 µL	25 µL	40 µL	5.0 µL
Enzima EcoR1	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
BSA (Albumina suero de bovino)	0.4 µl	0.4 µl	0.4 µl	0.4 µl
H ₂ O	33.6 µL	19.6 µL	4.6 µL	39.6 µL

Se realizaron pruebas de PCR empleando ADN cortado y sin cortar con la finalidad de observar diferencias en su calidad al permitir una mejor visualización de las bandas durante el proceso del revelado. El revelado se realizó en geles de acrilamida, y por lo observado en el presente estudio, las prácticas de lavado y cortado, resultaron útiles para mejorar la calidad del ADN, de tal modo que se recomienda sean consideradas en el estudio de la diversidad del género *Persea*, puesto que experiencias anteriores evidenciaron complicaciones en la pureza de algunas muestras en este género (Reyes, *et al.*, 2013).

7.3. Polimorfismos generados mediante RAPD e ISSR

La generación de polimorfismos fue más abundante con el uso de los primers de **RAPD A 15, E 14 y C 08** e **ISSRs: (AC)₈YG y (GACA)₄** descritos en el Cuadro 7 de materiales y métodos ya que resultaron ser bastante informativos de acuerdo a la generación de fragmentos como se observan en las Figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19.

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

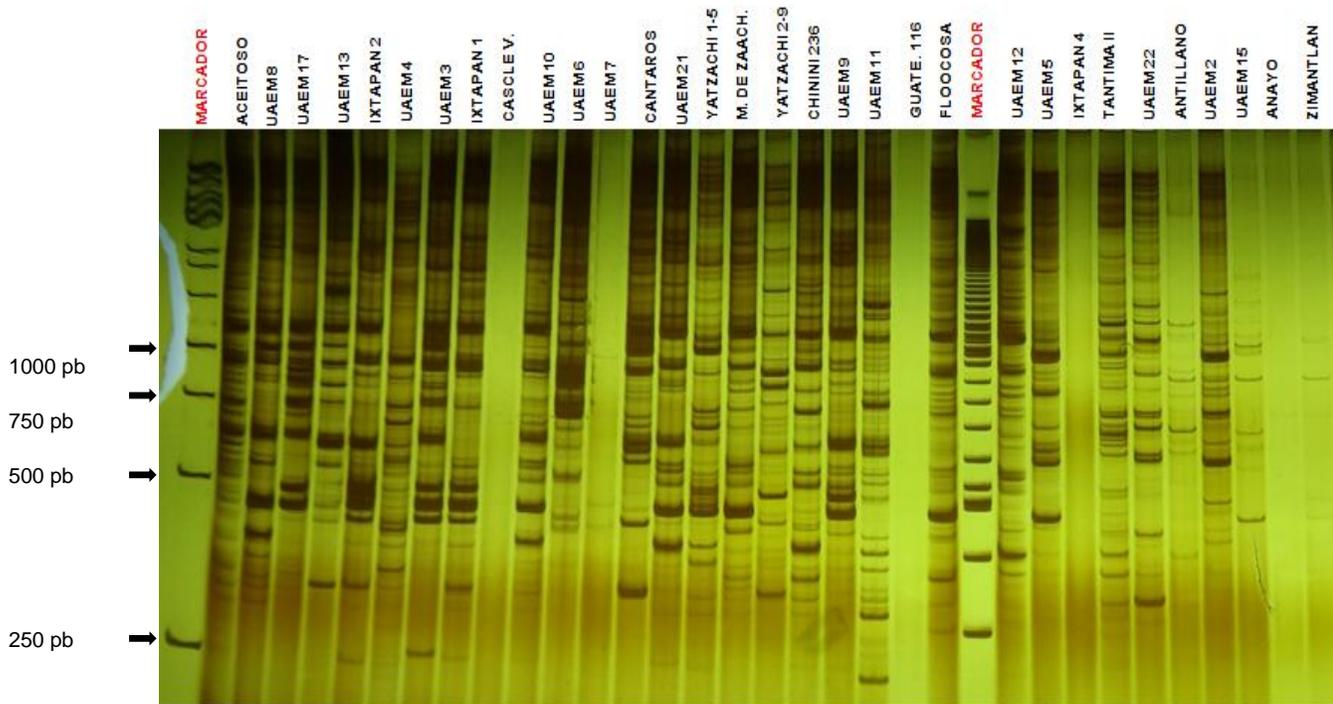


Figura 16. Gel de acrilamida con 33 muestras usando el primer E 14.

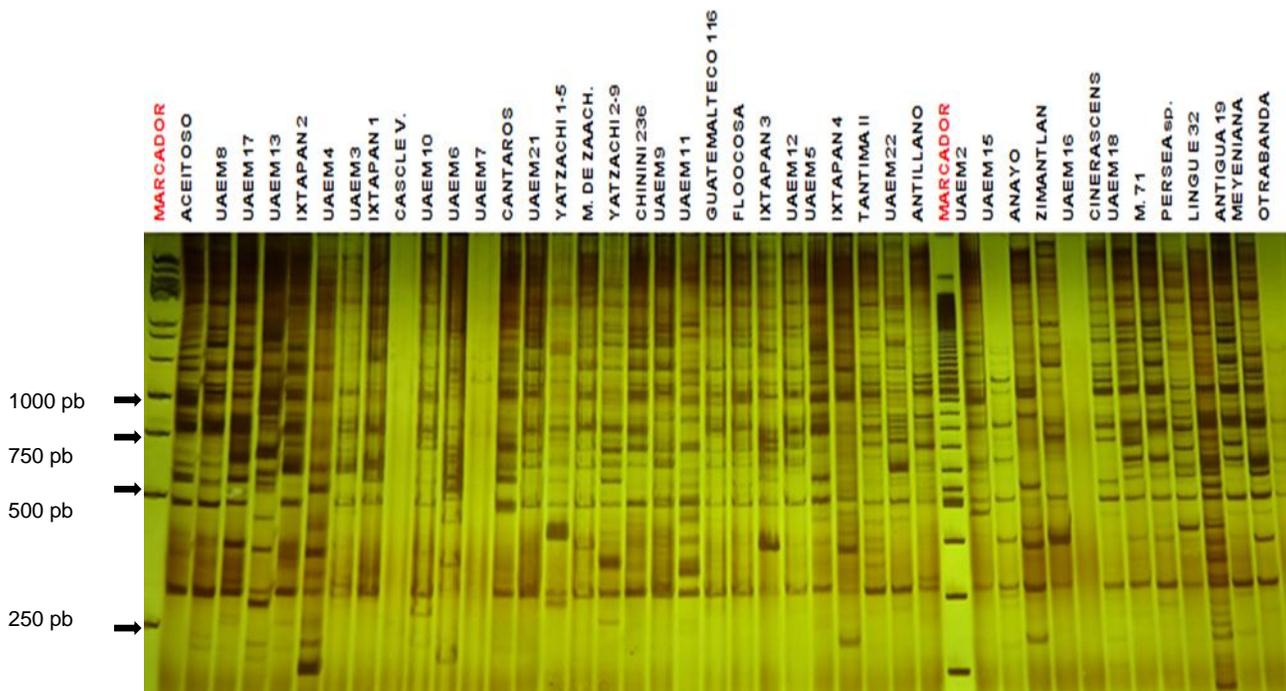


Figura 17. Gel de acrilamida con 42 muestras usando el primer C 08.

Caracterización molecular de colectas de aguacate de la zona sur del Estado de México

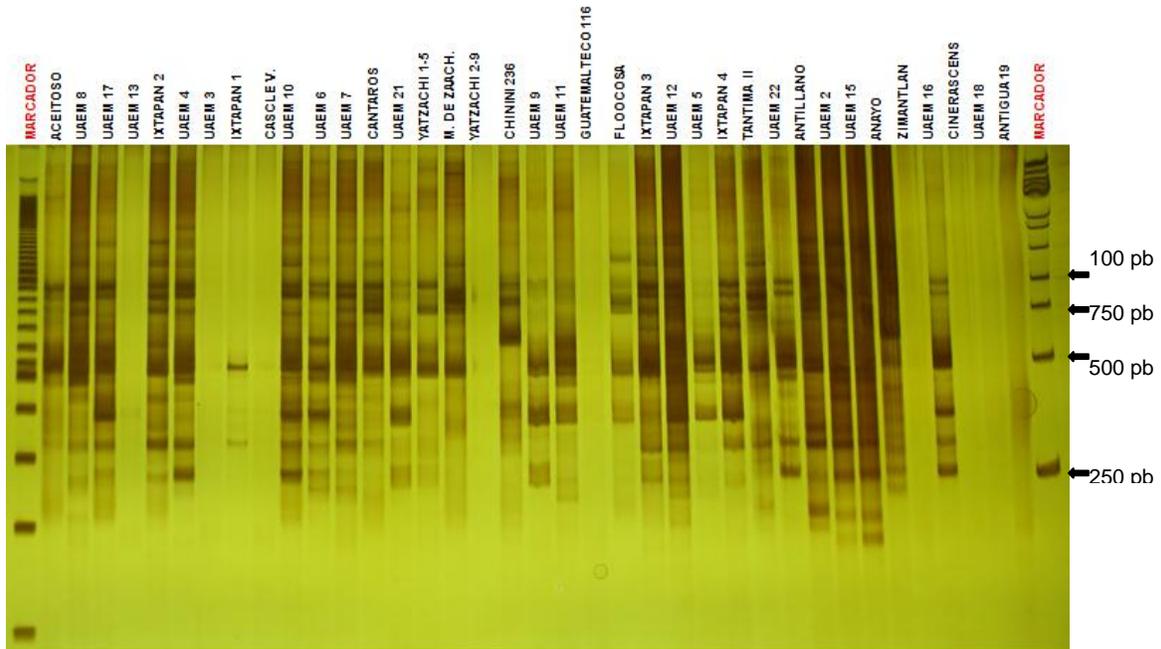


Figura 18. Gel de acrilamida mediante ISSR usando el primer $(AC)_8$ YG.

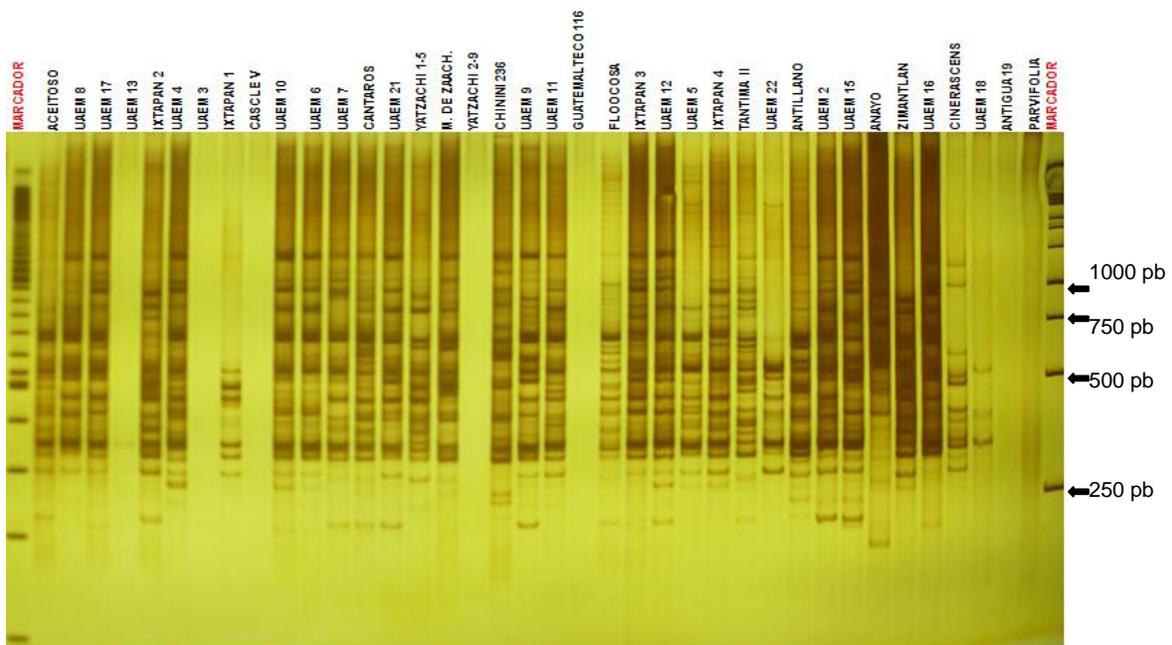


Figura 19. Gel de acrilamida mediante ISSR usando el primer $(GACA)_4$.

7.4 Agrupamiento de genotipos

Con los polimorfismos generados se construyeron 20 dendogramas; 10 para RAPD, 10 para ISSR, de los cuales, se seleccionaron tres, uno para RAPD, otro para ISSR y uno con la combinación RAPD/ISSR siendo estos los más congruentes y representativos para cada caso (Figuras 20, 21 y 22).

En el dendograma con **RAPD** (Figura 20) se distinguieron 2 ramas principales: identificadas como A y B: en la rama A se encontró distribuidos a los genotipos de la UAEM, que en su mayoría son de la raza mexicana (*Persea americana* var. *Drymifolia*) que integran el huerto frutícola del Centro Universitario y también contiene en su extremo superior a *Persea lingue* y *P. meyeniana*. En la rama B se encontró a *P. cinerascens*, *Persea* sp. y *Bleischmiedia anay* (anayo), estas especies se pueden calificar como raros o poco comunes ya que corresponden al subgénero *Eriodaphne*, al denominado grupo de los aguacatillos al igual que *P. lingue* y *P. meyeniana*. Es importante destacar que los marcadores RAPD hacen agrupamientos aleatorios con base a similitudes, es decir aunque se separan aparentemente los genotipos comparten bandas similares, indicando que hay semejanzas de los ejemplares en el subgénero denominado *Persea*, datos semejantes fueron reportados por Buffler y Fiedler (1996) al analizar variación genética de aguacate mediante NTS y RAPD.

Los polimorfismos identificados para **ISSR** en el dendograma (Figura 21), estuvieron presentes en la mayoría de las muestras del estudio, posiblemente debido a que éstos marcadores tienen la capacidad de identificar fragmentos más específicos del genoma a diferencia de RAPD. Esta es la razón por la que no se observan agrupamientos específicos, sin embargo es de notarse la cercanía de *P. cinerascens* y *Bleishmiedia anay*, el primero del subgénero *Eriodaphne* (aguacatillos) y el segundo es un género afín a *Persea*, ambos son muestras muy ajenos al resto de las accesiones estudiadas. Se observó un agrupamiento más específico, el denominado **rama B** y que comprende a la mayoría de los genotipos

UAEM que corresponden a la población de criollos mexicanos localizados en el centro universitario y también a genotipos como los Ixtapan, Yatsachi, *Persea floccosa* y *P. shiedeana*, todos ellos son ejemplares que corresponden al subgénero *Persea*, y que por su distribución en la presente figura y por las características de los ISSR de identificar fragmentos más específicos, los agrupados en las **ramas A** y **B** podrían compartir similitudes al interior de su genoma aun cuando estos pueden tener diferente origen geográfico, lo cual concuerda con lo reportado por Rodríguez-Medina, *et al.* (2003) y Cuiris, *et al.* (2009) quienes trabajaron con diversidad genética dentro de una colección de germoplasma en Cuba y México respectivamente.

La conjunción de polimorfismos de RAPD e ISSR analizados en el dendograma de la Figura 22, tiene la finalidad de robustecer la información que se generó por separado mediante las técnicas, en dicha figura se distinguen un alejamiento del género afín *Bleishmiedia anay* (anayo de Puebla) y la especie *Persea Cinerascens* (aguacate cimarrón de Orizaba y Michoacán), el resto de los materiales no muestran una distinción clara de algún agrupamiento, lo que hace suponer que la riqueza del género *Persea* comparte similitud en su genoma es decir que los genotipos actuales son producto de hibridaciones naturales a lo largo del tiempo entre diferentes especies de *Persea* (Mhameed *et al.*, 1997; Fiedler *et al.*, 1998), pero que comparten un genoma semejante con poca variación al indicar que tanto los marcadores basados en RAPD como en ISSR son útiles para diferenciar los diferentes genotipos de *Persea* (Reyes, *et al.*, 2013).

Sin embargo, mediante RAPD (Figura 20) fue posible observar una tendencia de agruparse a los genotipos de la serie UAEM que corresponden a una población de origen desconocido pertenecientes a la raza mexicana (*Persea americana* Mill var. *Drymifolia*) con la raza antillana (*Persea americana* var. *Americana*) y con la raza guatemalteca (*Persea americana* var. *Guatemalensis*), probablemente porque estas tres razas corresponden a la misma especie (*Persea americana*). De los UAEM se desconoce su origen, sin embargo, se han identificado algunos

ejemplares que pudieron haberse seleccionado en el pasado por colectores no identificados y traídos al sitio por sus características de fruto grande y de buen sabor como los UAEM 14 y 17 que presentan dichas características, aunque otros ejemplares son de sabor apetecible, son de un tamaño pequeño y probablemente hayan surgido a partir de rebrotes del árbol original injertado.

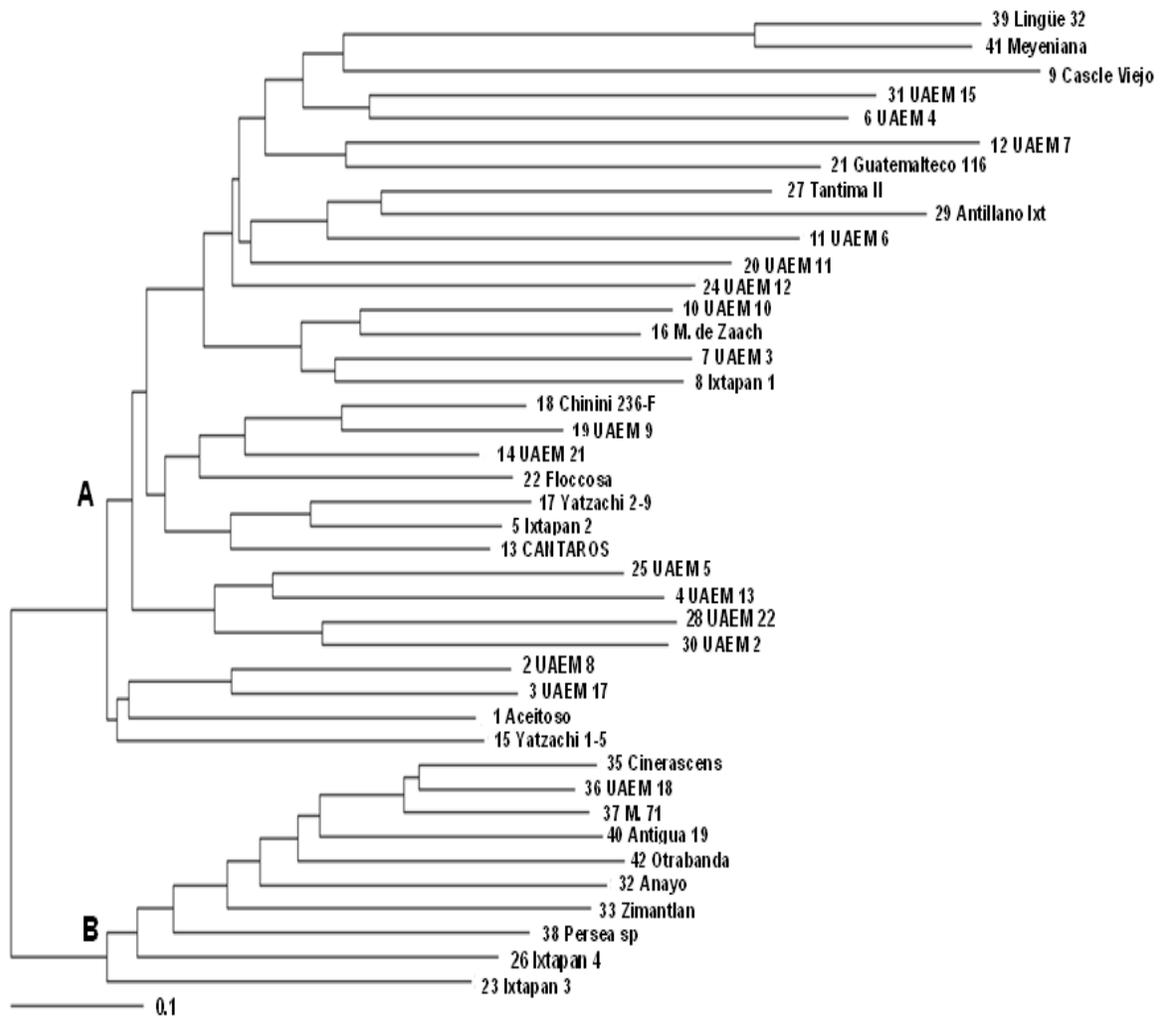


Figura 20. Dendrograma con datos RAPD mediante la distancia/matriz de similitud Jaccard y el método de construcción Neighbor joining. (3), generado de los genotipos de aguacate colectados.

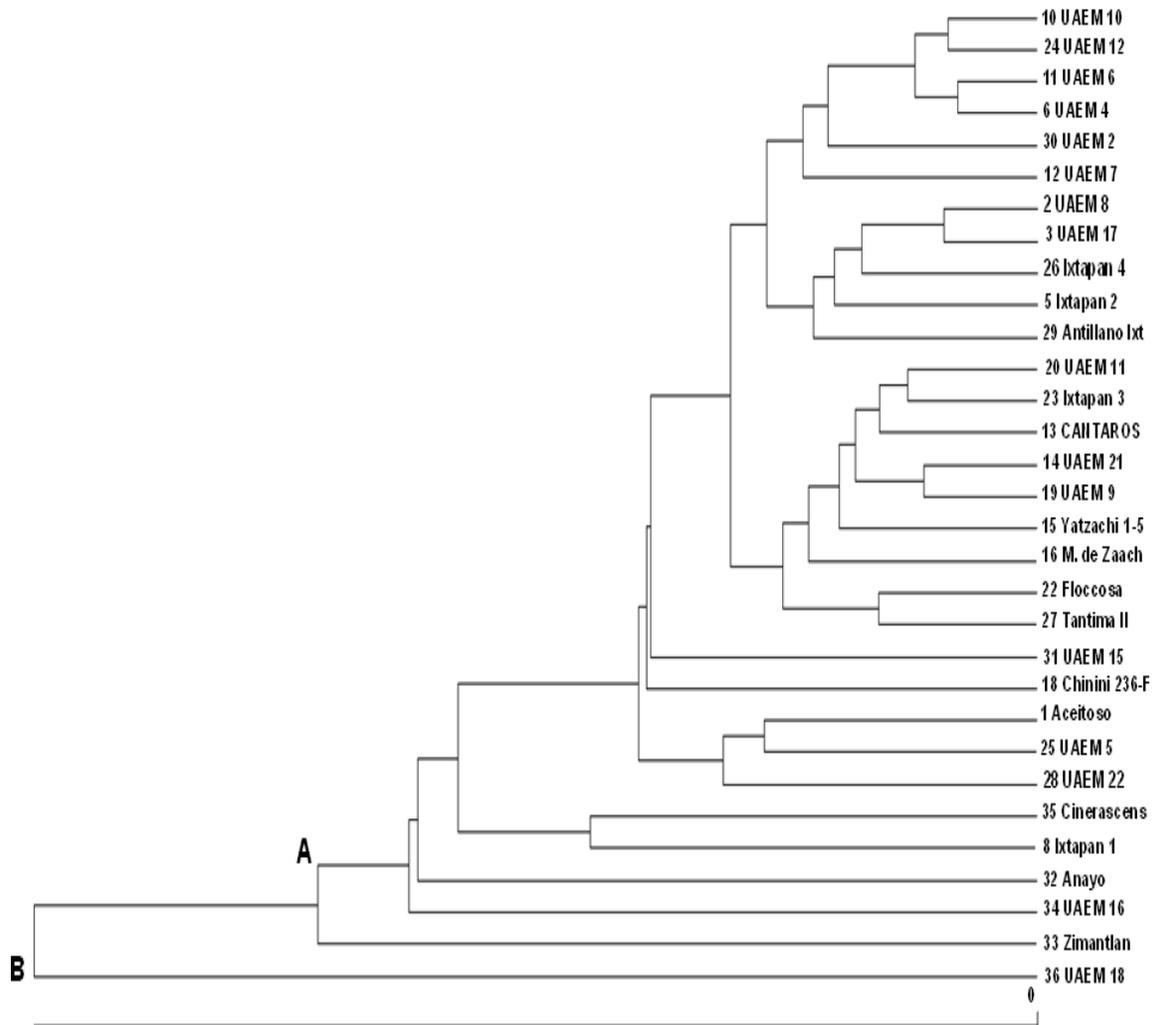


Figura 21. Dendrograma con datos ISSR mediante la distancia/matriz de similitud Nei Li/Dice- y el método de construcción UPGMA, generado de los genotipos de aguacate colectados.

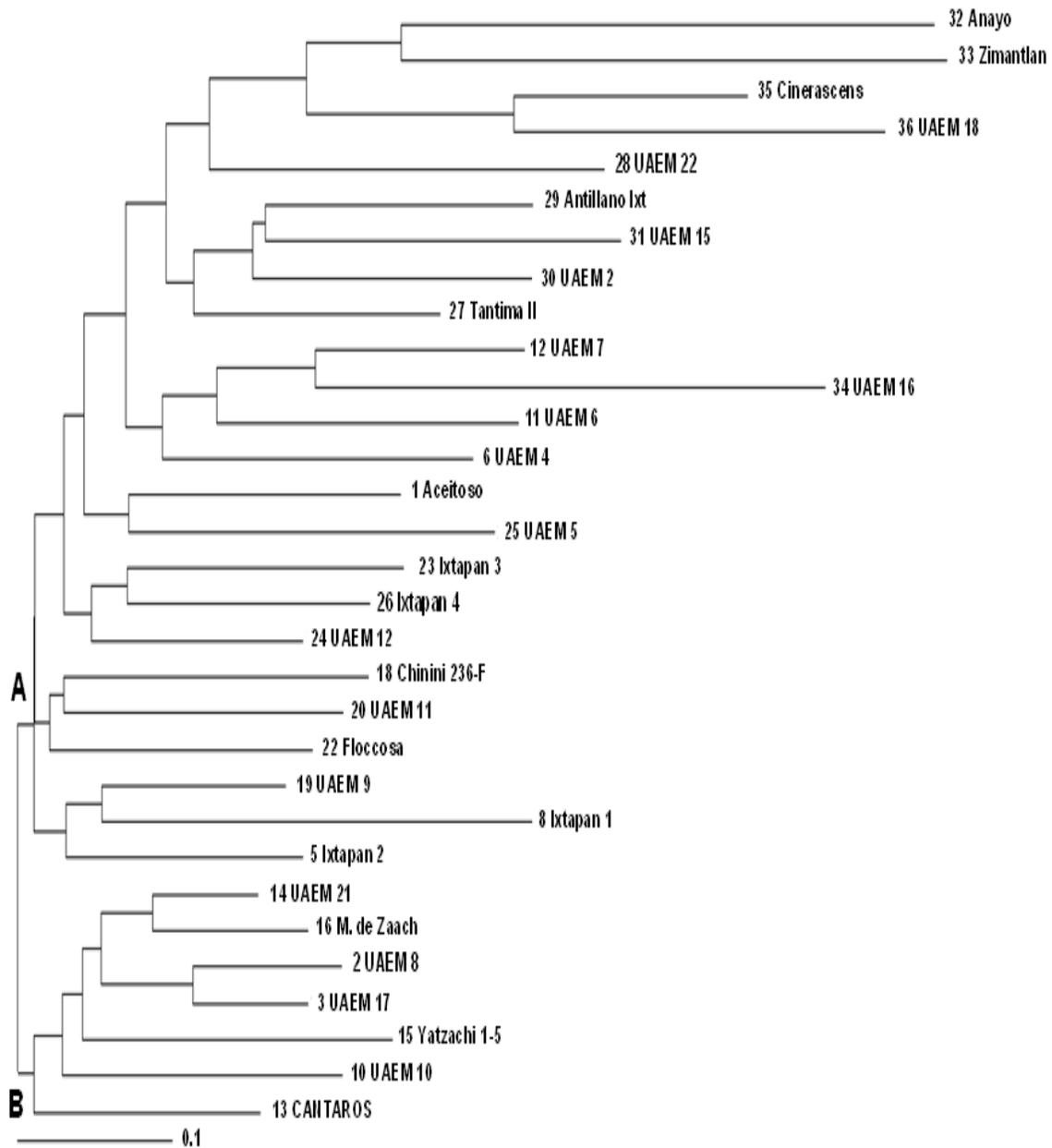


Figura 22. Dendrograma combinado con datos RAPD e ISSR mediante la distancia/matriz de similitud Nei and Li/Dice- y el metodo de construcción Neighbor joining. (5), generado de los genotipos de aguacate colectados.

De acuerdo a los dendogramas generados y a las características de los marcadores utilizados, los RAPD agruparon con base a similitudes entre genotipos al interior de la misma especie denotando su variabilidad (ejemplo: los criollos de la raza mexicana, guatemaltecos o antillanos que pertenecen a la misma especie *Persea americana*), lo anterior expresa que aunque dichos genotipos se separan en los dendogramas, comparten bandas polimórficas semejantes que denotan similitud entre ellos semejante al estudio de Fiedler, *et al.*, (1998) quien estudió ampliamente la relación genética del aguacate mediante RAPD. Por otra parte, los ISSR que identifican fragmentos más específicos del genoma, encuentran diferencias entre especies y en el presente estudio resultaron más útiles en el análisis de la diversidad entre especies, tal es el ejemplo de genotipos como los UAEM que compartieron similitud con genotipos pertenecientes a otras especies como los “cascarudos” de Ixtapan del Oro, los “Yatsachi” de Oaxaca, *P. floccosa* de Orizaba y Estado de México y *P. shiedeana* de Veracruz quienes probablemente pueden tener semejanzas al interior de su genoma aunque estos sean genotipos de diferente origen geográfico y/o especie, por otra parte, además de los iniciadores que se utilizaron en este estudio, es posible utilizar otros primers que podrían favorecer la comprensión de la diversidad encontrada, como fue reportado por Ashworth, *et al.* (2003a) y Ashworth, *et al.* (2003b) para el estudio de diversos genotipos y/o variedades de aguacate. Asimismo no se descarta la posibilidad futura de utilizar otras técnicas de marcadores moleculares para el estudio de las presentes accesiones como los documentados por diversos investigadores (Ramírez-Isis, *et al.*, 2004; Rodríguez-Medina, *et al.*, 2003), con RFLP (Davis, *et al.*, 1998), microsatélites (Shnell, *et al.*, 2003; Borrone *et al.*, 2006; Galindo-Tovar *et al.*, 2011 y AFLP (Gutiérrez, *et al.*, 2009).

8. CONCLUSIONES

- Los dendogramas realizados con base en los polimorfismos, permitieron el agrupamiento de las colectas mediante afinidad entre razas y/o especies.
- Los marcadores RAPD en el dendograma distinguieron 2 ramas principales: La rama A agrupo a los genotipos de la UAEM, que en su mayoría son de la raza mexicana (*Persea americana* var. *Drymifolia*). La rama B agrupó a *P. cinerascens*, *Persea* sp. y *Bleishmiedia anay* (anayo), especies raras del subgénero *Eriodaphne*.
- Los polimorfismos identificados con ISSR estuvieron presentes en la mayoría de las muestras del estudio y no permitieron ramificaciones grupales entre los genotipos.
- La conjunción de polimorfismos de RAPD e ISSR solo mostraron un alejamiento del género afín *Bleishmiedia anay* (anayo de Puebla) y la especie *Persea cinerascens* (aguacate cimarrón de Orizaba y Michoacán).
- El análisis molecular sugiere que los individuos agrupados, por el análisis de dendograma, comparten similitud en su genoma probablemente como producto de hibridaciones naturales a lo largo del tiempo.
- Los marcadores moleculares tipo RAPD e ISSR resultaron eficientes en la caracterización de colectas de aguacate realizadas en el Estado de México, logrando robustecer su interpretación al combinar ambas técnicas.
- Las técnicas de lavado y de cortado del ADN de aguacate son prácticas complementarias al uso del kit de extracción que mejoraron la calidad del ADN durante el proceso de generación de los polimorfismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashwort, V.E.T.M., Kobayashi, M.C., De La Cruz, M. and M. T. Clegg. 2003a. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae* 101: 255-267.
- Ashworth, V. E. T. M. and M. T. Clegg. 2003b. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94 (5): 407-415.
- Barrientos-Priego A. 2014. Use of molecular and biochemical techniques for plant variety identification. Seminar on plant variety protection (PVP): Opportunities for plant breeding and development of agriculture sector. Colegio de Postgraduados Campus montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Barrientos-Priego. A. F. y Luis López L. 2000. Historia y genética del aguacate. *In*. Téliz D. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi-prensa, México. pp. 3-15.
- Bergh, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 76: 61-75.
- Bergh, B. and N. C. Ellstrand. 1987. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-145.
- Borrone J. W., Schenell, R.J., Violi H. A., Ploetz R.C., 2006. Seventy microsatellite markers from *Persea Americana* Miller (avocado) expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes* 7: p.p 439- 444.:
- Borys, M. W., H. Leszka-Borys, S. Ramírez-Marañón, and L. Castro. 1993. An avocado relative: *Bleischmiedia anay* (Blake) Kosterm. fruit source. *California Avocado Society Yearbook* 79: 125-136.
- Buffler G. and J Fiedler 1992. A study of the avocado genetic resources, GIARA-88- 4, Institut für Obst-, Gemüse- und Weinbau, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

- Buffler, G. and J. Fiedler. 1996. Avocado genetic resources. Final Report. GIARA B-14 Julio, 1996. 50 pp.
- Calabresse F. 1992. El Aguacate. Edit. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 13-1
- Campos R., E., Terrazas, T. and L. López-Mata 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 249-258.
- Chanderbali, A. S., van der Werff, H and S. S. Renner 2001. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(1): 104-134.
- Chen, H., Morrell, P. L. and M. T. Clegg. 2007. Neucleotide diversity, and genealogical relationships in wild and cultivated avocados (*Persea americana* Mill). (en impresión).
- Clegg, M. T., Kobayashi, M. and J. Z. Lin. 1999. The use of molecular markers in the management and improvement of *Persea americana* Mill. Proc. IV World Avocado Congress, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. 5:227-231.
- Cuiris Pérez H., Guillén Andrade H., Pedraza Santos M.E., López Medina J., y Vidales Fernández I. 2009. Variabilidad Genética dentro de la Raza Mexicana de Aguacate (*Persea americana* Mill.) Determinada por ISSRs. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 15 (2): p.p 169- 175.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., and Clegg, M. T. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analysis. *Journal of Heredity* 89(4): 319-322.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fiedler, J., Buffler, G. and F. Bangerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill) using RAPD markers. *Euphytica* 101: 249-255.
- Gaertner, J. (1805). *De Fructibus et Seminibus Plantarum* Leipzig, Richter 3, 22.
- Galindo Tovar Ma. Elena, Arzate Fernández A. M., Ogata Aguilar N., Murguía González J., Lee Espinosa H. y Landero Torres I. 2008. Origen y Domesticación del Aguacate (*Persea americana* Mill.) en Mesoamérica. XXI

- Reunión Científica- Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y del Trópico Mexicano 2008. Platica Doctoral. p.p. 516- 521.
- Galindo-Tovar Ma. Elena., Milagro-Pérez Pedro Arnulfo., Alejandro-Rosas Jorge Alberto., Leyva-Ovalle Otto Raúl, Landero-Torres Ivonne, Lee-Espinoza Hilda y Murguía-González Joaquín. 2011. Relaciones Genéticas del Aguacate (*Persea americana* Mill.) En siete municipios del Centro de Veracruz, Caracterizadas con Microsatélites. Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems, Vol 13: p.p 339- 346.
- García, A. 1970. Estudio botánico-citológico del “Canelillo” (*Persea* af. *cinerascens*, Blake) su posible utilización. Agrociencia 5(1): 119-127.
- Gutiérrez-Díez A., Martínez-de la Cerda J., García-Zambrano E., Iracheta - Donjuan L., Ocampo-Morales J. y Cerda-Hurtado I. M. 2009. Estudio de Diversidad Genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Revista Fitotécnica Mexicana. pp. 9-18.
- Hidalgo R. 2003. Variabilidad Genética y Caracterización de especies Vegetales. In: Franco, T.L.; Hidalgo, R (eds.) Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fologenéticos. Boletín técnico núm. 8 IPGRI, Cali, Colombia. pp. 2- 26.
- Karp, A., y Edwards, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea-Lauracea*). Mem. New York Bot. Gard. 14: 1-117.
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea-Lauracea*). Mem. New York Bot. Gard. 14: 1-117.
- Lavi U., Hillel J., Vainstein A., Lahav E y Sharon D. 1991. Application of DNA Fingerprints for Identification and Genetic Analisis of Avocado. Departament of fruit trees, Genetis and Breeding, Agricultural Research Organization, Bet- Dagan, Israel. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 (6): 1078-1081. 7 p.

- López Gómez R., Torres Cárdenas Y., Chávez Moctezuma M., Salgado Garciglia R., Jiménez Moraila B., Corona Armenta G. y Herrera Estrella L. 2007. Genómica del fruto de aguacate criollo (*Persea americana* Mill. Var. *Drymifolia*). Instituto de Investigaciones Químico- Bilógicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 10 p.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theor. Appl. Genet.* 94: 279-286.
- Nieto R. J. E., Ramos G. L. y Motte D. E. 2005. Extracción y purificación de ADN de *Tectona Grandis* L. para su empleo en la Técnica RAPD. *Foresta Veracruzana*, año/vol, 7. Número 002. Universidad Veracruzana. Xalapa, México. pp. 1-6.
- Obesa Almeida L. 2010. Ingeniería Genética. Departamento Didáctico: Ciencias Naturales. 2º BACH-V. Monografías. España. 19 pp.
- Pavlicek A., Hrdá S., Flegr J. 1999. Free Tree freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)* 45 (3). p.p. 97-99.
- Ramírez-Isis M., Rodríguez N. N., Valdés-Infante Juliette., Capote Maricela., Becker D. y Rohde W. 2004. Isolation of Genomic DNAs from the Tropical Fruit Trees Avocado, Coconut, Guava and Mango for PCR- Based DNA Marker Application. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, No. 1. pp. 33- 38.
- Rentaría Alcántara M. 2005. Breve revisión de los marcadores moleculares. Capítulo 18: Disponible en; www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap-18.pdf. Consultado 12 de enero, 2013.
- Reyes Alemán J. C. 2008. Estudio de la Diversidad Genética en *Persea*. De un Banco de Germoplasma Mediante Marcadores RAPD e ISSR. Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. 28 p.p.
- Riepl M., Graehl H., Funk H., Gawanbacht A., Klopocki E. and R. Kartha. The nanophotometertm Pearl- Comparison of the performance characteristics of

- the new nanophotometertm Pearl and the nanodrop 2000c. [en línea]. Application note (2011). IMPLEN GmbH Inc. Direction. <http://ww1.prweb.com/prfiles/2011/02/21/569654/NanoPhotometerPearlNanoDrop.pdf> [consultado: 16 de junio de 2015].
- Rodríguez Medina, N. N., Rhode, W., González, C., Ramírez, I.M., Fuentes, J. L., Román, M. A., Xiqués, X, Becker, D y J. B. Velázquez. 2003. Caracterización morfológica, bioquímica y Molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill) en Cuba. Memoria de resúmenes del V Congreso Mundial del aguacate del 19 al 24 de octubre. Málaga, España. pp. 47-49.
- Saghai Maroof 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 (ribosomal DNA spacer – length variation/restriction fragment – length polymorphisms/Rrnl/Rrn2). Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 8014 – 8018.
- Schroeder C. A. 1974. *Persea shiedeana*, the coyo, a possible rootstock for avocado in South Africa. Year book. California Avocado Society. 57:18-24.
- Schroeder, C. A. 1951. Avocado materials for horticultural research. California Avocado Society Year book 35: 107-112.
- Semagn K., Bjorstand K., y Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal Biotechnology. p.p 1-29.
- Sharon, D., Cregan, P.B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav, E. and U. Lavi. 1997. An integrated genetic linkage map of avocado. Theor. Appl. Genet. 95: 911-921.
- Sharon, D., Hillel, J., Mhameed, S., Cregan, P., Lahav, E. and U. Lavi. 1998. Asociation between DNA markers and locing controlling avocado traits. Journal of the American Society for horticultural science 123(6): 1016-1022.
- Shieber E. and G. A. Zentmyer. 1978. Hunting for *Persea steyermarkii* in the mountains of Guatemala. California Avocado Society 62:67-71.

- Shnell, R.J., Brown, J.S., Olano, C.T., Power, E.J., Krol, C.A., Kuhn, D.N. and D.N. Motamayor. 2003. Evaluation of avocado germoplasm using microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(6): 881-889.
- Storey, W. B., Bergh, B.O. and G. A. Zentmyer 1986. The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Year book* 70: 127-133.
- Torres Tejeda A. G. y Baca B. Eugenia. 1995. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Centro de Investigaciones Microbiológicas. Instituto de Ciencias Universidad Autónoma de Puebla. Elementos No. 23. Vol. 3. pp. 16-21.
- Tsu-liang, Ch., Ming-te, L., Chien-an, L. and Ch. lou-zen. 2003. Genetic diversity analysis of Taiwan avocado accessions. *Proceedings V World Avocado Congress*. Málaga, España. pp. 55-59.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. D.F., México 147 p.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central América. *Novon* 12(4): 575-586.
- Velasco Mosquera R. 2005. Marcadores Moleculares y la Extracción del ADN. Grupo de investigación ASUBAGROIN FCA Unicauca (Universidad del Cauca Colombia). Facultad de Ciencias Agropecuarias. p.p 14-18.
- Watson J. D., Gilman M., Witkowski J. and M. Soller. 1992. The polymerase chain reaction. pp 79-95. *In* Watson J. D., Gilman M., Witkowski J. and M. Soller (eds.). *Recombinant DNA*. 2nd ed. Scientific American Books. New York. USA. 626 p.
- Weising K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, Fl. 445 p.
- Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Econ. Bot.* 31: 315-320.

IV.- ANEXOS

Matrices de distancias de similitud obtenidas mediante RAPD e ISSR

	1 Aceitos	2 UAEM	3 UAEM	4 UAEM	5 IXTAPA	6 UAEM	7 UAEM	8 IXTAPA	9 Cascle	10 UAEM	11 UAEM	12 UAEM	13 CANT	14 UAEM	15 Yatza	16 M. de	17 Yatza	18 Chirin	19 UAEM	20 UAEM	21 Guate	22 Flocc	23 Ixtapa	24 UAEM	25 UAEM	26 Ixtapa
1 Aceitos		0.59574	0.60000	0.76923	0.72917	0.80000	0.72093	0.77551	0.97059	0.80851	0.84091	0.94286	0.68000	0.64583	0.70000	0.69565	0.67391	0.73214	0.72222	0.65306	0.80488	0.67391	0.70455	0.69231	0.71111	0.75000
2 UAEM	0.59574		0.51064	0.60870	0.70213	0.87500	0.69048	0.66667	0.97059	0.75556	0.78571	0.97222	0.73077	0.55556	0.64583	0.60465	0.61364	0.70909	0.64706	0.75472	0.83333	0.78000	0.81250	0.69231	0.73913	0.78378
3 UAEM	0.60000	0.51064		0.64000	0.64583	0.81633	0.65909	0.72000	0.94595	0.69565	0.82979	0.94872	0.75000	0.50000	0.62000	0.60870	0.70000	0.61111	0.59615	0.62745	0.73810	0.70000	0.75510	0.66667	0.73469	0.83333
4 UAEM	0.76923	0.60870	0.64000		0.62791	0.81818	0.79545	0.76596	0.93548	0.85106	0.67568	0.97059	0.74510	0.68750	0.81132	0.73913	0.74468	0.74545	0.68627	0.76923	0.82500	0.86538	0.85417	0.75472	0.69767	0.89744
5 IXTAPA	0.72917	0.70213	0.64583	0.62791		0.83333	0.61111	0.58974	1.00000	0.65789	0.85000	0.96774	0.61364	0.57143	0.72340	0.62500	0.56410	0.53333	0.57778	0.72917	0.66667	0.69767	0.76190	0.63043	0.67500	0.78788
6 UAEM	0.80000	0.87500	0.81633	0.81818	0.83333		0.77143	0.73684	1.00000	0.90000	0.91667	1.00000	0.82609	0.82222	0.79545	0.82927	0.88636	0.84314	0.78723	0.77273	0.94286	0.86047	0.95349	0.80851	0.78947	0.96875
7 UAEM	0.72093	0.69048	0.65909	0.79545	0.61111	0.77143		0.60000	1.00000	0.71429	0.82353	0.91667	0.75000	0.65000	0.68293	0.59882	0.64865	0.69565	0.61905	0.80435	0.73333	0.71795	0.75676	0.76087	0.76316	0.86667
8 IXTAPA	0.77551	0.66667	0.72000	0.76596	0.58974	0.73684	0.60000		1.00000	0.68421	0.81579	0.96667	0.69565	0.65909	0.68889	0.65000	0.69048	0.70000	0.63043	0.77551	0.80596	0.72093	0.81395	0.73469	0.84444	0.88571
9 Cascle	0.97059	0.97059	0.94595	0.93548	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000		1.00000	1.00000	1.00000	0.97059	0.96970	0.96970	1.00000	0.96552	0.94737	0.94444	0.93939	0.87500	0.96552	0.91667	0.97222	0.96154	1.00000
10 UAEM	0.80851	0.75556	0.69565	0.85106	0.65789	0.90000	0.71429	0.68421	1.00000		0.89189	0.96154	0.66667	0.55263	0.65854	0.61111	0.78571	0.61364	0.59524	0.75556	0.78125	0.69231	0.79487	0.79167	0.73684	0.87097
11 UAEM	0.84091	0.78571	0.82979	0.67568	0.85000	0.91667	0.82353	0.81579	1.00000	0.89189		0.95238	0.78571	0.83721	0.88889	0.78378	0.87805	0.85714	0.87500	0.86667	0.93750	0.87805	0.89474	0.87234	0.92500	0.92857
12 UAEM	0.94286	0.97222	0.94872	0.97059	0.96774	1.00000	0.91667	0.96667	1.00000	0.96154	0.95238		0.97222	0.97143	0.97143	0.96667	0.96774	0.97561	0.97436	1.00000	0.94737	0.96774	0.92308	0.94595	1.00000	0.93333
13 CANT	0.68000	0.73077	0.75000	0.74510	0.61364	0.82609	0.75000	0.69565	0.97059	0.66667	0.78571	0.97222		0.61702	0.72549	0.69565	0.61364	0.63462	0.67308	0.70588	0.80488	0.67391	0.70455	0.71698	0.71111	0.81579
14 UAEM	0.64583	0.55556	0.50000	0.68750	0.57143	0.82222	0.65000	0.65909	0.96970	0.55263	0.83721	0.97143	0.61702		0.54545	0.40541	0.69565	0.47826	0.45455	0.72549	0.73684	0.63636	0.78261	0.66000	0.60976	0.87179
15 Yatza	0.70000	0.64583	0.62000	0.81132	0.72340	0.79545	0.68293	0.68889	0.96970	0.65854	0.88889	0.97143	0.72549	0.54545		0.56098	0.69565	0.57143	0.66667	0.75000	0.82927	0.66667	0.75556	0.63265	0.67442	0.92683
16 M. de	0.69565	0.60465	0.60870	0.73913	0.62500	0.82927	0.58882	0.65000	1.00000	0.61111	0.78378	0.96667	0.69565	0.40541	0.56098		0.65854	0.52273	0.60000	0.80000	0.73529	0.65854	0.81395	0.65217	0.59459	0.85294
17 Yatza	0.67391	0.61364	0.70000	0.74468	0.56410	0.88636	0.64865	0.69048	0.96552	0.78571	0.87805	0.96774	0.61364	0.69565	0.69565	0.65854		0.59574	0.60870	0.75510	0.74286	0.66667	0.73171	0.68750	0.76744	0.82353
18 Chirin	0.73214	0.70909	0.61111	0.74545	0.53333	0.84314	0.69565	0.70000	0.94737	0.61364	0.85714	0.97561	0.63462	0.47826	0.57143	0.52273	0.59574		0.35556	0.60784	0.68293	0.53333	0.70833	0.59615	0.63043	0.88889
19 UAEM	0.72222	0.64706	0.59615	0.68627	0.57778	0.78723	0.61905	0.63043	0.94444	0.59524	0.87500	0.97436	0.67308	0.45455	0.66667	0.60000	0.60870	0.35556		0.67308	0.66667	0.57778	0.72340	0.60784	0.64444	0.85714
20 UAEM	0.65306	0.75472	0.62745	0.76923	0.72917	0.77273	0.80435	0.77551	0.93939	0.75556	0.86667	1.00000	0.70588	0.72549	0.75000	0.80000	0.75510	0.60784	0.67308		0.71053	0.72917	0.73333	0.66667	0.81633	0.84615
21 Guate	0.80488	0.83333	0.73810	0.82500	0.66667	0.94286	0.73333	0.80596	0.87500	0.78125	0.93750	0.94737	0.80488	0.73684	0.82927	0.73529	0.74286	0.68293	0.66667	0.71053		0.66667	0.66667	0.72500	0.75758	0.72727
22 Flocc	0.67391	0.78000	0.70000	0.86538	0.69767	0.86047	0.71795	0.72093	0.96552	0.69231	0.87805	0.96774	0.67391	0.63636	0.66667	0.65854	0.66667	0.53333	0.57778	0.72917	0.66667		0.66667	0.65957	0.64103	0.78788
23 Ixtapa	0.70455	0.81250	0.75510	0.85417	0.76190	0.95349	0.75676	0.81395	0.91667	0.79467	0.89474	0.92308	0.70455	0.78261	0.75556	0.81395	0.73171	0.70833	0.72340	0.73333	0.66667	0.66667		0.74468	0.77500	0.80000
24 UAEM	0.69231	0.69231	0.66667	0.75472	0.63043	0.80851	0.76087	0.73469	0.97222	0.79167	0.87234	0.94595	0.71698	0.66000	0.63265	0.65217	0.68750	0.59615	0.60784	0.66667	0.72500	0.65957	0.74468		0.63636	0.82500

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS DE
Persea

Ramírez Mendoza María del Carmen¹, Reyes Alemán Juan Carlos¹, Mejía Carranza Jaime¹, Vázquez García Luis Miguel¹, Flores Ayala Felipe, Aguilar Medel Sotero¹ y Berdeja Arbeu Raúl²
¹Centro Universitario UAEM Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México. Carr. Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5. Tenancingo, Estado de México. C.P. 52400, reyesaleman@hotmail.com ²Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ingeniería Agrohídrica. San Juan Acateno, domicilio conocido, Teziutlán, Puebla, C. P. 73965

Resumen

En el sentido de la búsqueda de germoplasma nativo que constituye la base genética para enfrentar problemas de plagas, condiciones adversas de suelo, escasez de agua, necesidad de portainjertos tolerantes o desarrollo de nuevas variedades, se han realizado acciones de seguimiento que incluyen; Exploración, Conservación y Caracterización de germoplasma del género *Persea* en el aspecto de caracterización, han sido identificados 29 genotipos sobresalientes en el Estado de México y se ha iniciado la caracterización genética molecular del germoplasma conservado *In Situ* por los pobladores del Estado de México. El estudio de caracterización comprende la descripción de los genotipos pertenecientes a las especies: *Persea americana* (razas mexicana, antillana y guatemalteca), *P. hintoni*, *P. shiedeana*, *P. cinerascens*, *P. floccosa* e híbridos de la raza guatemalteca. Los genotipos han sido colectados en el Estado de México y otros en Puebla y Oaxaca. Se han encontrado algunos tipos raros de hojas grandes, pubescente y frutos de cáscara gruesa semejantes a *P. floccosa* en el Estado de México e híbridos de la raza guatemalteca en Oaxaca. Se han identificado morfológicamente 31 caracteres cuantitativos y 55 caracteres cualitativos para cada accesión en cuanto a: hoja, flor, fruto y/o semilla y se realiza la adecuación de la técnica de extracción de DNA y el corrimiento de análisis tipo RAPDs de las muestras.

Palabras clave: *Germoplasma, Colectas, Aguacate, Caracterización*

Abstract

In the sense of finding native germplasm as the genetic basis to face pest problems, adverse soil conditions, water shortages, tolerant rootstocks or new varieties, there have been follow-up actions like; exploration, germplasm conservation and characterization of the genus *Persea* in the aspect of characterization, have been identified 29 outstanding genotypes in the State of Mexico and we have started a molecular genetic characterization of germplasm held *In Situ* by the natives. The characterization study includes the description of the genotypes of the species: *Persea americana* (mexican, west indian and guatemalan races), *P. hintoni*, *P. shiedeana*, *P. cinerascens*, *P. floccosa* and a hybrid Guatemalan race. The genotypes have been collected in the State of Mexico and others like Puebla and Oaxaca. We have found some rare types of large pubescent leaves and thick shell fruit like *P. floccosa* in the State of Mexico or hybrids Guatemalan race in Oaxaca. It has been identified morphologically 31 quantitative and 55 qualitative characters for each accession in leaf, flower, fruit and/or seed and it is being adapted the technique of DNA extraction and RAPDs analysis for the samples.

Key words: *Germplasm, Accession, Avocado, Characterization*

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill) pertenece a la familia Lauraceae; En la actualidad el aguacate es uno de los cultivos más importantes en México, siendo este el mayor productor y consumidor de aguacate en

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

todo el mundo y su principal Estado productor es Michoacán con la variedad "Hass". Similarmente, México es el principal exportador a nivel mundial pero a pesar de su gran importancia para México poco se ha valorado su diversidad genética (López-Gómez *et al.*, 2007).

En el Centro Universitario UAEM Tenancingo se han identificado 29 accesiones, estas fueron caracterizadas morfológicamente (Reyes-Alemán *et al.*, 2012) pero poco se sabe de su base genética. En la actualidad se han realizado estudios en el genoma del aguacate para poder conocer las diferencias o similitudes que pudieran llegar a existir a nivel del ADN entre estos individuos, estos estudios han aportado elementos que ayudan a distinguir razas y especies además de constituirse como complemento de los caracteres morfológicos para lograr una identificación y descripción más acertada. De tal manera que el objetivo del presente estudio fue conocer la diversidad genética del aguacate prevaleciente en el Estado de México y estados vecinos mediante herramientas morfológicas y moleculares.

Los diversos marcadores moleculares se pueden clasificar en diferentes grupos con base en: a) modo de transmisión (herencia nuclear biparental, herencia nuclear materna, orgánulo maternal), b) modo de acción de los genes (marcadores dominantes o codominantes) y c) método de análisis (basado en la hibridación o PCR). En el Cuadro 1 se describen las características de los marcadores moleculares más utilizados de acuerdo a Semagn *et al.* (2006) en trabajos de caracterización.

Cuadro 1. Comparación de los 5 marcadores moleculares más usados (Tomado de Semagn *et al.* 2006)

	RFLP	Micro satélite	RAPD	AFLP	ISSR
Abundancia genómica	Alto	Medio	Muy alto	Muy alto	Medio
Parte de genoma examinado	Baja copia de regiones codificadas	Genoma entero	Genoma entero	Genoma entero	Genoma entero
Cantidad de ADN requerido	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Bajo
Tipo de polimorfismo	Cambios de base individual Inserción/ Delección	Cambios en longitudes de repeticiones	Cambios de base individual Inserción/ Delección	Cambios de base individual Inserción/ Delección	Cambios de base individual Inserción/ Delección
Nivel de polimorfismo	Medio	Alto	Alto	Muy alto	Alto
Efecto múltiple de proporción	Bajo	Medio	Medio	Alto	Medio
Índice de marcador	Bajo	Medio	Medio	Alto	Medio
Herencia	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Dominante
Detección de alelos	Si	Si	No	No	No
Facilidad de uso	Labor intensivo	Fácil	Fácil	Difícil de iniciar	Fácil
Reproducibilidad (fiabilidad)	Alto	Alto	Intermedia	Alto	Medio a alto
Tipo de sonda/ primers	Baja copia genómica de ADN o clones cADN	Secuencia específica de repetición de ADN	Usualmente 10 pb Nucleótidos hechos al azar	Secuencia específica	Secuencia específica repetición de ADN
Clonación y/o secuenciación	Si	Si	No	No	No
Detección radioactiva	Si usualmente	No	No	Si/no	No
Desarrollo/ alto costo	Alto	Alto	Bajo	Medio	Medio
Utilidad para cartografía genética	Especies específicas	Especies específicas	Cruzas específicas	Cruzas específicas	Cruzas específicas

La descripción de las plantas, esta se hace de manera tradicional por caracterización fenotípica, procedimiento lento y limitado porque la expresión de los caracteres cuantitativos está sujeta a fuerte influencia ambiental, por lo que con el empleo de marcadores moleculares se identifica y conoce la diversidad genética existente en los genomas de las plantas (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009). Los datos moleculares tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de la mayoría de los caracteres morfológicos se asume, de esta forma los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismo en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Rentarfa-Alcántara, 2005).

Todo organismo contiene una enorme cantidad de información, la cual se encuentra almacenada en una macro molécula, que se halla en todas las células: el ADN, a su vez se encuentra dividido en una gran cantidad de subunidades llamadas genes. Cada gen contiene la información necesaria para que la célula sintetice una proteína, así, el genoma es el responsable de las características del individuo (Obesa-Almeida, 2010).

Materiales y Métodos

Se recolectó material vegetal en los sitios de origen, estos fueron geo posicionados *In vivo* mediante GPS. Las muestras colectadas fueron identificadas, para cada árbol se tomaron de 5 a 10 repeticiones según la estructura del árbol encontrada.

Preparación del material vegetal: Para realizar la extracción de ADN se realizó la maceración de las hojas utilizando un mortero y mazo así mismo se le agregó nitrógeno líquido con la finalidad de su pulverización, el polvo obtenido se depositó en tubos eppendorf para almacenarse en el ultracongelador.

Extracción del DNA: La extracción y purificación del DNA se trabajó utilizando el método del CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) basado en los protocolos de Saghai-Marooof *et al.* (1984).

Electroforesis en gel: El corrimiento de los geles se hizo en agarosa para determinar la calidad y pureza del DNA extraído, así como el detectar la presencia de los polimorfismos esperados.

Amplificación del DNA: La amplificación del DNA fue mediante la técnica de PCR en el termociclador. **Análisis tipo RAPDs:** Se realizaron corrimientos mediante el uso de diferentes iniciadores tipo RAPDs (Cuadro 2).

Cuadro 2. Marcadores tipo RAPDs utilizados en el estudio.

Primers *RAPD	Secuencia 5'-3'
A 15	TTC CGA ACC C
C 10	TGT CTG GGT G
C 13	AAG CCT CGT C
C 08	TGG ACC GGT G
E 07	AGA TGC AGC C
E 14	TGC GGC TGA G
E 16	GGT GAC TGT G
E 18	GGA CTG CAG A

*SIGMA ALDRICH®

Resultados y Discusión

Ha sido posible obtener DNA de calidad de las muestras observadas y los marcadores moleculares tipo RAPDs han permitido la obtención de bandas que facilitan la generación de agrupamientos de los genotipos. De acuerdo a lo analizado hasta el momento se ha observado una tendencia de agrupamiento entre los representantes de la especie *Persea americana* var. *drymifolia* (raza mexicana) como el grupo más numeroso, junto a la var. *americana* (raza antillana) y la variedad *guatemalensis* (raza guatemalteca), de manera más distante los genotipos correspondientes la especie *Persea floccosa* y *Persea shiedeana*.

Dichos agrupamientos han sido contrastados con los agrupamientos generados de tipo morfológico, a la fecha ha sido posible describir morfológicamente en los genotipos de estudio a 31 caracteres cuantitativos y 55 caracteres cualitativos de acuerdo a UPOV (2006) e IPGRI (1995) como se observa en el cuadro 3.

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

Cuadro 3. Caracteres cualitativos y cuantitativos identificados en los genotipos de *Persea*.

Carácter	Cuantitativos	Cualitativos						
Desarrollo Vegetativo	Extensión del crecimiento de los vástagos Longitud de entrenudos de los vástagos Diámetro de los vástagos Longitud del peciolo hojas maduras Área foliar (longitud, ancho relación largo ancho) Número de venas secundarias	Hábito del árbol Angulo de inserción de las ramas principales Color de vástagos jóvenes Lenticelas de vástagos jóvenes Color lenticelas vástagos jóvenes Superficie de vástagos jóvenes Color del ápice del vástago Superficie del apice del vástago Forma de la hoja Olor a anís Color de hojas maduras Color de hojas jóvenes Peciolo acanalado Angulo de inserción del peciolo foliar Margen de la hoja Angulo de las venas secundarias Forma del ápice de la hoja Forma de la base de la hoja Friabilidad de la hoja Torsión en toda la longitud Torsión del ápice Relieve de las venas en la parte superior Pubescencia en el envés Pubescencia en el has						
		Flor	Núm. de flores x inflorescencia Ancho pétalo Ancho sépalo Longitud pétalo Longitud sépalo Longitud pedicelo Longitud eje principal inflorescencia Número de ramificaciones por inflorescencia Longitud ramificación	Tipo de floración Color lenticelas inflorescencia Pubescencia del pétalo Densidad pubescencia pétalo Pubescencia sepalo Densidad pubescencia sepalo Estilo de la flor Polen Base nectario Color flor				
				Fruto	Longitud Diámetro Peso Posición del pedicelo Longitud del pedúnculo Diámetro del pedúnculo Longitud del pedicelo Diámetro de la base del pedicelo (mm) Diámetro del ápice pedicelo (mm) Grosor de la cascara	Forma de la base Forma del ápice Aristas del Tamaño de lenticelas Densidad de lenticelas Color lenticelas Lenticelas corchosas Color de la cascara Brillantes de la cascara Distinción de la unión del pedicelo al pedúnculo Forma del pedicelo Pedicelo en forma de cabeza de clavo Color del pedicelo		
						Semilla	Longitud de la cavidad Diámetro de la cavidad Longitud de la semilla Diámetro de la semilla Peso de la semilla Porcentaje de la semilla relativa al peso del fruto	Cubierta de la semilla Espacio libre de la cavidad de la semilla Forma de la semilla Superficie del cotiledón Adherencia de los cotiledones Color del cotiledón Germinación de la semilla en fruta madura Forma de la sección transversal

Los genotipos analizados que han sido identificados y ubicados mediante exploración y colecta se enlistan en el cuadro 3 así como su origen, coordenadas geográficas y probable parentesco.

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

Cuadro 3. Genotipos nativos colectados en el Estado de México y conservados *In Situ*.

Nombre / del genotipo	Sitio de colecta	Coordenadas y altura sobre el nivel del mar	Material colectado	Probable raza o parentesco
1	Ixtapan / 1	Ixtapan del Oro Estado de México 1706 msnm	19°16'20.1", 100°15'21.1" Hoja.	<i>Persea floccosa</i>
2	Ixtapan / 2	Ixtapan Del Oro Estado de México 1740 msnm	19°16'24.9", 100°15'24" Flor. Fruto Hoja.	<i>Persea floccosa</i>
3	Ixtapan/ 3	Ixtapan del Oro Estado de México 1743 msnm	19°16'26.3", 100°15'22.4" Hoja. Flor.	<i>Persea floccosa</i>
4	UAEM / 1	Centro Universitario UAEM Tenancingo 2064 msnm	18°58'5.23", 99°36'45.08" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
5	UAEM/2	Centro Universitario UAEM Tenancingo 2064 msnm	18°58'5.57", 99°36'45.19" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
6	UAEM /3	Centro Universitario UAEM Tenancingo 2063 msnm	18°58'5.9", 99°36'45.15" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
7	UAEM/ 4	Centro universitario UAEM Tenancingo 2062 msnm	18°58'6.13", 99°36'45.0" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
8	UAEM/5	Centro universitario UAEM Tenancingo 2062 msnm	18°58'6.37", 99°36'45.0" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
9	UAEM/6	Centro universitario UAEM Tenancingo 2062 msnm	18°58'6.84", 99°36'45.54" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
10	UAEM/7	Centro universitario UAEM Tenancingo 2064 msnm	18°58'6.66", 99°36'46.42" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
	UAEM/8	Centro universitario UAEM Tenancingo 2064 msnm	18°58'6.18", 99°36'46.0" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
12	UAEM/9	Centro universitario UAEM Tenancingo 2064 msnm	18°58'6.17", 99°36'45.96" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
13	UAEM/10	Centro universitario UAEM Tenancingo 2063 msnm	18°58'6.25", 99°36'45.86" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
14	UAEM/12	Centro universitario UAEM Tenancingo 2065 msnm	18°58'6.50", 99°36'47" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
15	UAEM/13	Centro universitario UAEM Tenancingo 2065 msnm	18°58'6.41", 99°36'46.86" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
16	UAEM/14	Centro universitario UAEM Tenancingo 2065 msnm	18°58'6.16", 99°36'47.17" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
17	UAEM/15	Centro universitario UAEM Tenancingo 2065 msnm	18°58'6.14", 99°36'47.0" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
18	Zumpahuacan/1	San Pedro Guadalupe, Zumpahuacan Edo. México 1812 msnm	18°49'11.76", 99°32'11.67" Hoja. Fruto.	<i>Persea floccosa</i>
19	Zumpahuacan/2	San Pedro Guadalupe, Zumpahuacan Edo. México 1815 msnm	18°49'11.41", 99°32'11.22" Hoja. Fruto.	<i>Persea floccosa</i>
20	Zumpahuacan/3	San Pedro Guadalupe, Zumpahuacan Edo. México 1818 msnm	18°49'11.1", 99°32'11.35" Hoja.	<i>Persea floccosa</i>
21	Zumpahuacan/4	San Pedro Guadalupe, Zumpahuacan Edo. México 1804 msnm	18°49'12.39", 99°32'10.92" hoja	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
22	Zumpahuacan/5	San Pedro Guadalupe, Zumpahuacan Edo. México 1804 msnm	18°49'12.44", 99°32'10.88" Hoja. Fruto.	<i>Persea floccosa</i>
23	Pilar/1	El Batán Mun. Donato Guerra, México 2235 msnm	19°19'39.31", 100°07'55.73" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
24	Pilar/2	El Batán Mun. Donato Guerra Estado de México 2241 msnm	19°19'39.73", 100°07'52.89" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
25	Pilar/3	El Batán Mun. Donato Guerra Estado de México 2242 msnm	19°19'38.76", 100°07'52.99" Hoja. Fruto.	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>
26	Guatemalteco/63	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México 2230 msnm	18°55'11.86", 99°45'33.34" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
27	Guatemalteco/ 114 (Olanca 2S3)	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México 2230 msnm	18°55'11.76", 99°45'33.12" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>Guatemalensis</i>
28	Antillano/102 (Marichal)	Rancho la Cruz, Coatepec Harinas, Estado de México 2227 msnm	18°55'14.28", 99°45'32.87" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>
29	Antillano Ixtapan	Rancho la Cruz, Harinas, Estado de México 2228 msnm	18°55'12.14", 99°45'31.75" Hoja.	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>

Conclusiones

Es necesario continuar analizando la información generada en el corto plazo con el fin de lograr integrar la información tanto morfológica como molecular y conocer el grado de semejanza que muestran y su

eficiencia en lograr distinguir entre razas y especies a los genotipos del género *Persea*. La caracterización morfológica y molecular en conjunto podría representar la manera más apropiada en analizar la diversidad genética del aguacate.

Agradecimientos

Se agradece el gran apoyo brindado al presente proyecto a través del convenio PROMEP-SEP 103.5/12/804810. Se agradece al Centro Universitario UAEM-Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México por todas las facilidades brindadas. Se agradece al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) SNICS-SAGARPA a través de la Red de Aguacate por todo el apoyo otorgado.

Literatura Citada

- Gutiérrez-Diez, A., Martínez de la Cerda J., García-Zambrano E., Iracheta-Donjuan L., Ocampo-Morales J. y Cerda-Hurtado I. M. 2009. Estudio de Diversidad Genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Revista Fitotécnica Mexicana. pp. 9-18.
- IPGRI. 1995. Descriptores para aguacate (*Persea* spp.) Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI-FAO). Roma, Italia. 54 p.
- López-Gómez R., Torres-Cárdenas Y., Chávez-Moctezuma M., Salgado-Garciglia R., Jiménez-Moraila B., Corona-Armenta G. y Herrera-Estrella L. 2007. Genómica del fruto de aguacate criollo (*Persea americana* Mill. Var. *Drymifolia*). Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 10 p.
- Obesa-Almeida L. 2010. Ingeniería Genética. Departamento Didáctico: Ciencias Naturales. 2º BACH-V. Monografías. España. 19 pp.
- Rentaría-Alcántara M. 2005. Breve revisión de los marcadores moleculares. Capítulo 18: Disponible en; www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap-18.pdf. Consultado 12 de enero, 2013.
- Reyes-Alemán J.C., Flores-Ayala F., Mejía-Carranza J., Vázquez-García L.M., Palma-Linares V. y Aguilar-Medel S. 2012. Germoplasma de aguacate conservado *in situ* en el estado de México: exploración y caracterización. In. Memorias XV Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas, Mexicali, Baja California, México, 25 y 26 de octubre, ISBN 978-607-607-119-9, pp.483-489.
- Saghai Maroof 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 (ribosomal DNA spacer-length variation/restriction fragment-length polymorphisms/Rml/Rm2). Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 8014-8018.
- Semagn K., Bjostrand K., y Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal Biotechnology. p.p 1-29.
- UPOV. 2006. DRAFT. Avocado (*Persea americana* Mill). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34 p.