



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN
HÍBRIDO NATURAL Y SU COMPARACIÓN CON ESPECIES DEL
GÉNERO *PERSEA***

TESIS

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

PRESENTA

MARISOL SERRANO HERNÁNDEZ

DIRECTOR:

DR. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN

ASESORES:

DR. JAIME MEJÍA CARRANZA

DR. LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA

TENANCINGO, ESTADO DE MÉXICO

OCTUBRE DE 2017



Tenancingo, México a 12 de agosto de 2015

Asunto:
Solicitud de Revisión del Protocolo de Tesis.

L. R. E. I. ELIZABETH ESTEFANÍA BRITO GARCÍA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO
DE EVALUACIÓN PROFESIONAL DEL CENTRO
UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

Estimada Lic.

La que suscribe **Marisol Serrano Hernández** pasante de la carrera de **Ingeniero Agrónomo en Floricultura** del Centro Universitario UAEM Tenancingo con número de cuenta **1127016**, solicita a usted llevar a cabo la revisión del protocolo de tesis denominado **"EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN AGUACATE**, que para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura presento.

Sin otro asunto y agradeciendo la atención brindada a la presente, envío a usted un atento saludo.

ATTE.

MARISOL SERRANO HERNÁNDEZ
Estudiante de la Carrera de
Ingeniero Agrónomo en Floricultura

VO.BO.

JUAN CARLOS REYES ALEMÁN
Director de tesis
Profesor del Centro Universitario
UAEM Tenancingo

VO.BO.

Reabi
06/08/15
E. I. Brito García

DR. JAIME MEJÍA CARRANZA
Asesor de tesis
Profesor del Centro Universitario UAEM Tenancingo



Tenancingo, Méx., a 26 de agosto de 2015

P. L. R. E. I. ELIZABETH ESTEFANIA BRITO GARCÍA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO
P R E S E N T E

Por este medio, informo que el protocolo de tesis titulado: **“Evaluación de la combinación de la caracterización morfológica y molecular en aguacate”**, presentado por **Marisol Serrano Hernández**, estudiante de la licenciatura de Ingeniero Agrónomo en Floricultura, con número de cuenta 1127016, ha sido **aceptado**.

El escrito muestra que se realizó una adecuada revisión de literatura; además en la justificación se describe de manera clara la importancia de llevar a cabo la investigación. Sin embargo, se recomienda lo siguiente:

1. Modificar la redacción del título evitando cacofonías. Se proponen como títulos alternativos:
“*Caracterización de genotipos de aguacate mediante marcadores morfológicos y moleculares*”
“*Análisis de marcadores morfológicos y moleculares para la caracterización de genotipos de aguacate*”
2. Revisar la ortografía y redacción de todo el documento.
3. Se tienen párrafos demasiado extensos, por lo que se recomienda acortarlos.
4. Uniformizar la escritura de términos.
5. Describir detalladamente la metodología para llevar a cabo el análisis molecular.
6. Describir la metodología para correlacionar los resultados obtenidos a partir de los marcadores morfológicos y moleculares.
7. Ampliar la información sobre el diseño experimental y el análisis estadístico.

En el documento se especifican las observaciones enlistadas.

En espera de que los comentarios realizados al presente protocolo de investigación sirvan de apoyo para la estudiante, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE



M. EN. C. GRISEL DOMÍNGUEZ ARIZMENDI
PROFESORA DE ASIGNATURA DE LA LICENCIATURA
DE INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA



REGISTRO DE PROTOCOLO

Nombre del alumno : Marisol Serrano Hernández		No. de cuenta: 1127016	
Licenciatura: Ingeniero Agrónomo en Floricultura	Semestre 9°	Generación : 2011-2016	
Fecha de registro: 12 de Agosto de 2015	Clave de registro IAF 2015 03	Modalidad: Tesis	

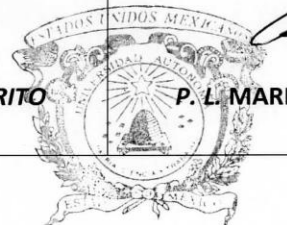
TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN:

“Evaluación de la combinación de la caracterización morfológica y molecular en aguacate”

DIRECCIÓN Y ASESORÍA

Grado académico	Nombre completo	Nombramiento
Doctor	Juan Carlos Reyén Alemán	Director
Doctor	Jaime Mejía Carranza	Asesor

Vo. Bo. Encargada del Departamento de Evaluación Profesional	Nombre y Firma del Alumno
 P.L.R.E.I. ELIZABETH ESTEFANÍA BRITO GARCÍA	 P. L. MARISOL SERRANO HERNÁNDEZ



Centro Universitario
UAEM Tenancingo

Sello Institucional





Tenancingo, México a 15 de agosto de 2017.

Asunto:

Entrega de tesis final

**L.R.E.I. PAOLA YATZIRI AYALA FRANCO
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
DEL CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**

Estimada Lic. Paola

Por medio de la presente informo a usted que la pasante de la carrera de Ingeniero Agrónomo en Floricultura **Marisol Serrano Hernández** ha concluido la elaboración de su trabajo de tesis titulado **"Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género Persea"** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero Agrónomo en Floricultura, luego de haber concluido la investigación, así como seguido las instrucciones de sus asesores, ponemos a su disposición el presente documento y solicitamos tener a bien dar inicio con el proceso de revisión oficial.

Sin otro particular, agradezco su atención a la presente y envío a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN
DIRECTOR DE TESIS





Tenancingo, México a 07 de septiembre de 2017

L. en R.E.I. PAOLA YATZIRI AYALA FRANCO
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO
PRESENTE:

Por este conducto remito a usted el dictamen de la revisión del trabajo de investigación en modalidad de tesis titulado: **Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea**. Presentado por Marisol Serrano Hernández con número de cuenta **1127016**.


Dictamen: **Aprobado con comentarios.**

Sugerencias y Observaciones.

1. Relacionar título con objetivos particulares y específicos, así como conclusiones.
El título dice: Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea. Lo que se hizo fue una comparación de técnicas e iniciadores para caracterizar molecularmente a especies del género Persea.
2. Bibliografía.
 - e) Homogenizar la forma de citar la bibliografía.
 - f) Completar los datos faltantes de las citas.

Sin otro particular, quedo a sus órdenes.

ATENTAMENTE


DR. ROMULO GARCIA VELASCO
PROFESOR INVESTIGADOR DEL
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

Tenancingo, Estado de México a 28 de septiembre de 2017.

PAOLA YATZIRI AYALA FRANCO
COORDINADORA DEL DEPARTAMENTO
DE EVALUACIÓN PROFESIONAL

P R E S E N T E

Por medio de la presente le comunico que la tesis titulada "Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género *Persea*", de la alumna Marisol Serrano Hernández. Con número de cuenta 1127016, de la carrera de Ing. Agrónomo en Floricultura ha sido aceptada con cambios menores **Aprobada con Cometarios**.

- 1) Checar índice que corresponda a las páginas
- 2) Dar un buen formato al índice y quitar del índice general los índices de cuadros y figuras
- 3) Enumerar el índice con número romano el resumen y los índices de cuadros y figuras.
- 4) Checar ortografía del texto
- 5) Hacer textos de corrido en la descripción morfológica de las especies.
- 6) Checar las unidades de medida.
- 7) En las figuras justificar títulos.

Sin más por el momento me despido de Usted agradeciendo de antemano la atención que sirva prestar a esto.

A T E N T A M E N T E



ELIZABETH URBINA SÁNCHEZ
PROFESORA DE TIEMPO COMPLETO



Tenancingo, México a 9 de octubre de 2017.

Asunto:
Entrega de tesis final

L.R.E.I. PAOLA YATZIRI AYALA FRANCO
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
DEL CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

Estimada Lic. Paola

Por medio de la presente le informo que la pasante de la carrera de Ingeniero Agrónomo en Floricultura **Marisol Serrano Hernández** (no. de cta. 1127016) ha concluido las correcciones indicadas por su Comité Revisor asignado al trabajo de tesis titulado: **"Caracterización morfológica y molecular de un híbrido natural y su comparación con especies del género *Persea*"** (asesores: Dr. Jaime Mejía Carranza y Dr. Luis Miguel Vázquez García) (se anexa ejemplar corregido), cuyo seguimiento he verificado. Por lo anterior solicito a usted tener a bien considerar la continuidad a su proceso de titulación.

Sin otro particular y agradeciendo plenamente su atención otorgada a la presente, envío a usted un atento saludo.

ATENTAMENTE

DR. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN
DIRECTOR DE TESIS





Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario Tenancingo

Tenancingo, Estado de México, 13 de Octubre 2017

C. MARISOL SERRANO HERNÁNDEZ
PASANTE DE LA LICENCIATURA DE INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a Usted, que con base en el Reglamento de Facultades y Escuelas Profesionales de la UAEM que en su Capítulo VIII artículo 120, 121 y 122, así como el Reglamento de Opciones de Evaluación Profesional de la UAEM Capítulo I artículo 6º, pueden proceder a realizar la elaboración en formato electrónico del trabajo de Tesis, "**Caracterización morfológica y molecular de un híbrido natural y su comparación con especies del género Persea**". Y continuar con los trámites y requisitos requeridos para efecto de poder sustentar su examen profesional y obtener el título de **LICENCIADA EN INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**.

Sin otro particular, quedo a sus apreciables órdenes.

A T E N T A M E N T E
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"



Centro Universitario
UAEM Tenancingo


DRA. EN E. LUZ MARÍA ROBLES HERNÁNDEZ
SUBDIRECTORA ACADÉMICA
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

c.c.p. Dra. Luz María Robles Hernández, Subdirectora Administrativa/VLR
c.c.p. Archivo EEBG/DEP

Departamento de Titulación





8.11 Carta de Cesión de Derechos de Autor: Evaluación Profesional

Centro Universitario UAEM Tenancingo
Subdirección Académica
Departamento de Evaluación Profesional



Versión Vigente No. 00

Fecha: 12/10/2017

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

La que suscribe **Marisol Serrano Hernández**, autor del trabajo escrito de evaluación profesional en modalidad de Tesis "**Caracterización morfológica y molecular de un híbrido natural y su comparación con especies del género *Persea***". Por medio de la presente con fundamento en lo dispuesto en los artículos 5, 18, 24, 25, 27, 30, 32 y 148 de la Ley Federal de Derechos de Autor, así como los artículos 35 y 36 fracción II de la Ley de la Universidad Autónoma del Estado de México; manifiesto mi autoría y originalidad de la obra mencionada que se presentó en Centro Universitario UAEM Tenancingo para ser evaluada con el fin de obtener el Título Profesional de Licenciada en Ingeniero Agrónomo en Floricultura.

Así mismo expreso mi conformidad de ceder los derechos de reproducción, difusión y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Universidad Autónoma del Estado de México; se podrá realizar a nivel nacional e internacional, de manera parcial o total a través de cualquier medio de información que sea susceptible para ello, en una o varias ocasiones, así como en cualquier soporte documental, todo ello siempre y cuando sus fines sean académicos, humanísticos, tecnológicos, históricos, artísticos, sociales, científicos u otra manifestación de la cultura.

Entendiendo que dicha cesión no genera obligación alguna para la Universidad Autónoma del Estado de México y que podrá o no ejercer los derechos cedidos.

Por lo que el autor da su consentimiento para la publicación de su trabajo escrito de evaluación profesional.

a) Texto completo



b) Por capítulos



c) Solamente portada y tabla de contenido



Se firma presente en la ciudad de Tenancingo Estado de México, a diez de octubre de 2017.

Nombre y firma de conformidad



Centro Universitario
UAEM Tenancingo

DEDICATORIA

El proceso que se sigue en la elaboración de una tesis puede en muchos casos verse como un camino sin fin, ya que requiere de mucho esfuerzo y sacrificio; sin embargo al llegar al final te das cuenta de que todo ha valido la pena, porque hay personitas en tu vida que de alguna manera han creído en ti y que ahora son cómplices de tus logros.

Doy gracias a DIOS por regalarme la oportunidad de conocer este mundo y darme la fortaleza para enfrentar la vida todos los días.

A mi esposo por creer en mí y apoyarme para alcanzar una de mis mayores metas que es mi carrera como profesionista; por tus sacrificios y esfuerzos constantes, por compartir conmigo tristezas, alegrías, éxitos y fracasos y sobre todo por tu amor incondicional y desinteresado.

A mi madre, porque a través de sus consejos y regaños me hizo forjar un buen camino, guiándome y alentándome para vencer los obstáculos que se me han presentado a lo largo de mi vida, dando pauta para alcanzar este sueño de ser alguien, lo cual constituye la mejor de las herencias.

A mis amigos que conforman la familia que la vida me ha dado oportunidad de elegir, muchas gracias por todas aquellas largas conversaciones en donde trataban de entender lo que hacía en mi trabajo, por todas aquellas palabras de aliento, abrazos, risas y demás muestras de afecto que me han regalado cuando siento que ya no puedo más.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Juan Carlos Reyes Alemán por darme la oportunidad de trabajar con él; por la confianza, paciencia, tiempo y apoyo incondicional que me dedico a lo largo de todo el desarrollo de mi tesis.

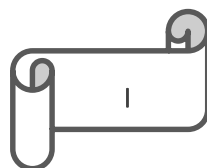
A mis asesores el Dr. Jaime Mejía Carranza y el Dr. Luis Miguel Vázquez García por haberme apoyado en la revisión de tesis y por ayudarme a aclarar la esencia de mi trabajo.

A mis profesores del Centro Universitario UAEM Tenancingo por compartirme parte de sus conocimientos y experiencias a lo largo de toda mi formación como profesionista.

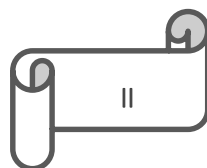
Al laboratorio de Biotecnología del Centro Universitario UAEM Tenancingo por haberme permitido llevar a cabo el proceso de extracción de mis muestras.

RESUMEN

El Estado de México forma parte de la denominada franja aguacatera en la que prevalecen formas diversas de genotipos nativos del género *Persea*, además de otras especies como es el caso de *Persea americana* (raza mexicana), *Persea cinerascens* (aguacatillos silvestres), *Persea hintonni* y *Persea floccosa*. En la actualidad resulta confuso establecer la ubicación taxonómica de algunas especies, razas y/o variedades debido a su alto grado de hibridación; por lo cual resulta necesario recurrir a la caracterización morfológica y molecular con el fin de identificar la diversidad de los recursos genéticos con que se cuenta en una región. En el Centro Universitario UAEM Tenancingo, se han desarrollado trabajos de investigación de caracterización morfológica y molecular de aguacate; ya que de acuerdo a revisiones recientes, cuando ambas técnicas se conjuntan se obtiene información más completa, precisa y robusta. En el presente trabajo se analizaron molecularmente 36 genotipos del género *Persea* que fueron colectados en la zona sur del Estado de México, algunos se distinguen por características como la pubescencia de la hoja, tamaño de fruto, calidad comestible y grosor de cáscara que permitieron ser considerados de interés. Algunos de estos materiales no han sido reportados y son considerados como raros, como “Ixtapan (1,2 y 3) y Yatzachi” (cascarudos), que presentan características distintivas con respecto al resto de los materiales en cuanto a grosor de cáscara y pubescencia en su hoja, estos fueron localizados en nichos ambientales con características específicas bajo un confinamiento edafoclimático que al parecer les permite conservar dichas características morfológicas, por lo que se consideran como un híbrido natural. Para la obtención del material genético (ADN) se colectaron hojas tiernas de los ejemplares; posteriormente se realizaron las etapas de extracción, lavado, cortado, amplificación en PCR, se utilizaron los marcadores moleculares tipo RAPD (4) e ISRR (4), se generaron polimorfismos que fueron revelados mediante electroforesis en geles de acrilamida y teñidos con sales de plata, con los polimorfismos obtenidos se elaboró una matriz básica de datos, se generaron

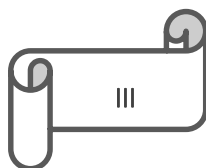


agrupamientos aleatorios basados en similitudes (variabilidad), mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei and Li Dice- y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining con un Bootstrapping de 1000 repeticiones, para tal fin se utilizaron los programas Free Tree y Tree View. El análisis de RAPD, produjo un total de 144 bandas polimórficas, con un promedio de 36 bandas por primer, con un porcentaje de contribución que va primer de 16.38 a 31.26; el contenido de información polimórfica (PIC) varió de 0.28 a 0.40, con un promedio de 0.34. En el análisis ISSR, se produjeron un total de 114 bandas polimórficas, con un promedio de 28,5 bandas por primer, el porcentaje de contribución fue de 22.5 a 27.6; el PIC varió de 0.20 a 0.23, con un promedio de 0.42. Los dendogramas mostraron la relación existente entre las accesiones a través de los agrupamientos. Ambas técnicas conjuntaron representantes de *P. americana* var. *Drymifolia*, *P. americana* var. *Guatemalensis*, y *P. americana* var. *Americana*. No fue posible que los genotipos de interés (Ixtapan 1, 2, 3 y Yatzachi) se separaran en ramas independientes, mientras que los genotipos de los subgéneros *Eriodaphne* y *Persea* sí se separaron.

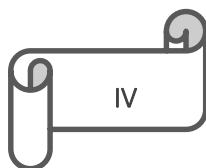


ÍNDICE DE CONTENIDO

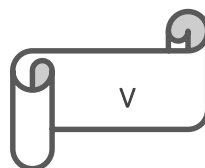
RESUMEN.....	I
ÍNDICE DE CONTENIDO	III
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE CUADROS	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
2.1 Origen y Domesticación.....	11
2.2 Taxonomía.....	12
2.3 Descripción Botánica.....	13
2.4 Descripción de Razas de la especie <i>Persea americana</i> Mill (Kopp, 1966) 16	
2.4.1 Raza mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>).....	16
2.4.2 Raza guatemalteca (<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>).....	18
2.4.3 Raza antillana (<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>)	19
2.5 Otras especies del subgénero <i>Persea</i> y un género afín	21
2.5.1 <i>Persea schiedeana</i> Nees	21
2.5.2 <i>Persea cinerascens</i>	22
2.5.3 <i>Persea lingue</i>	23
2.5.4 <i>Persea tolimanensis</i>	24
2.5.5 <i>Persea floccosa</i>	25
2.5.6 <i>Beilschmiedia anay</i> (Genero afín a <i>Persea</i>).....	26
2.6 La caracterización vegetal	27
2.7 Tipos de marcadores.....	30



2.8 Caracterización Morfológica	31
2.9 Caracterización Molecular	32
2.9.1 Marcadores Moleculares de ADN	33
2.9.2 La PCR (Polymerase Chain Reaction).....	39
2.9.3 Electroforesis	41
2.10 Análisis de la información	42
2.10.1 Procedimiento para realizar el análisis de la información	43
III. JUSTIFICACIÓN	48
IV. OBJETIVO GENERAL	49
4.1 Objetivos específicos	49
V. HIPÓTESIS	49
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	49
6.1 Ubicación del sitio donde se llevó a cabo el estudio	49
6.2 Recolección del material vegetal	50
6.3 Caracterización molecular de los materiales	50
6.3.1 Extracción de ADN.....	52
6.3.2 Cuantificación de ADN (concentración)	53
6.3.3 Purificación y digestión del ADN	53
6.3.3.1 Purificación de muestras	53
6.3.3.2 Digestión del ADN	54
6.3.4 PCR	54
6.3.5 Elaboración de geles de acrilamida	57
6.3.6 Tinción y revelado de geles de acrilamida	57
6.3.7 Análisis Estadístico	58
6.4 Descripción del nuevo genotipo	58



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
7.1 Comparación de protocolos de extracción de ADN basados en el CTAB 61	
7.2 Eficiencia de los marcadores moleculares	62
7.3 Interpretación de dendogramas	64
7.4 Descripción e importancia del nuevo genotipo.	71
VIII. CONCLUSIONES	80
IX. LITERATURA CITADA	81
X. ANEXOS	89



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porte de árbol del aguacate de la raza mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	17
Figura 2. Frutos de aguacate de la raza mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	17
Figura 3. Frutos de aguacate de la raza guatemalteca (<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>)	19
Figura 4. Fruto de la raza antillana (<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>)	20
Figura 5. Porte del árbol de la raza antillana (<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>). Foto tomada de Barrientos, 2015	20
Figura 6. Frutos de la especie <i>Persea schiedeana</i>	22
Figura 7. Hojas de la especie <i>Persea schiedeana</i>	22
Figura 8. Follaje de <i>P. cinerascens</i>	23
Figura 9. Frutos de <i>P. cinerascens</i>	23
Figura 10. Follaje y frutos tiernos de <i>Persea lingue</i>	24
Figura 11. Frutos secos de <i>Persea lingue</i>	24
Figura 12. Fotos del porte del árbol de aguacate sdeMico (<i>Persea tolimanensis</i>) tomadas en el volcán Santa Ana en el Salvador, incluidas en Zentmyer y Schieber (1989)	25
Figura 13. Fotos de frutos de aguacate de Mico (<i>Persea tolimanensis</i>) tomadas en el volcán Santa Ana en el Salvador, incluidas en Zentmyer y Schieber (1989)..	25
Figura 14. Frutos de la especie <i>P. floccosa</i>	26
Figura 15. Frutos de la especie <i>Beilschmiedia anay</i> , fotos de Barrientos, 2015.	27
Figura 16. Apariencia del follaje de la especie <i>Beilschmiedia anay</i>	27
Figura 17. Porte del árbol de <i>Beilschmiedia anay</i>	27
Figura 18. Dendograma de RAPD e ISSR generado mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei y Li Dice- y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining- con un Bootstrapping de 1000 repeticiones.....	66
Figura 19. Dendograma de RAPD generado mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei y Li Dice- y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining- con un Bootstrapping de 1000 repeticiones.....	67
Figura 20. Dendograma de ISSR generado mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei y Li Dice y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining- con un Bootstrapping de 1000 repeticiones.....	70

Figura 21. Frutos de Ixtapan 3, ejemplares de genotipos tipo cascarudo en Ixtapan del Oro, México.....	72
Figura 22. Forma, costillas típicas y apariencia corchosa de frutos del genotipo cascarudo.....	73
Figura 23. Grosor de la cascara del genotipo cascarudo.....	73
Figura 24. Presencia de fibras en la pulpa del fruto del genotipo cascarudo.....	73
Figura 25. Forma de los cotiledones de aguacates tipo cascarudos.....	74
Figura 26. Semillas de aguacate del genotipo tipo cascarudo Ixtapan 1.....	74
Figura 27. Hojas con inflorescencias del genotipo cascarudo Ixtapan 3.....	75
Figura 28. Frutos rústicos de Yatzachi.....	76
Figura 29. Grosor de cáscara y características de semilla de Yatzachi.....	77
Figura 30. Frutos de genotipo proveniente de la Sierra Mixe de Oaxaca.....	77
Figura 31. Grosor de cáscara y semilla de genotipo de la Sierra Mixe de Oaxaca.....	78
Figura 32. Gel de Acrilamida RAPD Primer (E14).....	89
Figura 33. Gel de Acrilamida RAPD Primer (E18).....	89
Figura 34. Gel de Acrilamida ISSR Primer (AC)8YG.....	90
Figura 35. Gel de Acrilamida ISSR Primer (GA)8YC.....	90
Figura 36. Gel de Acrilamida ISSR Primer (TCC)5RY.....	91
Figura 37. Gel Acrilamida ISSR Primer AC(GACA)4.....	91

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Posibilidades y codificación base de los índices de similitud	45
Cuadro 2. Índices de similitud más utilizados en estudios de Caracterización (Nuñez-Colin y Valadez-Moctezuma, 2010).	46
Cuadro 3. Fórmulas de distancias multivariadas de Nei 1972 y Nei 1978, utilizadas en sistemática filogenética (Nuñez-Colin <i>et al.</i> , 2010).	46
Cuadro 4. Métodos de aglomeración más utilizados en caracterización de Germoplasma (Nuñez-Colin <i>et al.</i> , 2010)	47
Cuadro 5. Genotipos utilizados en el proceso de caracterización molecular en el presente estudio	51
Cuadro 6. Marcadores moleculares (RAPD e ISSR) utilizados en la caracterización molecular de colectas de aguacate	55
Cuadro 7. Programa de termociclaje utilizado para RAPD con equipo de termociclaje Gene Amp® PCR System 2700 AB Applied Biosystems.	56
Cuadro 8. Programa de termociclaje utilizado para ISSR con equipo de termociclaje marca Gene Amp® PCR System 2700 AB Applied Biosystems....	56
Cuadro 9. Mezcla de reacción para realizar la PCR en la mezcla Master mix....	56
Cuadro 10. Reactivos utilizados en la elaboración de geles de acrilamida.....	57
Cuadro 11. Fórmulas de los parámetros de evaluación para determinar la eficiencia de los marcadores moleculares	58
Cuadro 12. Caracteres considerados para la descripción de los genotipos basados en las directrices IPGRI (1995) y UPOV (2006).	59
Cuadro 13. Comparación de procedimientos tradicionales con base en el CTAB empleados en la extracción de ADN.....	62
Cuadro 14. Primers utilizados para el desarrollo de marcadores de DNA, número de bandas, amplicones y % de contribución obtenidos por iniciador.....	64
Cuadro 15. Descripción general de los primers utilizados en relación al número de bandas obtenidas, número de bandas polimórficas, % de polimorfismo, poder de resolución (RP), contenido de información polimórfica (PIC) e índice del marcador (MI).	64
Cuadro 16. Descripción del desarrollo vegetativo del genotipo cascarudo Ixtapan 3.....	75

I. INTRODUCCIÓN

México es el principal país productor y consumidor de aguacate en el mundo; ya que cuenta con 28 estados productores, sin embargo solo en cinco se concentra alrededor del 86% de la superficie sembrada, con un 88% de la superficie cosechada y 89% de la producción nacional. Los estados productores sobresalientes son Michoacán (con un 78.6 % de la producción nacional) y Jalisco que aporta un 10% (SIAP, 2016). El estado de Michoacán se destaca por producir la variedad “Hass” en grandes cantidades, ya que este tipo de aguacates por sabor y calidad han sido los más aceptados en los diferentes mercados; por lo anterior dicho estado es considerado como el principal productor desde la década de los setentas, ya que desde entonces aporta alrededor del 83% de la producción nacional (Quintero *et al.*, 2000). Actualmente el aguacate está considerado como el producto hortícola más importante de México, desde el punto de vista económico; ya que ocupa el séptimo lugar de producción en el sector agrícola, por lo que es importante promover la colecta, conservación, evaluación, potencialización y aprovechamiento de los recursos genéticos pertenecientes al género *Persea*.

El aguacate corresponde a diferentes especies del género *Persea* cuyo origen y proceso de domesticación se dio en Centroamérica, ya que es ahí donde se concentra la mayor diversidad, además de considerar evidencias arqueológicas acerca de las principales culturas que habitaron dichas zonas (Galindo-Tovar, 2008). Por otra parte de acuerdo con Knight (2002), gran parte de la diversidad del aguacate también comprende la región que va desde las partes altas de Guatemala hasta la costa del Pacífico de América central.

En México se concentra una gran riqueza genética del aguacate ya que las diferentes especies se adaptan a las diversas condiciones naturales propias de nuestro país, que van desde los bosques montañosos de niebla hasta las zonas tropicales; no obstante hoy en día algunas de estas se hallan amenazadas debido a diferentes causas, como la reducción y alteración de ecosistemas, cambio del

uso de suelo, plagas, enfermedades, sequías, entre otras; por ello es importante llevar a cabo trabajos de conservación, así como estudios de diversidad genética del género *Persea* y de esta manera coadyuvar en la agroindustria del aguacate, en México y el mundo (Barrientos *et al.*, 2010).

El Estado de México forma parte de la franja aguacatera de México, en esta se concentra una amplia diversidad de genotipos de *Persea* que podrían ayudar en la creación de nuevas variedades y/o portainjertos adaptables a las condiciones climáticas de la región y al mismo tiempo constituir una alternativa de inversión para pequeños productores (Flores, 2014).

En el trabajo de caracterización vegetal, la descripción morfológica es limitada por la influencia ambiental; en cambio la caracterización mediante marcadores moleculares constituye una opción viable que permite establecer diferencias o similitudes entre individuos con base en el ADN de su genoma.

El conjuntar las técnicas de caracterización morfológica y molecular permite definir de manera más precisa el grado de diversidad genética prevaleciente y la distribución de determinadas especies que se comparan, así como las relaciones filogenéticas que guardan (García, 2012), de tal forma que nos permite identificar, clasificar, documentar y aprovechar la riqueza natural persistente en una región, para posteriormente dar paso al trabajo de mejoramiento de especies vegetales, y continuar con los aspectos de producción y calidad (Gutierrez-Diez, 2009).

Asimismo, la identificación de las relaciones entre genotipos con base en su genoma, nos ha permitido conocer sus relaciones inter e intra específicas, favoreciendo el aprovechamiento de los recursos regionales en beneficio de la generación de portainjertos y/o variedades que nos permitan enfrentar los problemas del suelo, plagas y enfermedades.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y Domesticación

El aguacate corresponde a diferentes especies que son altamente polimórficas, debido a que presentan una gran diversidad genética; esto se atribuye principalmente a factores ambientales, culturales y genéticos. El origen del aguacate tuvo lugar en la región central de México, y en una región que abarca desde las partes altas de Guatemala hasta la costa del Pacífico de Centroamérica (Barrientos *et al.*, 2000; Teliz y Marroquín, 2015) esta misma región se halla comprendida en el área que abarca Mesoamérica y es ahí donde se han hallado evidencias arqueológicas de su domesticación, es por ello que se considera que ahí mismo ocurrió dicho suceso. De acuerdo con Galindo-Tovar *et al.* (2007), en la Sierra Nevada de California se han hallado evidencias arqueológicas que demuestran que en la antigüedad existía una gran diversidad de especies vegetales, donde los aguacates eran comunes, por ello se piensa que los aguacates antiguos se originaron ahí; sin embargo dicho autor también hace mención de que el proceso de domesticación del aguacate ha ocurrido por varias veces a través de un proceso largo y complejo, por lo que se deduce que pudo darse en al menos cuatro fases, las cuales se mencionan a continuación:

- Primera: Los primeros pobladores de Mesoamérica empezaron a coleccionar los frutos de los árboles de aguacate que se encontraban en los bosques cercanos a los lugares en los que se hallaban asentados; posteriormente seleccionaron los árboles con mejores frutos, los cuidaron y protegieron, de esta manera se inició el proceso de domesticación in situ, a nivel de agro-ecosistema y probablemente esto dio lugar a los primeros cambios morfológicos en el árbol.
- Segunda: Ocurrió cuando el clima se modificó, para entonces, los grupos humanos ya habían observado el proceso de germinación de las semillas (Mac Neish, 1964); así, debido a la variabilidad del clima, se empezó a hacer una planeación de las siembras como una forma de conservación del aguacate, de esta manera se inició

la modificación no intencional del ambiente biofísico y se estrechó la interacción hombre-planta.

- Tercera: Se lleva a cabo la selección y el cultivo de las semillas de los mejores frutos, en hábitats más favorables; además se incrementa la adaptación de los árboles para usos específicos, tal es el caso de la cultura maya que los utilizaba en sus creencias religiosas y culturales.
- Cuarta: El aguacate es cultivado en condiciones establecidas que promueven su productividad. Se mejoran los factores que estimulan su crecimiento y producción y se obtienen árboles con características genéticas diferentes a sus ancestros silvestres.

2.2 Taxonomía

El aguacate pertenece a la familia Lauráceas, la cual se caracteriza por poseer una gran variabilidad morfológica; incluye 92 géneros y entre 2840 y 3340 especies distribuidas en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chanderbali *et al.*, 2001).

El aguacate es una planta dicotiledónea que forma parte del género *Persea*, este se halla comprendido por alrededor de 85 especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*); aunque existen excepciones como es el caso de *Persea indica* que se localiza en las islas canarias en España (Ramirez, 2015).

El género *Persea* se halla dividido en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1966), cuya principal forma de distinción es la pubescencia de la cara interior de los sépalos; *Persea* tiene ambas caras pubescentes, mientras que *Eriodaphne* tiene la cara interna libre de pubescencia, no obstante también es posible hallar en este grupo algunas especies que carecen de dichas características, tal es el caso de *Persea pallida*, *Persea rigens* y *Persea cinerascens*. En el subgénero *Persea* se reconocen tres especies; *P. schiedeana* Nees, *P. parvifolia* Williams y *P. americana* Mill; esta última es poliforme y se halla constituida por varios taxones

separados, considerados como variedades botánicas, subespecies o razas hortícolas (Scora & Bergh, 1992b). Los frutos del subgénero *Persea*, se conocen como aguacates verdaderos, debido a que presentan un mayor tamaño, con respecto a los del otro subgénero (Ramirez, 2015); además del aguacate que comúnmente se conoce, en este grupo se encuentran *Persea nubigena* (aguacate de monte); dicha especie se halla distribuida en altitudes que van de los 2000 y 2800 msnm, donde predominan suelos fértiles de bosque mesófilo de montaña (Scora, 1990a), *Persea steyermarki* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (chinini, chinene, chenene, yas, hib) y *Persea floccosa* (aguacate cimarron).

El aguacate *Persea americana* Mill., posee formas muy variadas y se caracteriza principalmente por presentar una excesiva pubescencia en tallos, hojas y flores (Schroeder, 1951). Dentro de esta especie, se conocen tres razas: mexicana, guatemalteca y antillana; la clasificación botánica de dichas razas ha tenido muchas variaciones, debido a que algunos autores han agrupado a la raza Mexicana como una sola, llamándola *Persea drymifolia* (Kopp, 1966). Por otra parte la raza guatemalteca también es conocida como *Persea nubigena* var. *Guatemalensis* por Williams (1977). Sin embargo las tres razas actualmente se hallan consideradas dentro de la especie *Persea americana* Mill. Bergh y Ellstrand (1987) clasificaron a las razas de aguacate como variedades botánicas, la raza mexicana se nombró como *Persea americana* var. *drymifolia*, la raza guatemalteca como *Persea americana* var. *guatemalensis* y a la raza Antillana como *Persea americana* var. *americana*.

2.3 Descripción Botánica

El aguacate presenta múltiples formas, por ello cada una de sus estructuras (hoja, fruto, tallo, etc.) pueden presentar formas muy variadas. Al considerar la descripción botánica de aguacate realizada por Calabrese (1992), se describe como una especie perenne de tallo aéreo (o epigeo) con características leñosas y

follaje siempre verde, su raíz es bastante superficial. A continuación se menciona la descripción realizada por el autor antes mencionado.

Hojas: Son simples, alternas, pecioladas y enteras. El pecíolo normalmente tiene una longitud que va de 1.5 a 3.5 cm. Las hojas pueden ser de forma muy variable, debido a que pueden ser de forma elíptica- alargada u oval-oblonga, están provistas de yemas axilares y nervaduras pinnadas (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. 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 cual indica que la planta se ha desarrollado vegetativamente fuera de su hábitat, siendo esta una variedad no apta para la zona.

Parte aérea (Copa): Los árboles de aguacate que crecen de manera espontánea pueden alcanzar hasta 20 m de altura, con un diámetro de tronco superior a un metro. Las ramas son abundantes, generalmente delgadas y frágiles por lo que pueden romperse al cargar muchos frutos y/o por la acción del viento. Las yemas foliares son apicales y/o axilares, estas últimas en su mayoría permanecen latentes o se desprenden, de tal forma que la mayoría de las veces el crecimiento de frutos tiene lugar en las yemas apicales.

Raíz: 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; la mayor parte del sistema radical del aguacate es superficial y está comprendido en los primeros 50 cm; sin embargo tiende a presentar mejor desarrollo en suelos profundos y con buen drenaje para evitar la proliferación de

enfermedades fungosas. La raíz del aguacate presenta pocos pelos radicales, y por ello la absorción de agua y nutrientes se lleva a cabo principalmente en las puntas de las raíces principales a través de los tejidos primarios; esto determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad, cuando el drenaje es deficiente existe la posibilidad de que se presenten asfixias radicales y ataques de hongos que pudren los tejidos.

Flor: Las flores son hermafroditas, 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 se desarrolla en forma de panícula (racimo) que puede ser de tipo axilar o terminal. Se estima que cada panícula presenta alrededor de 200 flores. 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. En base a lo descrito anteriormente podría decirse que se trata 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 su procedencia, oscilando entre 50 gr y 2.5 Kg, la parte comestible presenta una coloración amarillenta pálida, con una leve cubierta verde adherida al epicarpio. A pesar de las numerosas flores que hay en una inflorescencia, se estima que 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.

Semilla: Es de tamaño grande, durante la maduración del fruto puede separarse de la pulpa o germinar al interior del mismo, suele ser monoembriónica. 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.

2.4 Descripción de Razas de la especie *Persea americana* Mill (Kopp, 1966)

2.4.1 Raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*)

Se adapta a condiciones de clima subtropical o templado-cálido, generalmente en zonas donde no se presenten heladas en invierno y donde las lluvias mantengan periodos regulares durante el verano. La precipitación mínima debe ser de 800 mm. Los vientos deben ser ligeros y desprovistos de corrientes violentas, debido a que en rutas con condiciones de fuertes vientos causan severos daños, tales como defoliación, desgajamiento y caída de flor y fruto. La mejor adaptación se da en sitios ubicados a 36° Latitud norte sur, con respecto al ecuador y una altitud que va de los 1000 y 1800 msnm. Las temperaturas medias anuales deben mantenerse en un intervalo de 18 a 22 °C, ya que a niveles inferiores a la mínima, tiende a sufrir daños orgánicos irreversibles, tales como muerte de tejidos, principalmente ramas. En México se halla distribuido en las laderas orientales de las sierras altas y en la cadena montañosa del sur, a altitudes sobre los 1000 msnm, donde predominan los climas cálidos, húmedos a semiáridos; pueden adaptarse tanto en suelos fértiles como pobres y ácidos; sin embargo el ambiente más favorable es el clima subtropical o templado-cálido, con invierno benigno (raras heladas).

De acuerdo con Ramírez (2015) los árboles miden alrededor de 15 m de altura y presentan ramas con pubescencia escasa o moderada, con pilosidades pálidas de color marrón. Las hojas suelen ser de forma elíptica, con ápices agudos, raramente

acuminadas de color verde oscuro; presentan un intenso aroma a anís al igual que la corteza, los limbos miden de 5- 20 cm de largo y de 3- 12 cm de ancho. Las flores mantienen una forma regular asimétrica, con estámenes de 2-3 mm de largo, filamentos pubescentes en el primer y segundo verticilo. Los frutos son ovoides y/o periformes, que miden de 4-12 cm de largo; el exocarpo es delgado de color verde oscuro, marrón, morado o negro; la pulpa presenta un olor característico a anís; la semilla es grande y ovada, de superficie lisa (Figura 2).



Figura 1. Porte de árbol del aguacate de la raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*)



Figura 2. Frutos de aguacate de la raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*)

2.4.2 Raza guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*)

Requiere de zonas con clima tropical o cálido, que mantenga temperaturas de 22°C en adelante, comprendidas entre los 32° y 34° de latitud norte o sur y una altitud entre los 500 y 1100 msnm, sin que existan grandes variaciones de una estación a otra, la precipitación pluvial mínima del lugar debe ser de 1200 mm en donde haya un régimen de lluvias continuo, por lo que es conveniente que persista un clima regular a lo largo de todo el año. En México su distribución se concentra en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, y Veracruz, mientras que en Centroamérica se halla principalmente en Guatemala.

De acuerdo con la descripción morfológica que realizó Williams (1977), las hojas presentan forma subcoriacea, con limbos que miden de 8 a 20 cm de largo y de 10 a 24 cm de ancho; pueden ser de forma ovalada, ovoidal u oblonga; los ápices tienden a presentar forma acuminada, obtusa o redonda; la base generalmente es acuminada; la superficie adaxial es moderadamente pubescente, mientras que la superficie abaxial es intensamente pubescente, principalmente en la nervadura central. Las flores son tomentosas de color marrón, con una longitud de 3 a 7 mm; con estambres de 2 a 3 mm de largo y filamentos pubescentes en el primer y segundo verticilo. Los frutos pueden ser de color verde claro, verde oscuro, marrón o negro; con forma ligeramente periforme y cascara de más de 4 mm de espesor (Figura 3).



Figura 3. Frutos de aguacate de la raza guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*)

2.4.3 Raza antillana (*P. americana* var. *americana*)

Se adapta a condiciones de clima tropical sin variación estacional; las precipitaciones deben mantenerse en un intervalo de 1800 a 2000 mm anuales; regularmente tiende a adaptarse a 32° en la latitud norte-sur y a una altitud que oscila entre los 0 y 500 msnm. En México es posible encontrarla en Centroamérica y en regiones tropicales situadas en las costas del Atlántico y del Pacífico.

Los árboles de esta raza se caracterizan principalmente por poseer una altura de hasta 30 m, con ramas moderadamente pubescentes, con pilosidades de color marrón (Whiley *et al.*, 2007). Ramírez (2015) menciona que las hojas de dicha raza son de forma coriácea y pueden ser angostas o elípticas; con limbos de 10 a 30 cm de largo y de 3 a 19 cm de ancho, con ápices acuminados. Las flores suelen ser de color verde amarillento, generalmente miden de 3 a 6 mm de largo y se caracterizan por ser tomentosas en ambas superficies. Los frutos son de forma periforme, anchos o estrechos, con exocarpo que va de verde claro a verde oscuro o bien de marrón a morado, la pulpa es de color marfil; la semilla es ovada de tamaño variable y de superficie áspera (Figura 4).



Figura 4. Fruto de la raza antillana (*P. americana* var. *americana*)

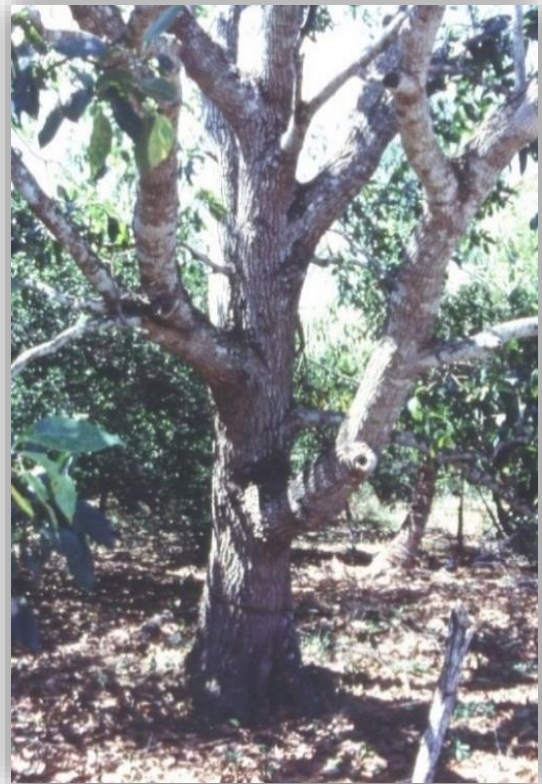


Figura 5. Porte del árbol de la raza antillana (*P. americana* var. *americana*). Foto tomada de Barrientos, 2015

2.5 Otras especies del subgénero *Persea* y un género afín

2.5.1 *Persea schiedeana* Nees

Es un árbol frutal nativo de México y Centroamérica, distribuido hasta Colombia (Kopp, 1966), normalmente crece en selvas y montañas tropicales; ocasionalmente en México puede hallarse en zonas de pastizales ubicadas a altitudes que van de los 90 hasta 2000 msnm (Schieber *et al.*, 1972). Este tipo de aguacate también se conoce como chinini, chinin, aguacate de manteca o pagua. La especie *schiedeana* pertenece al subgénero *Persea*, esta a su vez presenta muchas variaciones morfológicas en fruto y como especie afín al aguacate (*Persea americana* Mill.) (Scora *et al.* 1990a).

De acuerdo con Flores (2014) y Ramírez (2015), es una especie muy vigorosa que llega a medir de 20 a 30 m de altura, los árboles son de copa ancha, ramillas gruesas, rugosas cerca de las cicatrices de las hojas y de las brácteas de las yemas, con densas pilosidades ferruginosas. Las hojas son de forma coriácea o subcoriácea, con limbos de forma elíptica a abovada, los cuales presentan ápices redondeados a obtusos, además de densas pilosidades ferruginosas en el haz, envés y peciolo, durante etapas tempranas antes de fructificar. Las flores se hallan agrupadas en inflorescencias dispuestas en la subterminal tirsoide, rodeada de brácteas de yemas con bordes irregulares y anchos, regularmente son de color marrón, miden de 6 a 10 mm de longitud y son tomentosas. El fruto se caracteriza por presentar un cáscara de color verde, negro, café o morado (Joaquín *et al.*, 2007), además de ser de forma alargada, periforme o semiredonda y presentar numerosas fibrillas en la pulpa, la cual puede presentar variaciones de color ya que puede ser de color blanco a café pálido, tendiendo a exudar un jugo lechoso; llegan a medir de 5 a 10 cm de largo en la madurez, presentan pubescencia persistente durante la etapa de fructificación (Figura 6). La semilla es relativamente grande de forma esférica a ovada, con un epicarpio de color verde claro, grueso y flexible.



Figura 6. Frutos de la especie *Persea schiedeana*



Figura 7. Hojas de la especie *Persea schiedeana*

2.5.2 *Persea cinerascens*

Es una especie que se localiza en forma silvestre en los estados de Michoacán y México; se caracteriza por poseer un porte relativamente alto que va de 6 a 8 m alto (Campos *et al.*, 2008), sin embargo en Tacámbaro, Michoacán se han hallado ejemplares que miden hasta 20 m de altura. Por otra parte es posible identificar ejemplares de esta especie mediante el frotamiento de la madera del tronco y de

las ramas, ya que al frotarla se desprende un aroma característico a canela (García, 1970).

Las ramas son angulares, aglomeradas, oscuras y glabras; solo las hojas jóvenes son pilosotomentosas y pardas (Figura 8); el pedúnculo de la infrutescencia mide de 7 a 10 cm de longitud, con una cantidad de frutos que va de 20 hasta 30. Los segmentos del perianto son persistentes hasta la madurez y fácilmente observables; los frutos son baciformes, ligeramente elípticos con dimensiones de 0.9 x 1.2 cm de mesocarpio carnoso y ligero sabor al aguacate común (Figura 9), 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).



Figura 8. Follaje de *P. cinerascens*
(Fotografía de: Campos-Rojas)



Figura 9. Frutos de *P. cinerascens*
(Fotografía de: Campos-Rojas)

2.5.3 *Persea lingue*

Es una especie perteneciente al subgénero *Eriodaphne*; de acuerdo con Campos *et al.* (2008), es endémica de Chile en donde se le conoce como lingue o canela rosa. Es un árbol de gran porte que llega a medir hasta 30 m de alto, su follaje permanece siempre verde en una copa compacta y de muy rápido crecimiento, las hojas presentan una forma elíptica y miden de 6 a 7 cm de largo por 3.5 cm de ancho, mantienen una disposición alterna en las ramillas (Figura 10); las flores

suelen ser hermafroditas dispuestas en panojas amarillas); los frutos son drupas ovaladas lisas que maduran en color negro o violeta, miden de 12 a 15 mm de largo (Figura 11).



Figura 10. Follaje y frutos tiernos de *Persea lingue*



Figura 11. Frutos secos de *Persea lingue*

2.5.4 *Persea tolimanensis*

De acuerdo con Zentmyer y Shieber, (1990), se conoce comúnmente como aguacate de Mico, además es considerado como uno de los antepasados de la raza guatemalteca. Se halla distribuido en zonas moderadamente cálidas que abarcan desde la frontera de Guatemala-México hasta el sur de Costa Rica, concentrado principalmente en las laderas del volcán de Turrialba. El nombre de dicha especie se atribuye a su prevalencia en las laderas del volcán Toliman ubicado a unos 1500 m en Atitlan, Guatemala.

La especie *P. tolimanensis* se caracteriza por presentar frutos permanentemente duros, son de piel gruesa, ligeramente rugosa y de color verde oscuro, con forma redonda a oblata, similares a los criollos guatemaltecos, llegan a medir hasta 3 pulgadas de diámetro; generalmente cuelgan en el árbol hasta mucho después de la madurez, lo cual es inverso a lo que sucede con los criollos guatemaltecos. Los frutos no son comestibles, ya que presentan un sabor amargo.

Las hojas son de color verde opaco muy diferentes a las de un árbol de aguacate típico. Los árboles son muy vigorosos, y alcanzan una altura de más de 20 metros, además destacan por poseer un tronco gris blanquecino (Figura 12).

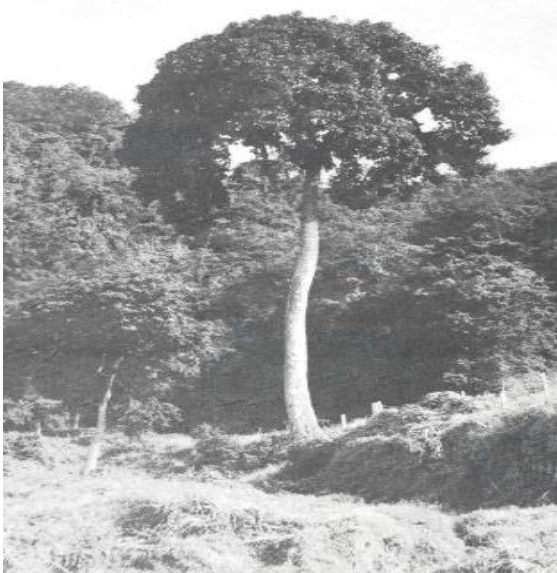


Figura 12. Fotos del porte del árbol de aguacate de Mico (*Persea tolimanensis*) tomadas en el volcán Santa Ana en el Salvador, incluidas en Zentmyer y Schieber (1989)

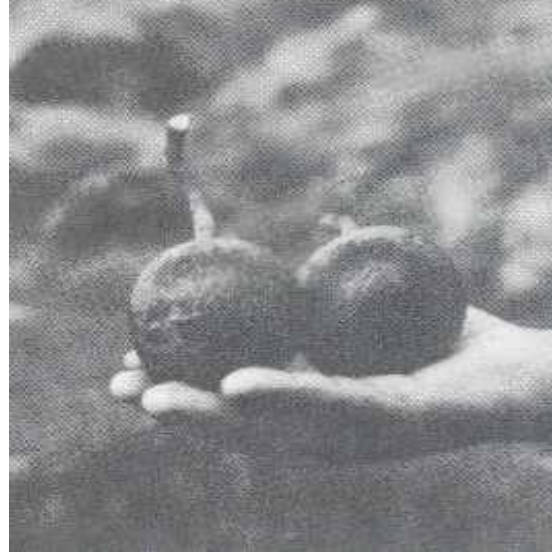


Figura 13. Fotos de frutos de aguacate de Mico (*Persea tolimanensis*) tomadas en el volcán Santa Ana en el Salvador, incluidas en Zentmyer y Schieber (1989)

2.5.5 *Persea floccosa*

Dicha especie se halla relacionada con los genotipos pertenecientes a la var. *drymifolia* y a la var. *nubigena*, sin embargo se diferencia de ambas por la pubescencia que se aloja en los brotes y hojas nuevas, o bien por los frutos pequeños y más subglobosos que miden cerca de 5 cm de largo, con un exocarpo delgado y verde (Whiley *et al.*, 2007).

Los árboles de esta especie son enormes, ya que llegan a medir hasta 30 m de altura, el tronco y las ramas presentan pubescencia fina áspera, con numerosas lenticelas; las láminas foliares pueden ser ovadas cuando miden de 6 a 16 cm y

elípticas cuando miden de 6 a 30 cm de longitud. Las flores son de color marrón, generalmente miden de 4 a 6 mm de longitud. Los frutos son globosos de color verde oscuro, con cascara muy gruesa en la que se alojan numerosas lenticelas de apariencia corchosa (Figura 13).



Figura 14. Frutos de la especie *P. floccosa*

2.5.6 *Beilschmiedia anay* (Genero afin a Persea)

De acuerdo con Borys, *et al.*, (1993), los frutos son pequeños y comestibles, de forma obovada; no obstante la forma del fruto depende de la proporción existente entre la pulpa y la semilla. La epidermis es delgada, lisa y brillante, normalmente de color negro oscuro; el color de la pulpa es de color verde claro a verde medio, cambiando cerca de la semilla a verde claro o amarillo claro. La textura de la pulpa tiende a ser acuosa o cremosa (Figura 14).

Las semillas alargadas, ligeramente asimétricas, de forma oblonga o piriforme. Las cubiertas de la semilla tienden a presentar picos frágiles en sus extremos basales, los cuales se pueden admirar al momento de extraer la semilla de la pulpa. En la mayoría de los casos los cotiledones pueden ser múltiples y crecer de manera asimétrica (Figura 14).

La forma de las hojas varía de obovado a orbicular u ovalado, con márgenes enteros, bases agudas, puntas agudas y venas pinnadas. La lámina de la hoja es

grande, gruesa y coriácea, con el haz de apariencia brillante y el lado inferior pubescente. Las venas en la superficie superior son discretas; mientras que en la superficie inferior, son muy pronunciadas, pubescentes y de color marrón. El pecíolo de la hoja es marrón, muy pubescente, triangular, y con un surco en la zona media (Figura 15).



Figura 15. Frutos de la especie *Beilschmiedia anay*, fotos de Barrientos, 2015.



Figura 16. Apariencia del follaje de la especie *Beilschmiedia anay*



Figura 17. Porte del árbol de *Beilschmiedia anay*

2.6 La caracterización vegetal

La caracterización vegetal consiste en establecer todos los caracteres posibles de una planta tomados de distintas estructuras para ubicarla en una clase o grupo, generalmente para ello se utilizan marcadores morfológicos y moleculares

(González-Andrés, 2001a). De acuerdo con Valadez y Kahl (2000), un marcador molecular es cualquier tipo molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, como cualquier gen cuya expresión permitiría un efecto fenotípico que pueda ser detectado fácilmente.

La caracterización de organismos vegetales, al igual que la de otros organismos vivos o minerales, tiene diferentes finalidades, por lo que de acuerdo con González-Andrés (2001b) a continuación se mencionan los rasgos característicos de cada una de ellas:

A. Identificación o determinación. La especie vegetal no identificada se coloca en la clase o grupo al que corresponde conforme a una clasificación construida previamente. En el proceso de identificación de un vegetal se recomienda utilizar pocas características, ya que esto facilita el proceso; sin embargo estas deben ser lo más evidentes posibles para obtener mejores resultados, normalmente se utilizan rasgos morfológicos únicos.

B. Sistemática. Se basa en el estudio científico de las clases, de la diversidad de los organismos, y de sus interrelaciones. Consiste en determinar a qué clase pertenece un organismo, hasta el momento en que no ha sido clasificado, o que se prejuzgue que esté incorrectamente clasificado. Para ello debe estudiarse a profundidad la diversidad de la población en relación a la que pertenece, además de sus relaciones con otros grupos de organismos. Cuando se realiza un trabajo de sistemática se deben considerar varias doctrinas, entre estas se encuentran:

Esencialismo: Se basa en la lógica aristotélica, la cual hace énfasis en que la tarea de la ciencia es descubrir la verdadera naturaleza de los objetos. Según esta corriente las esencias de los objetos existen y pueden ser descubiertas y discriminadas con la intuición intelectual; siendo la tarea de la clasificación biológica descubrir y discriminar las esencias en los organismos.

Cladismo y evolucionismo: La clasificación debe expresar fielmente las ramificaciones del árbol evolutivo y al mismo tiempo deben considerarse otros factores de la filogenia, tales como el grado de diversificación (no es conveniente tener una familia de un solo género, salvo que la discontinuidad sea lo suficientemente apreciable como para admitirlo) y la divergencia en cuanto a la similitud que pueden presentar dos grupos que tengan un antecesor en común cercano en el tiempo, sin embargo esta también difiere cuando existe una discontinuidad muy notable entre ellos, concluyendo así que cada uno pertenece a una familia totalmente distinta.

Feneticismo: El principio básico de esta consiste en hacer las clasificaciones considerando un gran número de caracteres, tomados de todas las partes que conforman el cuerpo del organismo y de todo su ciclo de vida; de esta manera se recopilan todos los caracteres necesarios para determinar el grado de significancia e importancia en la formación de grupos.

C.Análisis de la diversidad genética de una especie. Este consiste en llevar a cabo trabajos de caracterización para conocer la diversidad genética tanto interpoblacional como intrapoblacional, lo cual sirve para diseñar estrategias de conservación vegetal *in situ* y *ex situ*. En el primer caso se asegura la supervivencia de la especie mediante la protección en todas las áreas en las que habite o en donde se halle la mayor parte de la diversidad genética. Para la conservación *ex situ*, debe realizarse la colecta de germoplasma vegetal en las áreas donde haya mayor diversidad, para después llevarlas a un espacio destinado a la conservación y domesticación, de esta manera el ser humano las estudia y determina las condiciones de adaptación, posteriormente las explota en su beneficio.

D.Gestión de bancos de germoplasma. En el caso de los bancos de germoplasma es importante realizar una buena identificación y posteriormente una adecuada gestión y/o manejo de los recursos; por lo que es necesario evitar duplicados por

sinonimias (el mismo material con diferentes nombres) y homonimias (materiales diferentes con el mismo nombre). En este caso se trata de identificar como igual o diferente, respectivamente, accesiones que pertenecen a la misma especie, y con frecuencia a la misma variedad, así como cuando se trabaja con clones de cierta variedad. Por lo tanto es necesario buscar e identificar las características que diferencien a materiales muy semejantes. Algunos rasgos morfológicos si cumplen esta condición, pero debido a que el número de estos es limitado, con frecuencia es necesario acudir a marcadores moleculares, sobre todos los basados en ADN. Algunos caracteres morfológicos y sobre todo los marcadores moleculares son herramientas muy útiles que permiten detectar si se ha producido pérdida de diversidad al interior de una colección ayudando así a mantener la diversidad y originalidad en los bancos de germoplasma (González-Andrés, 2001b).

E. Definición de una nueva variedad. Junto con los caracteres de tipo fisiológico-agronómico que debe poseer cualquier nueva variedad para distinguirlas de otras ya existentes, también es necesario utilizar otros caracteres de tipos morfológicos y moleculares, que hagan más sencilla esta diferenciación, sin necesidad de recurrir a su cultivo en campo, que es donde se observarían las características fisiológico-agronómicas.

F. Búsqueda de marcadores de caracteres de interés agronómico. Los marcadores tanto morfológicos como moleculares son caracteres fácilmente observables, que se encuentran estrechamente ligados desde el punto de vista genético, a una característica agronómica de interés. Por lo tanto son muy útiles a la hora de abordar los programas de mejoramiento vegetal.

2.7 Tipos de marcadores

Los principales grupos de caracteres utilizados en la caracterización vegetal de acuerdo con Gonzales-Andrés (2001a) son: Morfológicos, Citológicos,

Bioquímicos, Basados en el estudio del ADN, Ecológicos, Embriológicos, Geográficos y Fisiológicos/ Agronómicos.

Los caracteres morfológicos son los medios de identificación más clásicos, ya que se utilizan para describir cualquier órgano de la planta desde el punto de vista cualitativo (formas, colores, presencia de estructuras singulares, etc.) o desde el punto de vista cuantitativo (mediciones). Los caracteres citológicos se basan principalmente en el estudio del núcleo celular, esencialmente en el número de cromosomas. Los caracteres bioquímicos se centran fundamentalmente en el estudio de metabolitos primarios y secundarios de las plantas; entre estos destacan los basados en compuestos de bajo peso molecular (Flavonoides, Alcaloides, Aminoácidos no proteicos, Aceites esenciales) y en algunos tipos de proteínas (Proteínas totales, Isoenzimas). Los caracteres basados en el estudio del ADN se sustentan en los marcadores moleculares que indican una secuencia primaria del ADN. Los caracteres ecológicos se distinguen por que se enfocan en el análisis del hábitat, los parásitos, los alimentos, las variaciones estacionales, etc. Los caracteres embriológicos son aquellos que se basan en el desarrollo embrionario de los individuos. Los caracteres geográficos se refieren a la distribución de las especies, a las relaciones entre poblaciones, al tanto de simpatria (que viven en una misma área geográfica) como alopatria (que tienen aislamiento geográfico) principalmente. Los caracteres fisiológico/agronómicos tienen que ver con las características fisiológicas de interés agronómico; entre las principales se hallan la susceptibilidad al estrés, a plagas y enfermedades, producción y desarrollo.

2.8 Caracterización Morfológica

La caracterización morfológica es considerada como la base de la sistemática tradicional en la caracterización de plantas (Gonzales-Andrés, *et al.*, 2001). Los caracteres morfológicos de una planta de acuerdo con Flores (2014) pueden expresarse de tres maneras de acuerdo a sus características:

- 1) **Caracteres Cualitativos:** Son los que se expresan en niveles discontinuos, por ejemplo el sexo de la planta: 1) dioico femenino, 2) dioico masculino, 3) monoico unisexual, y 4) monoico hermafrodito (5). Un solo carácter (nivel) puede tener diferentes formas de expresión. Por regla general los caracteres no deben ser afectados por el medio ambiente (UPOV, 2006).

- 2) **Caracteres Cuantitativos:** Estos también son conocidos como morfométricos (Gonzales, 2001); su expresión tiene muchas variaciones, las cuales pueden inscribirse en una escala unidimensional lineal continua o discontinua, dependiendo de la finalidad de la descripción; por ejemplo, la longitud del tallo: muy corto (1), corto (3), medio (5), largo (7), muy largo (9).

- 3) **Caracteres Pseudocualitativos:** La gama de expresión de este tipo de caracteres es parcialmente continua, sin embargo varía en más de una dimensión, por ejemplo, la forma de la hoja: oval (1), elíptica (2), redonda (3), oboval (4) y no puede describirse de manera adecuada la gama de un carácter, por lo que es necesario determinar cada nivel de expresión individual.

2.9 Caracterización Molecular

La caracterización molecular tiene como objetivo particular la distinción entre especies y/o cultivares, así como la evaluación de la diversidad y/o 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 (Hidalgo, 2003).

Los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías de técnicas basadas en la hibridación o en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se utilizan para identificar la base genética de la variación de especies, distinguiéndose así

por su capacidad para detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Rentarías, 2007).

Los marcadores emplean primers de secuencia arbitraria, semi-arbitraria o específica (Velasco, 2005).

2.9.1 Marcadores Moleculares de ADN

Los marcadores moleculares de ADN son cualquier sustancia orgánica o inorgánica característica de un organismo o proceso y se dividen en dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN (Azofeifa-Delgado, 2006), por otra parte para Valadez y Kahl (2000) un marcador es cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas mediante electroforesis o cromatografía, lo cual permite visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homologas del ADN de los organismos, de esta manera es posible describir genotipos de interés mediante una diferenciación inter e intra específica; además dichas técnicas permiten detectar variaciones en las secuencias de ADN al comparar distintos individuos (Torres y Moreno, 2001). Según Gonzales-Andrés *et al.*, (2001), los marcadores moleculares deberían de ser clasificados en dos tipos dependiendo del grado de afectación que el ambiente puede ejercer sobre ellos; aquellos que se basan en moléculas biológicas, es decir todos los bioquímicos que engloban compuestos de bajo peso molecular (flavonoides, alcaloides, terpenoides, etc.) pueden verse fácilmente influidos por las condiciones ambientales; mientras que los que funcionan con proteínas se hallan basados en la molécula de ADN y por lo tanto no son susceptibles de estar afectados por el ambiente. De acuerdo con Torres y Moreno (2001) los marcadores moleculares presentan ciertas ventajas en comparación con los marcadores morfológicos e isoenzimáticos, entre estas destacan: 1) la detección de mayor variabilidad, facilitando así la identificación de las diferencias entre un individuo y otro; 2) el ambiente no influye de manera negativa, ya que el análisis del ADN se lleva a cabo

de manera directa; 3) existe una mayor objetividad de análisis, debido a que los resultados no dependen tanto de la apreciación del sujeto que realiza la observación; y 4) existe la posibilidad de obtener material de estudio (ADN) de cualquier estructura de la planta.

Marcadores moleculares de mayor uso

De acuerdo con Torres y Moreno (2001), la elección de la técnica a utilizar en un análisis molecular depende de la intención de la investigación; no obstante las técnicas utilizadas en la PCR (marcadores moleculares) presentan ventajas y desventajas específicas, por lo que a continuación se hace referencia a las principales características que distinguen a uno de otro.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

En este tipo de marcadores se lleva a cabo la identificación de pequeños cambios en la secuencia de ADN que modifican los patrones de corte de las endonucleasas de restricción; y se usa generalmente en la construcción de mapas genéticos para identificar aspectos de taxonomía y filogenia (Ramírez, 2015). Según las ventajas que se obtienen al utilizar dicho marcador son: 1) alta reproducción, es decir resultados iguales aun al probarse en diferentes laboratorios; y 2) proporciona marcadores codominantes. Por otra parte esta técnica también presenta varias desventajas, entre estas se encuentran: 1) la necesidad de contar con un gran número de sondas para detectar las diferencias entre individuos, lo cual requiere de mayor esfuerzo de tiempo y dinero; 2) el proceso para su obtención es largo y laborioso; 3) es necesario contar con altas cantidades de ADN de buena calidad (bajo contenido de polifenoles o polisacaridos) y 4) costos elevados de equipos (infraestructura).

Minisatélites

En el ADN genómico existen regiones denominadas minisatélites formadas por unidades de 10 a 60 pb; en este caso se utiliza como sonda un minisatélite para explorar de manera simultánea los loci. El polimorfismo determinado por minisatélites se denomina VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) y corresponde a la variación del número de repeticiones de la unidad básica de los diferentes individuos analizados. Las ventajas que se tienen al utilizar minisatélites son: 1) no es necesario tener información previa del genoma; 2) los resultados son altamente reproducibles; 3) los loci minisatélites son abundantes en el genoma; y 4) son muy polimórficos. Sin embargo, por otra parte existen también desventajas al emplear este recurso, entre estas destacan: 1) es un proceso prolongado y laborioso; 2) es necesario contar con grandes cantidades de ADN de buena calidad para que se produzca una digestión completa y una elevada reproducibilidad; 3) su costo de infraestructura es elevado; y 4) son marcadores dominantes.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Los marcadores moleculares de tipo RAPD se basan en la tecnología llamada “Amplificación Aleatoria del ADN polimórfico”, debido a que permite la síntesis de diferentes fragmentos pequeños de ADN; usualmente dicha técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos son detectados mediante la presencia o ausencia de bandas que son resultado de inserciones o deleciones en las regiones amplificadas, o bien a partir de cambios de bases en el ADN que alteran la unión del iniciador (Valadez y Kahl, 2000). De acuerdo con Becerra y Paredes (2000) los marcadores moleculares tipo RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) se basan en la amplificación al azar de fragmentos usando un partidor, ADN genómico, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa, dicha reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una

cadena molde; los productos obtenidos presentan gran variación polimórfica cuando se ha producido la pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la misma (ADN genómico). Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas de diferente peso molecular representan diferentes *loci*, sin embargo los productos de la reacción dependen del genoma en estudio, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 loci por partidor), su alta potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas (Becerra y Paredes, 2000).

Actualmente los RAPD son considerados como la técnica más viable para el análisis molecular ya que solo se utiliza un iniciador corto (6-10 nucleótidos); además de que existen programas comerciales de fácil manejo que constan de aproximadamente 3545 ciclos para llevar a cabo las etapas de desnaturalización del ADN molde, unión y elongación del cebador. Las ventajas que se obtienen al utilizar esta técnica son: 1) no es necesario tener conocimientos previos del genoma; 2) se requieren pequeñas cantidades de ADN; 3) métodos de extracción de ADN sencillos; 4) tienen un costo medio de infraestructura, ya que básicamente se utiliza un termociclador, un equipo de electroforesis y una fuente de luz ultravioleta; 5) los ensayos son fáciles y rápidos; 6) los marcadores se distribuyen de manera azarosa y son muy incidentes; y 7) los polimorfismos que se pueden encontrar son ilimitados. Sin embargo, en esta técnica también es posible hallar ciertos inconvenientes, tales como: 1) bajo índice de reproducción de fragmentos amplificados, principalmente aquellos de alto peso molecular (> 1600 pb); 2) modificación del patrón de los fragmentos, debido a pequeños cambios de las condiciones de reacción (tipo de polimerasa, concentración de ADN, concentración de cloruro de magnesio, condiciones de temperatura de la reacción, tipo de termociclador).

Los marcadores tipos RAPD son dominantes, tienen utilidad en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura

poblacional, amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación altos (Ramírez, 2015).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Es un marcador molecular que detecta la presencia o ausencia de los fragmentos de restricción, sin considerar las diferencias de longitud; el fundamento de esta técnica se encuentra sustentado en la combinación de la metodología que se sigue en las técnicas de RFLP Y PCR. El polimorfismo que se detecta mediante AFLPs puede presentar diferentes modificaciones, lo anterior debido a que se pueden manifestar mutaciones en los sitios de restricción o en la secuencia complementaria a los nucleótidos selectivos de los cebadores; por otra parte también puede darse el caso de la inserciones dentro de los fragmentos de restricción, ocasionadas por la presencia de bandas de distintos tamaños. Las ventajas que presenta la técnica de AFLPs son: 1) no es necesario tener conocimientos previos del genoma; 2) mayor eficiencia para el hallazgo de polimorfismos; 3) las regiones que se analizan se encuentran distribuidas en todo el genoma; y 4) el índice de reproducción es alto. Las desventajas que se presentan al utilizar dicha técnica son: 1) se necesita ADN de buena calidad y en altas cantidades; 2) el costo de infraestructura es excesivamente elevado; 3) en la mayoría de los casos los AFLP solo se analizan como marcadores dominantes.

Microsatelites

La técnica de microsatelites consiste en el uso de un tipo de ADN repetitivo denominado SSRs (Simple Sequence Repeats); cada una de las regiones que lo conforman están formadas por la repetición en agrupamientos de secuencias de ADN, que a diferencia de los minisatelites presentan menos de 100 pb en su longitud y las unidades que se repiten son más cortas (1-10 pb), por lo que son más específicos, facilitando así la asociación de ciertas especies por su homología;

de esta manera dicha técnica puede ser empleada para hacer estudios comparativos entre especies o géneros pertenecientes a un mismo grupo.

Las diferencias polimórficas que se obtienen con esta técnica se asocian a la longitud de los fragmentos amplificados en relación al número de repeticiones de la unidad básica del microsatélite en los individuos analizados. Entre las principales ventajas que se tienen con esta técnica se encuentran las siguientes: 1) cantidad pequeña de ADN para la amplificación; 2) los loci microsatélites son muy abundantes en el genoma; 3) polimorfismo elevado, debido a que los loci microsatélites son muy abundantes, permitiendo así distinguir a muchos individuos analizando muy pocos loci; 4) son marcadores codominantes; 5) altamente reproducible; y 6) el proceso puede llevarse a cabo de manera automatizada. Las principales desventajas que presenta esta técnica son: 1) la localización y caracterización de microsatélites útiles; 2) el diseño de primers adecuados; y 3) la imposibilidad de diferenciar individuos heterocigotos y homocigotos cuando se presentan alelos nulos producidos por alguna mutación.

ISSR (PCR- intermicrosatélites)

Los ISSR son marcadores moleculares conocidos como secuencias intersimples que permite realizar una aproximación a las regiones microsatélites aun sin tener conocimientos previos de las mismas. En esta técnica se utiliza un cebador de mayor longitud (1422 nucleótidos) y de secuencia tipo microsatélite. Los polimorfismo que se obtienen con esta técnica se deben a los cambios de secuencia que sufre el ADN cuando se une con los primers, así como a inserciones y deleciones que se hayan producido en los puntos de unión de los primers, dando lugar a la presencia o ausencia de bandas (Rentarías, 2007). Con dicha técnica se obtiene una gran cantidad de bandas polimórficas que van de 100 a 2000 pb: por otra parte la variación alélica se fundamenta en la determinación de la presencia o ausencia de los productos amplificados. Los marcadores ISSR son particularmente útiles en 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 (Reyes, 2008). Las ventajas que se obtienen al recurrir a esta técnica son: 1) no se requiere información previa del genoma; 2) las cantidades de ADN que se requieren son relativamente pequeñas y 3) existe un alto índice reproductivo, debido a que los primers que se utilizan son de mayor longitud y la temperatura de unión del iniciador es más alta. Por otra parte el principal inconveniente que se tiene con esta técnica es la incertidumbre sobre la homología de los fragmentos amplificados de igual tamaño y el poseer una herencia dominante.

2.9.2 La PCR (Polymerase Chain Reaction)

En la amplificación de ADN se emplea la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los 80s, así como la secuenciación del ADN, estas han revolucionado los estudios de genética molecular haciendo posible un nuevo acercamiento al estudio y análisis de genes (Watson *et al.*, 1992). La PCR es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar de manera enzimática y exponencial una región determinada de ADN mediante la síntesis de un gran número de copias de un fragmento específico de ADN específico cuya secuencia se conoce (Somma y Querci, 2007a), de esta manera es posible detectar polimorfismos que indican la variación con base a la secuencia de genes. Para llevar a cabo el procedimiento anterior se utiliza una enzima polimerasa que pueda trabajar a temperaturas muy elevadas; en la actualidad la más usual es la que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de altas temperaturas (79 °C a 85 °C), de ahí su nombre comercial, *taq* polimerasa (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Sin embargo la elección de la enzima depende de varios factores tales como: la fidelidad de la enzima o tasa de error (capacidad de producir errores o no durante el copiado), la velocidad (cantidad de nucleótidos incorporados por segundo en la cadena naciente de

ADN), la posesividad (capacidad de unirse al molde), la actividad exonucleasa (capacidad de corrección de errores) y los extremos del ADN resultante.

Actualmente la técnica de la PCR se ha hecho indispensable en la realización de muchos procedimientos en diferentes áreas del conocimiento, tales como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalística principalmente (Valadez, 2005), dado que se ha utilizado en la clonación de fragmentos específicos de ADN, en la detección e identificación de genes, así como en la expresión de genes en modelos de investigación. En trabajos recientes la técnica de PCR ha permitido explorar nuevos campos, como el control de la autenticidad de los alimentos, la identificación de la presencia de ADN genéticamente modificado y la contaminación microbiológica, entre otros (Somma y Querci, 2007a).

De acuerdo con Tamay de Dios *et al.* (2013) cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión; las cuales se describen enseguida:

- a) **Desnaturalización:** De acuerdo con Valadez y Kahl (2000) en esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 94°C a cadenas simples que servirán como moldes para la síntesis del (o los) fragmento (s) respectivo (s), durante un periodo de 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del marcador, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo; al final de dicha etapa se obtienen las cadenas separadas que servirán como base para continuar con el siguiente paso (Tamay de Dios *et al.*, 2013).
- b) **Hibridación (alineamiento, reconocimiento):** En esta etapa la temperatura se reduce para permitir la alineación de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco

del ADN molde. Las moléculas iniciadoras pueden presentar variaciones en cuanto a longitud, composición de bases nitrogenadas, especificidad para aparearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar de 25 a 65°C (Valadez, 2005). Por otra parte de acuerdo a Tamay de Dios *et al.*, (2013) mencionan que en esta segunda etapa los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado de primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

- c) **Extensión (alargamiento):** De acuerdo con lo mencionado por Tamay de Dios *et al.* (2013), en esta etapa la Taq polimerasa actúa sobre el complejo “hebra de ADN”-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN; permitiendo así la multiplicación exponencial del fragmento o fragmentos discretos, sintetizados a partir del modelo de ADN (Valadez, 2005). La extensión de las cadenas se da en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las ampliaciones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

2.9.3 Electroforesis

La electroforesis es una técnica que fue desarrollada por Tiselius en el año de 1937; se emplea principalmente para separar moléculas como proteínas, aminoácidos e iones inorgánicos en un campo magnético que actúa sobre partículas cargadas causando su movimiento a través de una matriz (Tiselius, 1937). Actualmente es considerada como el procedimiento más común utilizado para analizar fragmentos obtenidos de PCR; para su visualización se utilizan geles de agarosa o de acrilamida; mediante este proceso es posible separar fragmentos

de acuerdo a su tamaño. Aquellos fragmentos de ADN que presentan carga negativa se desplazan por el gel a través de un campo eléctrico hacia el polo positivo y viceversa. Los fragmentos más pequeños migran más rápido y son más visibles en la parte inferior del gel. La elección de la matriz (agarosa o acrilamida) y el porcentaje en la cual se separan los productos, depende del tamaño de los mismos; generalmente, los geles de agarosa se visualizan agregando bromuro de etidio, un agente que se intercala en el ADN y fluoresce cuando es expuesto a la luz UV, y en el caso de los geles de acrilamida, la tinción se realiza con nitrato de plata, que por interacciones electrostáticas se une al ADN (Somma, *et al.*, 2007b).

2.10 Análisis de la información

El estudio de los recursos genéticos es de gran importancia debido a que de este modo es posible definir su potencial comercial o determinar a qué clasificación taxonómica pertenece en caso de que aún no se haya determinado.

El uso de métodos cuantitativos en el análisis de recursos genéticos permite hacer agrupaciones de poblaciones de un mismo género o especie a través de similitudes de caracteres homólogos, para ello se emplea la llamada taxonomía numérica propuesta por Sneath y Sokal en 1962 (Nuñez-Colin *et al.*, 2010).

Los métodos de caracterización consideran las variables existentes entre los individuos que se incluyen en cualquier estudio, estas deben ser propiedades homologas que representan estructuras similares en los diferentes individuos, por lo cual es necesario que se utilicen individuos emparentados, es decir que pertenezcan a un mismo género o especie.

Los marcadores genético moleculares de DNA se basan en isoenzimas, proteína de reserva y DNA; por otra parte estos presentan dos tipos de datos que son: patrones de bandas y secuenciación de bases de DNA.

2.10.1 Procedimiento para realizar el análisis de la información

- 1) **Toma de Datos:** Se utiliza un patrón de bandas o una secuenciación de bases. Posteriormente se realiza algún tipo de interpretación que pueden ser de tipo a) Fenética de las bandas, b) Genética con datos dominantes, o c) Genética con datos codominantes (Nuñez-Colin *et al.*, 2010).
 - a. Fenética de las bandas: Se realiza mediante la codificación de datos binomiales, también llamados cualitativos de doble estado ya que la presencia de bandas se interpreta con el número 1 y la ausencia con el 0.
 - b. Genética con datos dominantes: Se utiliza cuando no es posible diferenciar al heterocigoto del homocigoto dominante, por lo cual se recurre al uso de fórmulas de genética de poblaciones, con el fin de obtener la frecuencia de alelos, sin embargo es necesario conocer previamente el número de alelos por locus y el número de loci que se está evaluando.
 - c. Genética con datos codominantes: Se emplea cuando se logra distinguir perfectamente a los homocigotos de los heterocigotos, de esta manera es más factible obtener las frecuencias alélicas y la diferenciación del número de loci a evaluar.

- 2) **Elaboración de matriz básica de datos (MBD):** Se realiza considerando las características que presenten una menor variabilidad dentro de cada UBC (Unidad Básica de Clasificación), seleccionando las variables que presenten alta heterogeneidad. Los análisis más utilizados en la caracterización son de tipo factoriales y de conglomerados (Nuñez-Colin *et al.*, 2010).

Los análisis factoriales son técnicas multivariadas que permiten representar los genotipos en graficas con dimensiones reducidas y ver el parecido entre ellos de acuerdo a su cercanía en un plano bi o tridimensional. Generalmente se utiliza para reducir información contenida en una serie de variables originales (Ejem. Bandas de ADN) en una serie más pequeña de dimensiones compuestas o valores teóricos nuevos evitando la perdida de información. Los más utilizados son: a) Análisis de Componentes Principales (ACP), b) Análisis de Coordenadas Principales (ACOP) y c) Análisis Factorial de correspondencias Simple (AFCS) (Nuñez-Colin *et al.*, 2010).

- a) Análisis de Componentes Principales (ACP): Es un procedimiento matemático utilizado para interpretar datos cuantitativos principalmente y mixtos, evitando datos binomiales; correlaciona las variables originales para generar un conjunto menor de variables denominadas Componentes Principales para realizar la evaluación de la información. Cada componente principal posee un valor vinculado a su importancia, ya que entre más alta sea esta última le corresponde una mayor varianza acumulada. Este tipo de análisis puede utilizarse en la interpretación de datos binomiales, sin embargo es necesario utilizar una matriz de varianzas-covarianzas para que todas las variables se encuentren en la misma unidad.
- b) Análisis de Coordenadas Principales (ACOP): Se utiliza específicamente en el análisis de datos binomiales.
- c) Análisis Factorial de correspondencias Simple (AFCS): Se utiliza en la interpretación de datos multinomiales basados en la distribución X^2 .

Los análisis de conglomerados, se utilizan para realizar agrupamientos mediante reglas más o menos arbitrarias, basándose en similitudes o disimilitudes que presentan los genotipos en sus variables evaluadas. La semejanza o diferencia se basa en distancias o índices multivariados; al contemplar el tipo de estudio a realizar y el tipo de datos que se tienen se elige el tipo de índice de similitud para los

patrones de bandas. Si se tienen datos binomiales (doble estado) o matrices con datos 1 y 0 se realiza una interpretación fenética bajo el principio que muestra las posibilidades y la codificación de los individuos con base en índices de similitud. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Posibilidades y codificación base de los índices de similitud

Individuo <i>i</i>	Individuo <i>j</i>	
	1	0
1	<i>a</i>	<i>b</i>
0	<i>c</i>	<i>d</i>

Donde **a** indica que dos individuos tienen presente un mismo carácter; **b** es cuando el primero tienen la característica y el segundo no; **c** el segundo presenta la característica y el primero no, y **d** cuando ambos individuos carecen de dicha característica. A partir de lo mencionado anteriormente se calculan los índices de similitud en donde m es la suma de concordancias ($m=a+d$); u es la suma de las discordancias ($u=b+c$); y n es la suma de las concordancias y las discordancias ($n=m+u$), y a partir de esta codificación se tienen las fórmulas para calcular los índices de similitud (Cuadro 1).

Las fórmulas más utilizadas en la interpretación fenética (0 y 1) de datos de marcadores genético moleculares son la de Jaccard, Dice y Simple Matching; sin embargo las dos primeras se distinguen por omitir las dobles ausencias que pueden no ser características homologas. En términos generales la fórmula de Dice es considerada como la recomendable, debido a su congruencia en la formación de grupos en los dendogramas obtenidos a partir de patrones de bandas de ADN, considerando principalmente datos codominantes. Por otra parte la fórmula de Jaccard sigue el mismo patrón de eficiencia que la fórmula descrita anteriormente, siempre y cuando se contemplen datos dominantes. La fórmula de

Simple Matching se recomienda utilizarla cuando se evalúan individuos muy emparentados.

Cuadro 2. Índices de similitud más utilizados en estudios de Caracterización (Nuñez-Colin y Valadez-Moctezuma, 2010).

Coeficiente (Nombre)	Fórmula	Autor
Simple Matching*	m/n	Sokal y Sneath (1963)
Jaccard	$a/n - d$	Jaccard (1908)
Dice	$2a/2a + b + c$	Nei y Li (1979)

* Aceptan datos cualitativos nominales (multinominales o multiestado sin secuencia lógica)

Las distancias multivariadas comúnmente utilizadas en sistemática filogenética para la interpretación de datos de estudios con marcadores genético moleculares son la de Sokal y Sneath (1963), Jaccard (1908), y Nei y Li (1979), las cuales están desarrolladas para el estudio de poblaciones en donde es posible inferir las frecuencias alélicas y génicas. Las fórmulas de Nei (1972, 1978) son las más utilizadas en estudios de genética de poblaciones. La fórmula original de Nei, establecida en 1972 (Cuadro 3) es la más recomendada para dicho tipo de estudios, además de que se encuentra incluida en los principales programas de análisis de datos codominantes (Nuñez-Colin *et al.*, 2010)

Cuadro 3. Fórmulas de distancias multivariadas de Nei 1972 y Nei 1978, utilizadas en sistemática filogenética (Nuñez-Colin *et al.*, 2010).

Nombre de la Distancia	Formula	Autor
Nei	$d\hat{y} = -\ln \left[\frac{\sum_k X_{ki} \cdot X_{kj} }{\sqrt{\sum_k X_{ki}^2 \cdot X_{kj}^2}} \right]$	Nei (1972)
Nei (imparcial)	$d\hat{y} = -\ln \left[\frac{\sum_k X_{ki} \cdot X_{kj} }{\sqrt{\frac{2n_i \sum X_{ki}^2 - n_{loci}}{2n_i - 1} \cdot \frac{2n_j \sum X_{kj}^2 - n_{loci}}{2n_j - 1}}} \right]$	Nei (1978)

n_{loci} = Numero de *loci* evaluados

Los métodos de aglomeración pueden ser de tipo jerárquicos y no jerárquicos, sin embargo, actualmente los primeros son los más utilizados. Los métodos de aglomeración tienen como fundamento unir pares de UBC's (Unidades Básicas de Clasificación), relacionando la distancia o índice de similitud par por par, considerando el máximo parecido para que vayan formándose los nudos o agrupamientos; posteriormente se forma una sola agrupación en donde a mayor valor de distancia, mayor es la diferencia entre agrupaciones y viceversa.

El método de agrupación más utilizado es el UPGMA (media no ponderada), basado principalmente en la reconstrucción de la matriz de distancias (o índices de similitud) mediante la media existente entre las UBC's que forman el nudo y las demás UBC's.

En el método Neighbor joining se utilizan distancias genéticas en estudios de tipo filogenético, no obstante, no se recomienda tanto en análisis de caracterización.

Cuadro 4. Métodos de aglomeración más utilizados en caracterización de Germoplasma (Nuñez-Colin *et al.*, 2010)

Nombre del Método	Forma de rehacer la matriz	Tipo de Representación	Autor
UPGMA	Media aritmética no ponderada	Jerárquicos y no jerárquicos	Sokal y Michener (1958)
Neighbor joining	Mediante cálculos filogenéticos	Filogenéticos de ramas con diferente longitud	Saitou y Nei (1987)

III. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México prevalecen formas diversas de genotipos nativos de aguacate pertenecientes al género *Persea*. Además esta región es importante porque en ella se concentran varias especies originarias que se hallan dispersas, entre las cuales se encuentra *Persea americana* (raza mexicana), *Persea cinerascens* (aguacatillos silvestres), *Persea hintonni* y *Persea floccosa*.

Actualmente prevalece gran confusión en cuanto a la ubicación taxonómica de especies, razas y variedades, debido a su alto grado de hibridación entre ellas, sin embargo por medio de la caracterización morfológica y molecular de las especies es posible identificar la diversidad de los recursos genéticos con que se cuenta en una región, un país y en este caso en particular en el Estado de México. De tal forma poder hacer un uso eficiente de los recursos en beneficio de la población, rescatando genotipos valiosos que pueden ser utilizados para la obtención de nuevas variedades capaces de cumplir con las exigencias y expectativas de la industria del aguacate.

En el Centro Universitario UAEM Tenancingo, se han desarrollado trabajos de investigación de caracterización morfológica y molecular de germoplasma de aguacate; sin embargo de acuerdo a revisiones recientes, cuando ambas técnicas se conjuntan se obtiene información más completa, precisa y robusta lo cual permite realizar una descripción y distinción más exacta de los genotipos.

Es importante resaltar que en el presente trabajo se realizó la ubicación a nivel molecular de algunos tipos de aguacate denominados “cascarudos” que aún no han sido reportados para el Estado de México, pero que prevalecen en nichos ambientales con características específicas de la región bajo un confinamiento edafoclimático particular que les permite expresar propiedades morfológicas distintivas; principalmente en hoja y fruto.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente especies del género *Persea* y relacionarlas filogenéticamente con un nuevo tipo de aguacate localizado en el sur del Estado de México.

4.1 Objetivos específicos

- a) Analizar la eficiencia de marcadores moleculares tipo RAPD e ISSR en la descripción de 41 genotipos de aguacate
- b) Ubicar filogenéticamente el híbrido natural (tipo cascarudo) de *Persea*, aún no identificado
- c) Describir morfológicamente el híbrido natural (tipo cascarudo) de *Persea*, aún no identificado

V. HIPÓTESIS

Los agrupamientos de *Persea* obtenidos a partir de marcadores moleculares tradicionales (RAPD e ISSR) permiten conocer la identidad de genotipos de aguacate y a su vez establecer interrelaciones entre ellos para utilizar de manera provechosa la diversidad genética de aguacate que aún prevalece en el sur del Estado de México.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del sitio donde se llevó a cabo 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, ubicado en Santa Ana Ixtlahuatzingo, Tenancingo, Estado de México y en

el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

6.2 Recolección del material vegetal

El material vegetal se colectó en diferentes municipios comprendidos dentro de la denominada franja aguacatera, que abarca en el Estado de México, adicionalmente se incluyeron ejemplares que se encuentran alojados en el huerto del Centro Universitario UAEM Tenancingo (Cuadro 5); los cuales fueron denominados como “UAEM”, estos han sido conservados de manera *in situ* en el huerto del Centro Universitario UAEM Tenancingo, se desconoce su origen y su colector, aunque algunos se originaron en el sitio por sí mismos, otros fueron establecidos como plantas injertadas de las variedades “Hass” y “Fuerte”, algunos persisten como tal, en otros el injerto murió y lo que prevalece es el rebrote del portainjerto, cualquiera que haya sido su origen fueron caracterizados morfológicamente; algunos muestran los frutos típicos de la raza mexicana (Flores, 2014).

6.3 Caracterización molecular de los materiales

En el proceso para llevar a cabo el análisis molecular de las muestras, se utilizaron hojas jóvenes libres de plagas y enfermedades colectadas en distintos sitios del sur del estado de México (Cuadro 5). Las muestras fueron resguardadas en papel húmedo dentro de bolsas de polietileno en una hielera con el fin de evitar su deshidratación durante el traslado al laboratorio. Para evitar confusiones cada muestra fue etiquetada con los siguientes datos: nombre del genotipo, lugar de colecta, fecha y nombre del colector.

En el laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario UAEM Tenancingo, se llevó a cabo el proceso de extracción de ADN utilizando como tejido vegetal hojas jóvenes; se empleó el Kit comercial innuPREPPlant DNA Kit analytikjena de Biometra®, el cual se basa en el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) modificado (Saghai-Maroo *et al.*, 1984).

Cuadro 5. Genotipos utilizados en el proceso de caracterización molecular en el presente estudio

Núm.	Clave	Genotipo	Lugar de Colecta	Subgenero / Especie / Raza
1	CUT-M 1	UAEM /2	Centro Universitario UAEM Tenancingo, México	
2	CUT-M 3	UAEM /3	“	
3	CUT-M 4	UAEM/ 4	“	
4	CUT-M 5	UAEM/5	“	
5	CUT-M 6	UAEM/6	“	
6	CUT-M 7	UAEM/7	“	
7	CUT-M 8	UAEM/8	“	
8	CUT-M 9	UAEM/9	“	
9	CUT-M 10	UAEM/10	“	
10	CUT-M 11	UAEM/ 11	“	
11	CUT-M 12	UAEM/12	“	
12	CUT-M 13	UAEM/13	“	
13	CUT-M 15	UAEM/15	“	
14	CUT-M 16	UAEM/16	“	
15	CUT-M 17	UAEM/ 17	“	
16	CUT-M 18	UAEM/ 18	“	
17	CUT-M 21	UAEM/21	“	
18	CUT-M 22	UAEM/ 22	“	
19	VGMEX- 1	Aceitoso	San F. Villa Gro., Edo. de México	Persea / Persea americana / var. <i>Drymifolia</i>
20	VGMEX- 2	Cantaros	“	
21	OAX-CAS 1	Cascle viejo	San M. Mexicapan, Oaxaca, Méx.	
22	OAX-ZA 1	Mdo. de Zaachila	Zaachila, Oaxaca, Méx.	
23		M. 71	“	
24		Gua- t- 116	“	
25		Antillano Ixtapan	“	
26	CH-I-3	Floccossa	CICTAMEX S.C.	
27		Tantima/ II	“	
28	IXT-OR 1	Ixtapan / 1	San M. Oco, Ixtapan del Oro, Méx.	
29	IXT-OR 2	Ixtapan / 2	“	
30	IXT-OR 3	Ixtapan / 3	“	
31	IXT-OR 4	Ixtapan / 4	“	
32	OAX-YAT 1-5	Yatzachi /1- 5	Yatzachi el alto, Oaxaca, Méx.	
33	OAX-YAT 2-9	Yatzachi / 2- 9	“	
34	OAX-ZIM 1	Zimatlan / 1	Cienega de Zimatlán, Oaxaca, Méx.	
35		Chinini 236- F Ixtapa	CICTAMEX S.C.	
36		Anayo	Huatusco, Veracruz	
37	CH-C-30	Cinerascens	Michoacán / CICTAMEX S.C.	
38		Parvifolia	Zongolica, Veracruz	
39		Lingüe 32	Chile	
40		Meyeniana	Chile	
41		Persea sp.	Veracruz	

6.3.1 Extracción de ADN

La extracción del material genético de las muestras se realizó mediante la utilización del kit comercial innuPREPPlant DNA Kit analytikjena de Biometra®, siguiendo la metodología propuesta por el fabricante.

Metodología utilizada con el kit comercial innuPREPPlant DNA Kit analytikjena de Biometra®

1. Se seleccionaron muestras de tejido vegetal limpias y libres de patógenos; las cuales fueron maceradas en morteros pequeños, mediante la utilización de hidrogeno líquido.
2. 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.
3. Posteriormente se colocó un tubo con filtro al cual se agregó la muestra incubada que se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto.
4. 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.
5. 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 μl de la solución MS (Washing Solution), centrifugando a 12,000 rpm durante 1 minuto.

6. 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 μl 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis posterior.

6.3.2 Cuantificación de ADN (concentración)

La espectrofotometría permite la cuantificación de muestras de ácidos nucleicos y proteínas mediante la transmisión de luz a través de un medio líquido; basandose en el nivel de absorbancia comprendido entre 260 y 280 $\text{ng}/\mu\text{L}$ debido a que en este rango las muestras presentan buena cantidad y calidad de ADN; sin embargo cuando las muestras rebasan dicho rango es necesario realizar lavados para purificar el material genético (Riepl *et al.*, 2011).

La medición de la concentración de ADN se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro modelo ND-1000 Nano Drop; el cual considera que una muestra de ADN de buena calidad debe hallarse entre 1.6 y 2.0 μL .

6.3.3 Purificación y digestión del ADN

6.3.3.1 Purificación de muestras

La calidad del ADN de las muestras no fue buena, por lo que se procedió a la realización de un lavado de las mismas mediante técnicas que permiten la eliminación de impurezas tales como polisacáridos, grasas, proteínas, entre otros.

6.3.3.2 Digestión del ADN

La digestión del ADN se realizó considerando el protocolo de Weising *et al.* (2005); el cual permite digerir el material genético para obtener fragmentos de menor longitud a partir de una secuencia conocida; en su mayoría dichas secuencias son palindrómicas, es decir que se leen igual en ambas direcciones. La técnica de digestión de ADN en el presente estudio fue utilizada para cortar el material genético obtenido a partir de la separación de fragmentos, mediante la acción de la enzima de restricción *EcoR1*; posteriormente las muestras obtenidas pueden ser utilizadas para diferentes fines; en este caso fue para inducir la separación de fragmentos por electroforesis y distinguir la relación existente entre varios genotipos de aguacate considerando la cantidad de pares de bases presentes. A continuación se menciona el protocolo que se siguió para llevar a cabo el proceso de digestión del ADN:

- 1.- Las muestras fueron lavadas con agua destilada estéril y colocadas en tubos eppendorf. Posteriormente a cada una se agregó 0.05 volumen de NaCl 5 M y etanol. Las muestras se colocaron en hielo durante 10 minutos, con fin de precipitar polisacáridos y algunos otros agentes contaminantes.
- 2.- Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm y se les agregó isopropanol; cada una se mezcló por inversión y se almacenó durante 1 hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.- Se centrifugaron nuevamente las muestras y se decantó el alcohol lavando la pastilla de ADN con etanol al 70 % (100 μL). Finalmente se volvieron a centrifugar y se escurrieron las pastillas durante 6 h para después ser disueltas en DNA Rehydration Solution 10 mM Tris, 1 mM EDTA de Promega (50 μl).

6.3.4 PCR

En la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para RAPD se utilizaron 100 ng de ADN, 0.3 μL de Taq polimerasa (Fermentas, EE.UU.), dNTP tampón (1X Taq), 2.0 mM de MgCl_2 , y el primer, en un volumen total de 25 μL . Los mismos componentes mencionados anteriormente se utilizaron para ISSR. Sin

embargo, la cantidad de ADN y la concentración de MgCl₂ se modificaron a 50 ng y 3,0 mM. Los primers que se utilizaron fueron de tipo RAPD e ISSR (Cuadro 6); para ambos se utilizó el equipo de termociclaje Gene Amp PCR System 2700 AB Applied Biosystems®.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador de tipo Gene Amp PCR System 2700® (Applied Biosystems, EE.UU.), bajo los programas concentrados en los cuadros 7 y 8; los primers de PCR utilizados se muestran en el cuadro 9. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% (29:1); el marcador molecular de ADN utilizado como referencia, fue el de 1 kb de peso molecular (Gibco, EE.UU.). Las condiciones de electroforesis en el gel se realizó a 280 voltios durante 2.5 h aproximadamente en un tampón TBE 1X; los geles fueron teñidos con 0.2% de AgNO₃ de acuerdo con el protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 1989) y documentados usando el sistema de V.2.0.3 Ciencia Kodak Digital 1D (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, EE.UU.).

Mediante la técnica de PCR se sintetizaron fragmentos específicos de ADN con el fin de detectar a aquellos que son propios del genoma de aguacate.

Cuadro 6. Marcadores moleculares (RAPD e ISSR) utilizados en la caracterización molecular de colectas de aguacate

Primers	
RAPD	Sequence 5'-3'
E 18	GGA CTG CAG A
E 14	TGC GGC TGA G
A 15	TTC CGA ACC C
C 08	TGG ACC GGT G
ISSR**	Sequence 5'-3'
AC(GACA) ₄	AC-GACAGACAGACAGACA
(AC) ₈ YG	ACACACACACACACAC-YG
(GA) ₈ YC	GAGAGAGAGAGAGAGA-YC
(TCC) ₅ RY	TCCTCCTCCTCCTCC-RY

** Y =C,T; R= A,G, Marcadores con ancla

G: Guanina, T: Timina, C: Citocina, A: Adenina

Cuadro 7. Programa de termociclaje utilizado para RAPD con equipo de termociclaje Gene Amp® PCR System 2700 AB Applied Biosystems.

Fase	Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura (°C)
A	1	- Desnaturalización	1 min	94 °C
	35	- Desnaturalización	30 s	94 °C
		- Alineamiento	30 s	40 °C
		- Extensión	1.5 min	72 °C
B				
C	1	- Extensión final	2.5 min	72°C

Cuadro 8. Programa de termociclaje utilizado para ISSR con equipo de termociclaje marca Gene Amp® PCR System 2700 AB Applied Biosystems.

Fase	Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura (°C)
A	1	- Desnaturalización	1 min	94 °C
	38	- Desnaturalización	30 s	94 °C
B		- Alineamiento	30 s	48 °C
		- Extensión	2 min	72 °C
C		1	- Extensión	2.5 min

Para la realización de la PCR se utilizó la mezcla de los siguientes reactivos (Cuadro 9):

Cuadro 9. Mezcla de reacción para realizar la PCR en la mezcla Master mix

Reactivos	Cantidad (Reacción 1X)
Agua estéril	4.7 µL
10X PCR Buffer	2.5 µL
25 mM Mg Cl	2.5 µL
dNTPs 10 Mm	10 µL
Primer	1 µL
Enzima (Taq ADN Polimerasa)	0.3 µL
DNA * (ADN molde)	2.0 µL
TOTAL	23 µL

6.3.5 Elaboración de geles de acrilamida

Los geles de acrilamida fueron utilizados para hacer el corrimiento de las muestras y así visualizar el desplazamiento de las bandas de forma nítida y sin barridos; lo anterior fue facilitado por la calidad y pureza del ADN previamente purificado (Cuadro 10).

Cuadro 10. Reactivos utilizados en la elaboración de geles de acrilamida

Reactivo	Concentración
Acrilamida	26 ml
Agua destilada	70 ml
TBE 5X1	24 ml
APS 10%2	840 ml
Temed3	70 µl

6.3.6 Tinción y revelado de geles de acrilamida

El gel después de haber sido retirado de la cámara de electroforesis, fue colocado en una charola en la cual previamente se vertió la solución fijadora compuesta por etanol al 10% y ácido acético al 1%; posteriormente se puso en un agitador durante 10 minutos para fijar la solución; posteriormente el sobrante de la solución fue eliminado y se agregó Nitrato de plata hasta cubrir el gel completamente; la etapa de agitación por 10 minutos se realizó nuevamente para facilitar la penetración de la solución. Al término del lapso señalado se procedió a retirar el gel y se eliminó la solución; se agregó la solución reveladora (NaOH al 3% con formaldehído), distribuyéndola alrededor del mismo para que el formaldehído empezara a teñir el gel y poco a poco se fueron haciendo visibles las bandas; el líquido restante de la charola se retiró y se procedió a lavar el gel con agua destilada. Finalmente el gel se colocó en una charola nueva ubicada detrás de un transiluminador para visualizar las bandas.

6.3.7 Análisis Estadístico

En cada uno de los geles de acrilamida utilizados para el corrimiento de las muestras se determinó el número de bandas polimórficas; con dicha información se elaboró una matriz binaria 1 y 0; donde el 1 indica la presencia de una banda de ADN y el 0 representa la ausencia de dicha banda. Posteriormente se construyeron dendogramas combinando los métodos de construcción mediante la distancia/ matriz de similitud Nei and Li / Dice y el método de construcción Neighbor – joining, mediante la matriz de similitud Jaccard y el método de construcción UPGMA y Jaccard con Neighbor-joining, con un remuestreo (“Bootstrapping”) de 1000 repeticiones, utilizando el programa Free Tree versión 0.9.1.50 (Pavlícek *et al.* 1999). De dichas combinaciones se seleccionaron los mejores árboles de consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir *et al.* 2001); para editar y analizar los dendogramas obtenidos se utilizó el programa Fig Tree (Rambaut, A. 2014), logrando obtener figuras de alta calidad visible.

Cuadro 11. Fórmulas de los parámetros de evaluación para determinar la eficiencia de los marcadores moleculares

% de Polimorfismo	Poder de Resolución (RP)	Contenido de Información Polimórfica (PIC)	Índice del Marcador
No. De bandas polimórficas / No. Total de bandas	$R_p = \sum I_b$	$PIC_i = 2f_i (1-f_i)$	$I_b = 1 - (2x 0.5 - p)$

6.4 Descripción del nuevo genotipo

Los descriptores que se utilizaron en la descripción morfológica del nuevo genotipo híbrido natural son los desarrollados por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 1995) y la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2006), los cuales fueron elaborados con

fines de identificación, conservación y para hacer validos los derechos de obtentor; no obstante hoy en día son empleados en la descripción de germoplasma de aguacate (colectas y/o variedades), considerando las características más sobresalientes de las estructuras; entre estas se consideran esencialmente hojas, flores, frutos y semillas (Cuadro 12).

Cuadro 12. Caracteres considerados para la descripción de los genotipos basados en las directrices IPGRI (1995) y UPOV (2006).

CARACTERES DE LAS ACCESIONES		
Cuantitativos	Cualitativos	
D E S A R R O L L O V E G E T A T I V O	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 ápice del vástago	
	Extensión del Crecimiento de los vástagos	Forma de la hoja
	Longitud de entrenudos de los vástagos	Olor a anís
	Diámetro de los vástagos	Color de hojas maduras
	Longitud del peciolo hojas maduras	Color de hojas jóvenes
	Área foliar (longitud, ancho relación largo ancho)	Peciolo acanalado
	Numero de venas secundarias	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	

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea”

F L O R	Núm. de flores x	Tipo de floración
	inflorescencia	Color lenticelas inflorescencia
	Ancho pétalo	Pubescencia del pétalo
	Ancho sépalo	Densidad pubescencia pétalo
	Longitud pétalo	Pubescencia sépalo
	Longitud sépalo	Densidad pubescencia sépalo
	Longitud pedicelo	Estilo de la flor
	Longitud eje principal inflorescencia	Polen
	Numero de ramificaciones por inflorescencia	Base nectario
	Longitud ramificación	Color flor
F R U T O	Longitud	Forma de la base
	Diámetro	Forma del ápice
	Peso	Aristas del
	Posición del pedicelo	Tamaño de lenticelas
	Longitud del pedúnculo	Densidad de lenticelas
	Diámetro del pedúnculo	Color lenticelas
	Longitud del pedicelo	Lenticelas corchosas
	Diámetro de la base del pedicelo (mm)	Color de la cascara
	Diámetro del ápice pedicelo (mm)	Brillantes de la cascara
	Grosor de la cascara	Distinción de la unión del pedicelo al pedúnculo
S E M I L L A	Longitud de la cavidad	Forma del pedicelo
	Diámetro de la cavidad	Pedicelo en forma de cabeza de clavo
	Longitud de la semilla	Color del pedicelo
	Diámetro de la semilla	Cubierta de la semilla
	Peso de la semilla	Espacio libre de la cavidad de la semilla
	Porcentaje de la semilla relativa al peso del fruto	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	

En la descripción morfológica del genotipo cascarudo a describir en el presente trabajo se tomaron de 5 a 10 repeticiones de cada hoja, flor, fruto y semilla; las cuales se midieron con los siguientes instrumentos: vernier, flexómetro, regla y báscula, de acuerdo al tipo de estructura. En el caso de fruto, se utilizó una balanza granataria para evaluar la variable peso.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Comparación de protocolos de extracción de ADN basados en el CTAB

En el presente trabajo se llevó a cabo la extracción de ADN utilizando el kit comercial innuPREPPlant DNA Kit analytikjena de Biometra®, lo cual facilitó el proceso y nos permitió obtener muestras de ADN de calidad. Sin embargo, es necesario conocer que reactivos se utilizan en el procedimiento original conocido como CTAB, el cual fue propuesto por Saghai-Marroof *et al.* (1984) (Cuadro 13). El CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) es un detergente que permite obtener ADN libre de contaminantes que afectan el proceso de la PCR (Velázquez *et al.*, 2014). El protocolo del CTAB es considerado como un método de extracción de ADN, económico, eficiente y fácil de estandarizar al trabajar con un alto número de muestras; principalmente cuando se trata de plantas y alimentos derivados de vegetales, ya que en algunos casos pueden presentar una alta concentración de polisacáridos y polifenoles; por otra parte también ha sido utilizado de manera eficiente en diversas especies de bacterias, hongos, líquenes e insectos; sin embargo el protocolo original tiende a sufrir modificaciones en relación a las necesidades de cada investigador, siendo que dicha acción se fundamenta principalmente en la modificación de la cantidad de reactivos a utilizar en cada etapa (Rogers y Bendich (1985), Doyle y Doyle (1990), Clarke *et al.* (1989)). En el caso de aguacate Álvarez García (2002) y Reyes Alemán (2013) han realizado adecuaciones para favorecer la eliminación de contaminantes que pueden afectar la esencia y calidad de las muestras; por ello en el Cuadro 13 se hace una comparación de la cantidad de cada reactivo utilizado de acuerdo a las necesidades de genotipos de aguacate estudiados anteriormente.

Cuadro 13. Comparación de procedimientos tradicionales con base en el CTAB empleados en la extracción de ADN.

ETAPA	COMPONENTES	PROCEDIMIENTOS	
		Saghai-Marroof <i>et al.</i> (1984). Modificado por Rogers y Bendich (1985) y Doyle y Doyle (1990)	Clarke <i>et al.</i> (1989). Modificado por Álvarez García (2003).
Extracción de ADN	d H ₂ O		
	Tris-HCL	100 Mm	100 mM
	NaCl 5M	700 Mm	2100 mM
	EDTA ¹	20 Mm	150 mM
	CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)	2%	4 %
	PVP	0.2%	2%
	BME (β-mercaptoethanol)		140 mM
Lavado	Cloroformo-Alcohol	24:1	
	Cloroformo-Octanol		24:1
Incorporación de la solución de RNAsa	RNAsa	10mg/mL (hervida, previo a su uso)	15 µL de RNAsa (10 mg/µL)
	Tris-HCl	10 Mm	
	NaCl	15 Mm	75 µL de NaCl 5 M
	100% Isopropanol frio	0.6 volúmenes	
Lavado	Etanol absoluto (frio)		1 mL
	Etanol o Isopropanol	76%	
	Acetato de Amonio	10Mm	
Preparación de Buffer TE	Tris-HCl 10Mm	100 Mm	150 µL
	EDTA 0.5 M pH 7.5 u 8	20 mM	
Acetato de amonio		7.5 M	

7.2 Eficiencia de los marcadores moleculares

En el presente trabajo se utilizaron marcadores moleculares RAPDs e ISSR. De acuerdo con Rentarías (2007) al comparar los RAPD con los ISSR, se tiene que estos últimos presentan secuencias usualmente más largas, lo que da lugar a un índice de reproducción mayor de las bandas, permitiendo así tener un panorama más amplio de la información.

La variación alélica en los ISSR se determina en relación a la presencia o ausencia de productos amplificados; comparada con los RAPD, la secuencia de los ISSR es usualmente larga lo que da lugar a una mayor reproducción bandas (Rentarías, 2007).

Los polimorfismos más abundantes para RAPD se obtuvieron con los primers A15, E14 y C08; mientras que para ISSR los más eficientes fueron (AC) 8YG y (GACA)₄ descritos en el Cuadro 6 de materiales y métodos; los marcadores antes mencionados generaron información relevante que nos permite interpretar la relación existente entre los genotipos de estudio (Figuras 31-36).

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico multivariado. En ambos casos se presentó un polimorfismo total del 100%. En el análisis de RAPD, se obtuvo un total de 144 bandas polimórficas; con un promedio de 36 bandas por primer; el porcentaje de contribución se mantuvo en un rango que fue de 16.38381201 a 31.26631854 (Cuadro 14); mientras que el contenido de información polimórfica (PIC) fue de 0.2850208 a 0.4088043, con un promedio de 0.34525559 (Cuadro 15). En la evaluación de la eficiencia de ISSR se obtuvo un total de 114 bandas polimórficas, considerando un promedio de 28.5 bandas por primer; el contenido de información polimórfica (PIC) generado vario de 0.2072484 a 0.2352262 (Cuadro 15): el rango de porcentaje de contribución obtenido fue de 22.50755287 a 27.64350453 (Cuadro 14).

Cuadro 14. Primers utilizados para el desarrollo de marcadores de DNA, número de bandas, amplicones y % de contribución obtenidos por iniciador.

Tipo de marcador	Clave	Número de bandas / iniciador	Amplicones / iniciador	% de contribución
RAPD	8(E18)	50	479	31.26631854
	6(E14)	42	418	27.2845953
	A15	20	251	16.38381201
	C 08	32	384	25.06527415
	TOTAL	144	1532	100
	PROMEDIO	36	383	
ISSR	(AC)8YG	20	149	22.50755287
	(GA)8YC	30	183	27.64350453
	(TCC)5RY	34	181	27.34138973
	AC(GACA)4	30	149	22.50755287
	TOTAL	114	662	100
	PROMEDIO	28.5	165.5	
Gran total			2194	

Cuadro 15. Descripción general de los primers utilizados en relación al número de bandas obtenidas, número de bandas polimórficas, % de polimorfismo, poder de resolución (RP), contenido de información polimórfica (PIC) e índice del marcador (MI).

TIPO DE MARCADOR	CLAVE	NÚM. TOTAL DE BANDAS	NÚM. DE BANDAS POLIMORFICAS	% DE POLIMORFISMO	PODER DE RESOLUCIÓN (RP)	CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMORFICA (PIC)	ÍNDICE DEL MARCADOR
RAPD	8(E18)	50	50	100	20.7804878	0.28502082	14.251041
	6(E14)	42	42	100	20.3902439	0.33874394	14.2272457
	A15	20	20	100	12.097561	0.40880428	8.17608566
	C 08	32	32	100	16.3902439	0.3484533	11.1505057
	TOTAL	144	144			69.6585366	1.38102235
	PROMEDIO	36	36		17.4146341	0.34525559	11.9512195
ISSRs	(AC)8YG	20	20	100	6.05263158	0.22264543	4.45290859
	(GA)8YC	30	30	100	9.42105263	0.23522622	7.0567867
	(TCC)5RY	34	34	100	9.52631579	0.22466189	7.63850416
	AC(GACA)4	30	30	100	7.84210526	0.20724838	6.21745152
	TOTAL	114	114			32.8421053	0.88978192
	PROMEDIO	28.5	28.5		8.21052632	0.22244548	6.34141274

7.3 Interpretación de dendogramas

Los dendogramas generados representan las relaciones existentes entre los genotipos de estudio, lo cual difiere en el agrupamiento en relación a la similitud

de sus polimorfismos, de esta manera es posible visualizar las conglomeraciones que se forman de acuerdo al contenido de información genética. En el análisis de los dendogramas generados, en primera estancia se llevó a cabo una revisión de los criterios de agrupamiento; posteriormente se realizó una comparación entre marcadores, lo cual nos permitió elegir tres árboles de los mejor consensados, seleccionando uno de la combinación RAPD- ISSR, otro de RAPD y uno más de ISSR (Ver figuras 17,18 y 19).

En el dendograma generado bajo el criterio de combinación de RAPD e ISSR, se distinguió el alejamiento de los genotipos UAEM 7 y Cascle Viejo del resto, además se observa una notoria dispersión de los genotipos cascarudos, resultando poco clara su ubicación al igual que Floccosa y Tantima II; los genotipos tienden a separarse en dos ramificaciones principales. En la primera ramificación los genotipos denominados criollos correspondientes a la raza mexicana se encuentran dispersos y albergan al individuo de raza Guatemalteca (Genotipo 21) y a los antillanos (Antillano y Antigua 19) utilizados como referencia, además de los genotipos Ixtapan 1, 2, 3 y 4. Por otra parte la ramificación 2 distingue a los Yatzachi 1-5, Yatzachi 2-9 y Chinini 236 (Figura 17).

En el análisis de RAPD se obtuvo tres grupos principales (ramificaciones); en el grupo 1 se aglomera a la mayoría de los genotipos cascarudos relacionándolos con *Persea floccosa*, además se distingue del resto Cascle viejo y UAEM 7, ambos criollos pertenecientes a *P. americana* var. *Drymifolia* (raza mexicana); el primer genotipo proviene de los Valles Centrales de Oaxaca y el segundo del huerto localizado en el Centro Universitario Tenancingo, México. Este tipo de marcadores moleculares agrupan y separan del resto de genotipos estudiados a las especies de referencia; *P. meyeniana*, *P. lingue* y *Persea* spp. En el agrupamiento 2, estos últimos tres genotipos llamados aguacatillos correspondientes al subgénero *Eriodaphne* provenientes de Chile, los dos primeros y de Veracruz, México el tercero (Figura 18).

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea”

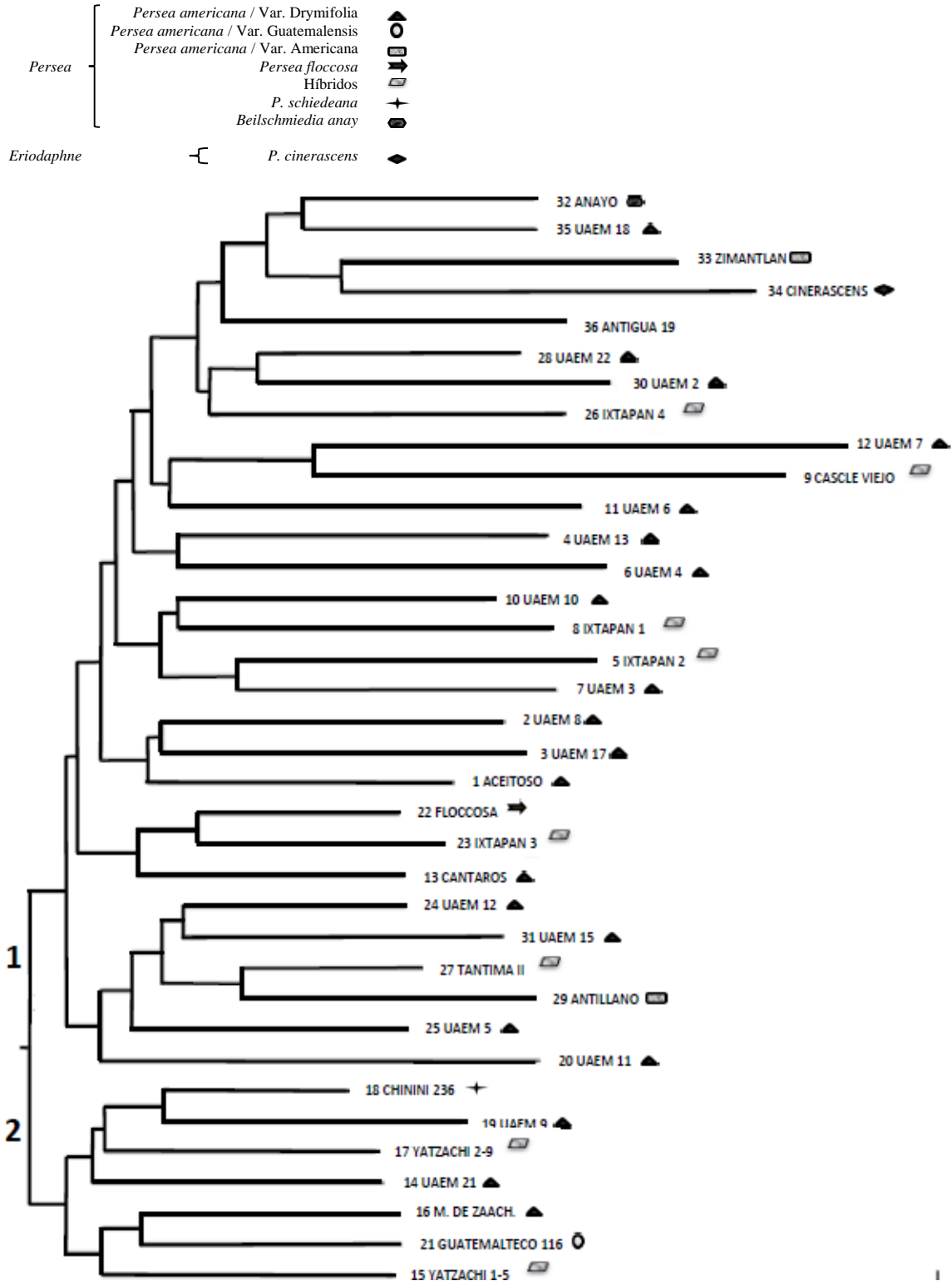


Figura 18. Dendrograma de RAPD e ISSR generado mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei y Li Dice- y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining- con un Bootstrapping de 1000 repeticiones.

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea”

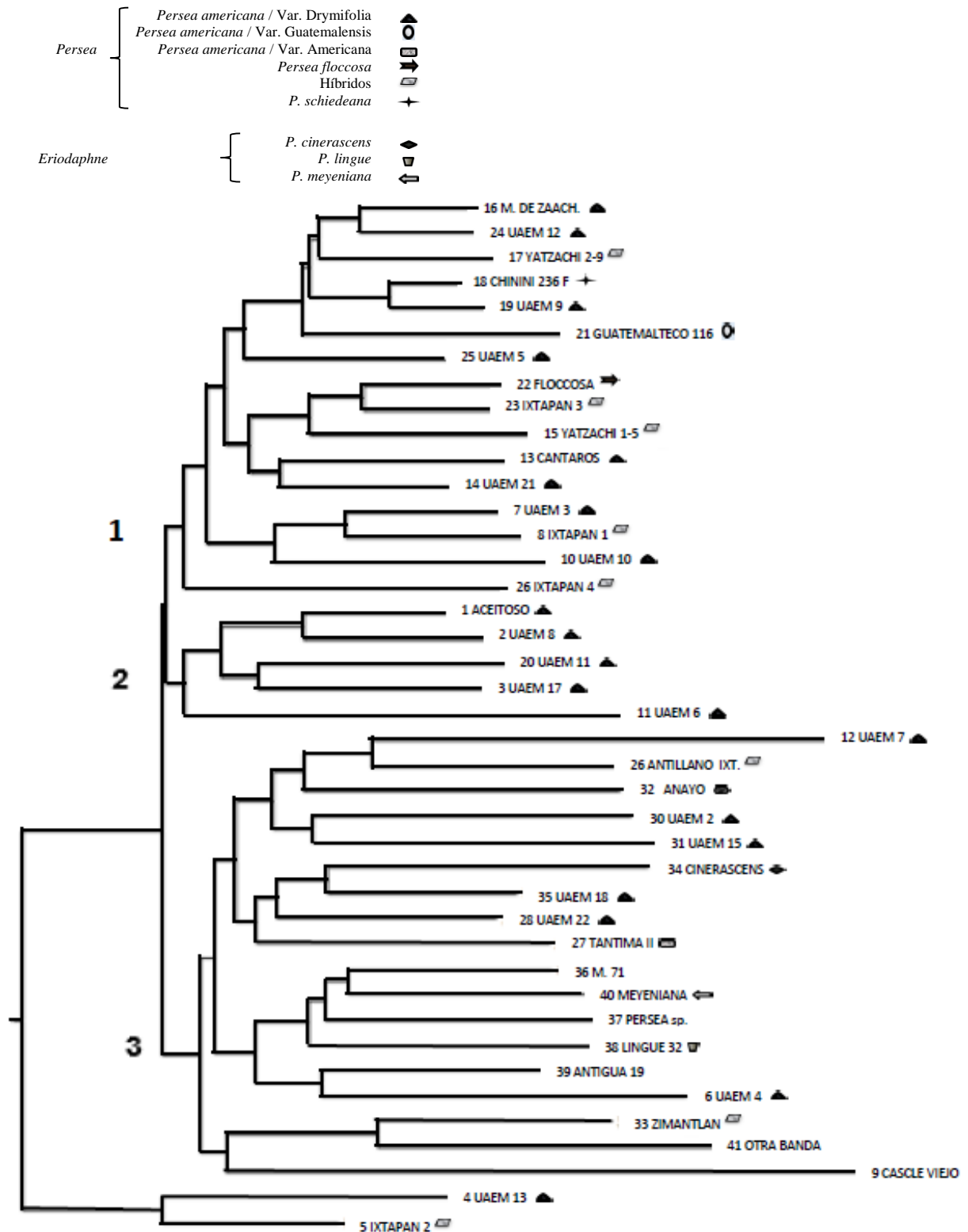


Figura 19. Dendrograma de RAPD generado mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei y Li Dice- y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining- con un Bootstrapping de 1000 repeticiones.

La ventaja de trabajar RAPD es que se tiene la capacidad de distinguir genotipos interespecíficos, lo cual permite detectar con mayor facilidad poblaciones provenientes de especies distintas (Valadez y Kahl, 2000) basándose principalmente en la probabilidad estadística de encontrar sitios complementarios al iniciador de 10 pares de bases. Podemos evidenciar afinidad filogenética entre los genotipos Ixtapan, Yatzachi con el genotipo de la especie *P. floccosa* y el ejemplar de la raza guatemalteca.

Los ISSR son microsatélites anclados, ya que en sus extremos presentan un par adicional de bases, lo cual permite la detección de mayor variabilidad genética, por lo anterior se difiere que son más eficientes que los marcadores de tipo RAPD, debido a que detectan con mayor facilidad la variabilidad genética (Valadez y Kahl, 2000). Se reconoce que la técnica ISSR es capaz de detectar amplicones conservados entre microsatélites del mismo tipo; si los fragmentos corresponden en tamaño entre los individuos que están siendo comparados, se muestra que la relación genética existente entre ellas es muy cercana (Reyes-Alemán *et al.*, 2016).

Los ISSR separaron 3 agrupamientos, tienden a hacer una conjunción de los tipos cascarudos Ixtapan y Yatzachi en los subgrupos 2 y 3 (Figura 19). El grupo 3 conjuntó a 3 especies distintas a *P. americana* además de esta misma; *P. shiedeana* (18 chinini 236), *P. floccosa* (22 Floccosa) y *P. cinerascens* (35 Cinerascens). En el grupo 1 se hallan las especies; *P. parvifolia* y *Bleischmiedia anay*, la ubicación de las anteriores es más cercana que la que tienen con respecto al resto de los genotipos estudiados. El género *Bleishmedia* es afín al género *Persea* dentro de la familia de las Lauráceas (genotipo no estudiado previamente en trabajos anteriores), y muy distribuido localmente en la Sierra Norte de Puebla, México (Barrientos *et al.*, 1992), en el mismo grupo 1 y muy cercanos entre sí se encuentran UAEM 22, Ixtapan 4 y Tantima II. Los aguacatillos pertenecientes a *P. cinerascens* y *P. parvifolia* incluidos en el análisis con ISSR evidencian una relación cercana al género afín *Beilschmiedia* (Figura 2). Asimismo con ISSR se revela una distancia genética muy cerrada entre los genotipos Tantima II e Ixtapan 4; el primero es un ejemplar raro de la Sierra de Tantima Veracruz, el cual posee un

aspecto vigoroso y hábito abierto probablemente relacionado con la Raza Antillana ya que presenta hojas muy grandes, gruesas y pubescentes; sin embargo anteriormente no ha sido considerado en este tipo de estudios; actualmente se halla preservado en conservación de manera *ex situ* en el banco de germoplasma de CICTAMEX S.C. localizado en Coatepec Harinas, Méx.

El genotipo Ixtapan 4 es un ejemplar propio de ambientes alojados en condiciones de selva baja caducifolia de clima templado cálido, ubicado a 1650 m de altura en el municipio de Ixtapan del Oro; en dicho sitio se localizan otros ejemplares similares considerados también para el presente trabajo, los cuales se presentaron bajo la denominación de Ixtapan, 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 19), a los que hemos llamado “Cascarudos” haciendo alusión a lo grueso y coriáceo de la cáscara de sus frutos, además considerar que poseen hojas muy grandes y pubescentes en el envés.

De acuerdo a las Figuras 18 y 19 podemos observar que la localización de los genotipos representantes de las variedades; *Drymifolia*, *Americana* y *Guatemalensis* de la especie *P. americana*, se encuentran dispersas en los cladogramas, semejante a la dispersión de los genotipos correspondientes a dichas variedades utilizados por Reyes-Alemán et al., (2016), en estudio semejante quien sugirió una posible causa, la hibridación natural constante entre las razas hortícolas en los ambientes naturales.

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea”

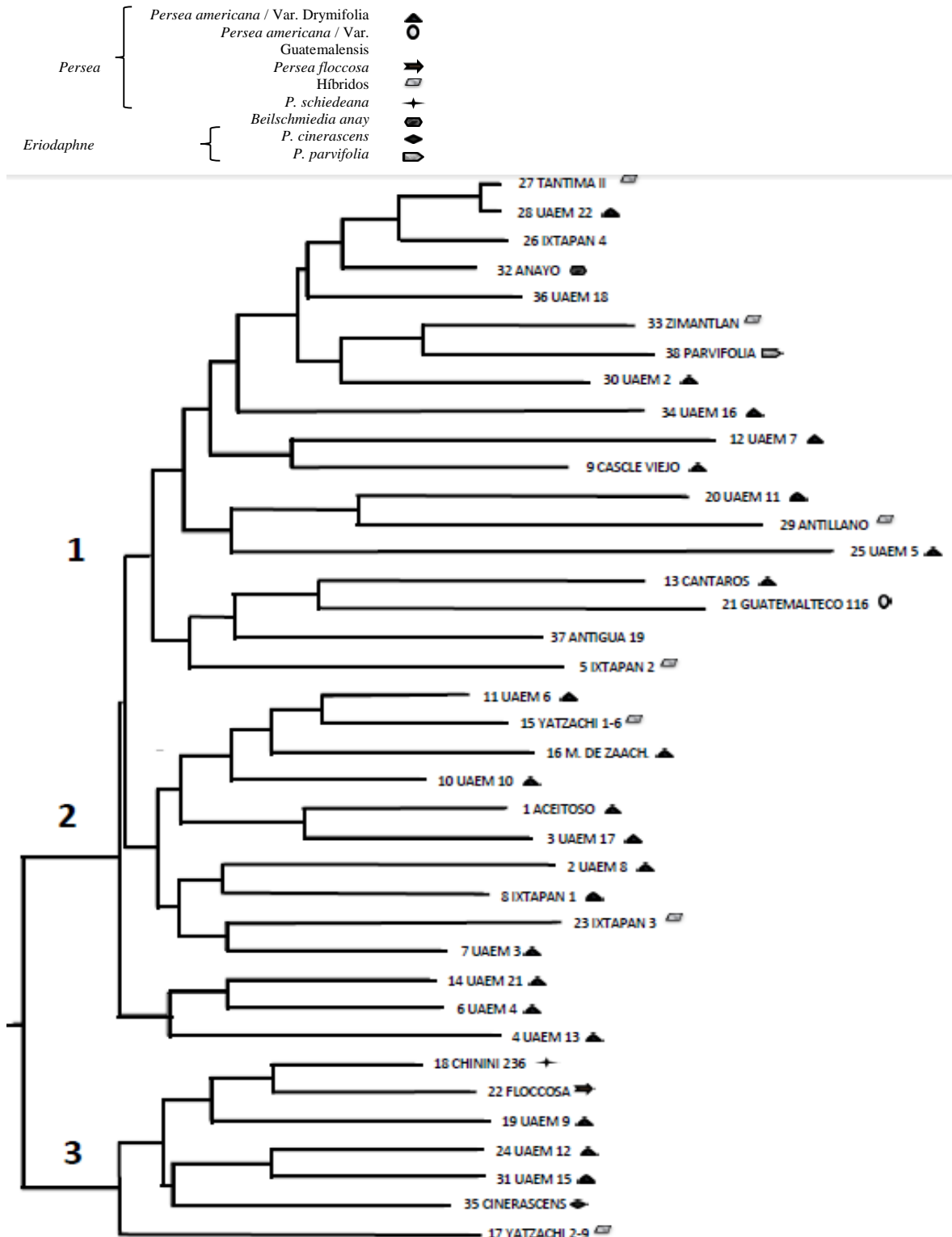


Figura 20. Dendrograma de ISSR generado mediante el índice de similitud (distancia de similaridad) Nei y Li Dice y el método de aglomeración (construcción del árbol) Neighbor-joining- con un Bootstrapping de 1000 repeticiones.

7.4 Descripción e importancia del nuevo genotipo.

En el Estado de México prevalece un tipo de aguacate que presenta características muy distintas a los conocidos comúnmente como criollos mexicanos. Los ambientes en que se desarrolla se encuentran a una altura sobre el nivel del mar de 1500 a 1700 msnm y se distinguen porque predominan condiciones de selva baja caducifolia, con un clima que va de semicálido a cálido (Ixtapan del Oro, Zumpahuacán, Tonatico, Tejupilco). Las hojas son de tamaño relativamente grande (15 a 30 cm), sin olor a anís al estrujarse, coriáceas, con abundante pubescencia en el envés, el carácter pubescente es mayormente acentuado en brotes tiernos, los frutos son de tamaño mediano a grande, de forma aplanada con cuello corto a largo, les sobresalen costillas que van de la base a la parte media del fruto, maduran en color verde o negro, se cosechan de noviembre a diciembre y de enero a febrero, poseen lenticelas medianas a grandes ligeramente corchosas, la cáscara del fruto es muy gruesa de 2 a 3 mm, cuando se seca es dura como jícara.

“Ixtapan 1, 2, 3 y 4”

Los genotipos del estudio considerados como el nuevo genotipo que se describe, se refieren a los denominados “Ixtapan” (1, 2, 3 y 4) y “Yatzachi” (1-5 y 2-9) discutidos en el estudio (Tabla 1), por sus características morfológicas distintivas se consideraron desconocidos, este es el primer reporte de su presencia en el Estado de México para el caso de los “Ixtapan” (Figura 36), “Yatzachi” corresponden a individuos de la Sierra Juárez de Oaxaca de la comunidad Yatzachi el Alto que por su similitud fueron incluidos, tampoco han sido reportados. Sus semejanzas se relacionan con la cáscara coriácea de sus frutos, hojas anchas y pubescentes, y situados en ambientes semejantes, dichos ejemplares probablemente se encuentren relacionados con las especies *Persea floccosa* (incluida en el estudio) y/o *Persea tolimanensis*, que también se describen.



Figura 21. Frutos de Ixtapan 3, ejemplares de genotipos tipo cascarudo en Ixtapan del Oro, México.

Los genotipos (Ixtapan 1, 2 ,3 y 4), poseen frutos de formas redondo a aperados con cáscara gruesa de 0.2-0.3 cm y dura, con longitud de 8 a 10 cm con lenticelas grandes y corchosas (Figura 20). Las hojas son grandes de 12 a 20 cm de longitud, de textura gruesa y muy pubescentes, estos genotipos se asemejan a *Persea floccosa* (Williams, 1976), especie reportada en Puebla, Veracruz y Chiapas. Los aguacates cascarudos del Estado de México como los hemos denominado mantienen una estrecha relación con las especies *Persea floccosa* y *Persea tolimanensis* por las características que presentan sus frutos (Figura 21, 22 y 23). Sin embargo, también es necesario considerar otros aspectos relevantes tales como la pubescencia en el envés de la hoja adulta y en los brotes nuevos. La pulpa tiene fibra, es de sabor ligeramente nogado a amargo y consistencia granulosa. La semilla es mediana y se mantiene unida a la pulpa por la cubierta seminal que la cubre, (Figuras 24 y 25). La cubierta de la semilla posee fuerte adherencia a los cotiledones, es de forma oval a elíptica.



Figura 22. Forma, costillas típicas y apariencia corchosa de frutos del genotipo cascarudo.



Figura 23. Grosor de la cascara del genotipo cascarudo.



Figura 24. Presencia de fibras en la pulpa del fruto del genotipo cascarudo.



Figura 25. Forma de los cotiledones de aguacates tipo cascarudos.



Figura 26. Semillas de aguacate del genotipo tipo cascarudo Ixtapan 1.

Se muestra la descripción vegetativa del genotipo Ixtapan 3, árbol con frutos de tipo “cascarudo” de más de 100 años localizado en San Martín Ocochochtepec, Ixtapan del oro (Figura 26), tomado de Flores-Ayala (2014).

Cuadro 16. Descripción del desarrollo vegetativo del genotipo cascarudo Ixtapan 3.

Desarrollo Vegetativo		
1	Habito del árbol	1 Erecto
2	Angulo de inserción de las ramas principales	3 Agudo
3	Extensión del crecimiento de los vástagos	3.85 cm
4	Longitud de entrenudos de los vástagos	1.37 cm
5	Diámetro de los vástagos	0.55 cm
6	Color de vástagos jóvenes	2 Verde
7	Lenticelas de vástagos jóvenes	3 Intermedios
8	Color de lenticelas de vástagos jóvenes	4 Rojo
9	Superficie de vástagos jóvenes	2 Pubescente
10	Color del ápice del vástago	3 Café
11	Superficie del ápice del vástago	2 Pubescente
12	Forma de la hoja	4 Oval
13	Olor a anís	4 Intenso
14	Color de hojas maduras	2 Verde
15	Color de hojas jóvenes	1 Verde claro
16	Peciolo acanalado	1 Ausente
17	Longitud del peciolo en hojas maduras	4.43 cm
18	Angulo del inserción del peciolo foliar	3 Agudo
19	Margen de la hoja	2 Ondulado
20	Relación longitud/ancho hoja	1.64 cm
21	Angulo de las nervaduras secundarias respecto a la nervadura principal	3 Agudo
22	Forma del ápice de la hoja	1 Acuminada
23	Forma de la base de la hoja	3 Truncada
24	Friabilidad de la hoja	7 Quebradiza
25	Torsión en toda la longitud	1 Ausente
26	Torsión del ápice	1 Ausente
27	Relieve de las nervaduras en la parte superior	2 Plano
28	Numero de nervaduras secundarias	10
29	Pubescencia en la superficie del envés de la hoja	5 Moderada
30	Pubescencia en la superficie del haz de la hoja	3 Ligera
31	Longitud de la hoja	16.8 cm
32	Ancho de la hoja	10.3 cm



Figura 27. Hojas con inflorescencias del genotipo cascarudo Ixtapan 3.

De acuerdo al análisis mediante marcadores genético moleculares, los genotipos cascarudos Ixtapan y Yatzachi, se hallan aglomerados de manera muy cercana al interior de poblaciones de la Raza mexicana (UAEM), Antillana (Antigua, Antillano Ixtapan) y Guatemalteca (Guatemalteca 116), lo cual nos permite inferir indicios de similitud en su genoma con la especie *Persea americana* del subgénero *Persea*.

“Yatzachi (1-5 y 2-9)”

Los genotipos “Yatzachi” considerados en el estudio corresponden a genotipos colectados en Yatzachi El Alto, Oaxaca, 17°13′25″N 96°13′38″W a 1740 msnm en un ambiente cálido a semicálido (Sierra Juárez), se destaca su semejanza con *Persea tolimanensis*, especie del subgénero *Persea* por la pubescencia de su hoja, fruto de aspecto rústico y cáscara de fruto gruesa y rugosa, como fue descrito por Zentmyer y Shieber (1990). Los genotipos Yatzachi 1-5 y 2-9 (Figuras 27 y 28) tienen frutos de mayor tamaño que los “Ixtapan”, pero comparten semejanzas morfológicas con su fruto, tipo de hoja, hábito de crecimiento erecto y aspecto rústico del árbol.



Figura 28. Frutos rústicos de Yatzachi.

Otro genotipo semejante a este grupo es el proveniente de la Sierra Mixe de Oaxaca cercano a Tlacolula. (Figura 29) con características morfológicas similares y aspecto de fruto con cáscara muy gruesa y semilla de aspecto circular a achatada



Figura 29. Grosor de cáscara y características de semilla de Yatzachi.



Figura 30. Frutos de genotipo proveniente de la Sierra Mixe de Oaxaca.

y achatada deprimida (Figura 30). El consumo de estos frutos es común en los Valles Centrales de Oaxaca.



Figura 31. Grosor de cáscara y semilla de genotipo de la Sierra Mixe de Oaxaca.

Probables relaciones filogenéticas de los genotipos cascarudos

Se sugiere relación genética de los genotipos cascarudos con la especie *Persea floccosa* por sus semejanzas morfológicas, así como por la cercanía revelada mediante RAPD en el estudio molecular entre “Ixtapan 3” y “Yatzachi” (Figura 21). *P. floccosa* es comúnmente conocido como aguacate silvestre de montaña o aguacate cimarrón; el cual ha sido relacionado filogenéticamente con *P. americana* var. *Drymifolia* (Barrientos y López, 2000). De acuerdo con Whiley *et al.* (2007). El porte de los árboles de *P. floccosa* puede ser de alturas semejantes a los 30 m, los tallos son ligeramente delgados y pubescentes, con numerosas lenticelas; las hojas presentan una forma subcoriáceas a elípticas, con un tamaño de 6 a 16 cm de longitud y de 3 a 14 cm de ancho, con ápice acuminado, de haz glabro y envés pubescente; las inflorescencias son subterminales, moderadamente tomentosa, las flores miden de 4 a 5 mm de longitud, son tomentosas y poseen estambres de 2 a 3 mm de longitud. El número de frutos por cada racimo terminal varía de 2 a 4, son subglobosos, con 4 a 7 cm de longitud. La principal característica en apariencia

del fruto es que presenta una cáscara superior a 4 mm, con lenticelas muy evidentes y corchosas, de color verde oscuro; la semilla es larga y/o esferoidal. Actualmente no existen registros de uso para esta especie, a excepción de su uso maderable para herramienta de labranza.

Por su parte “Yatzachi” genotipos de aguacate, se encuentran relacionados por sus características morfológicas con *Persea tolimanensis*, de acuerdo con (Zentmyer y Shieber, 1990) se conoce comúnmente como aguacate de Mico, además es considerado como uno de los antepasados de la raza guatemalteca. Se halla distribuido en zonas moderadamente cálidas que abarcan desde la frontera de Guatemala-México hasta el sur de Costa Rica. La especie *P. tolimanensis* se caracteriza por presentar frutos de piel gruesa, ligeramente rugosa y de color verde oscuro, de forma redonda a oblata; son similares a los criollos guatemaltecos; pero permanecen duros incluso cuando están maduros, llegando a medir hasta 3 pulgadas de diámetro; generalmente cuelgan en el árbol hasta mucho después de la madurez, lo cual es inverso a lo que sucede con los criollos guatemaltecos. Los frutos no son comestibles; sin embargo presentan un sabor amargo. Ha sido considerado que *P. tolimanensis* puede ser un ancestro de la raza Guatemalteca, aunque por otra parte la raza guatemalteca ha sido conocida como *Persea nubigena* var. *Guatemalensis* por Williams (1977). Por otra parte de acuerdo con Scora, (1990a) *Persea nubigena* (aguacate de monte) se halla distribuida en altitudes que van de los 2000 y 2800 msnm, donde predominan suelos fértiles de bosque mesófilo de montaña, es decir un ambiente templado a frío, distinto al ambiente semicálido en donde se localizan “Ixtapan” en el Estado de México y “Yatzachi” en la sierra Juárez y Mixe de Oaxaca respectivamente.

VIII. CONCLUSIONES

- En los dendogramas generados, se observa la localización de las variedades; *Drymifolia*, Americana y Guatemalensis de la especie *P. americana* dispersa, debido a una probable hibridación natural constante entre las razas hortícolas.
- El sistema RAPD mostró un rango de porcentaje de contribución de 16.38 a 31.26, con un contenido de información polimórfica de 0.3452, mientras que para ISSR la tasa de contribución fue de 22.50 a 27.64 con un PIC de 0.2212.
- RAPD e ISSR son herramientas útiles para distinguir las relaciones genéticas dentro del germoplasma del género *Persea*.
- Los genotipos "Ixtapan" y "Yatzachi" tienen características morfológicas similares relacionadas muy probablemente con *Persea floccosa* o *Persea tolimanensis* respectivamente y se localizaron en sitios confinados independientes.
- Se observa una probable hibridación natural entre las especies.

IX. LITERATURA CITADA

- Álvarez G., G. 2002. Aislamiento de ADN genómico de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo especialista en Fruticultura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 55 p.
- Barrientos-Priego A. F., Gutiérrez-Diez A., Heredia-García E., Espíndola-Barquera M. C., López-Jiménez A., Medina Torres R., López-De León R., Esteban Escamilla-Prado E., Reyes-Alemán J. C. 2010. SINAREFI. Resúmenes ejecutivos: ejercicio fiscal 2010. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos. Disponible en: <http://www.sinarefi.org.mx/redes/resejec10papaya.pdf>
- Barrientos-Priego. A. F., Luis López L. 2000. Historia y genética del aguacate. pp. 3-15. *In*: Téliz D. (ed.). El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi-prensa, México. 300 p.
- Becerra, V. y Paredes, C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica* 60(3): 270-281.
- Bergh, B. and N. C. Ellstrand.1987. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-145.
- Borys, M. W., H. Leszka-Borys, S. Ramírez-Marañón, and L. Castro. 1993. An avocado relative: *Beilschmiedia anay* (Blake) Kosterm. Fruit source. *California Avocado Society Yearbook* 79: 125-136.
- Calabrese, F. 1992. El Aguacate. Instituto di Coltivazioni Arboree. Universidad de Palermo. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 249 p.

- Campos R.E., Espíndola, B.M.C., Mijares O.P. 2008. Diversidad del género *Persea* y sus usos. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Coatepec, Harinas. México. 59 p
- Chanderbali, A. S., 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* 88:104-134
- Clarke, B. C., Moran L. B. and R. Appels. 1989. DNA analysis in wheat breeding. *Genome*. 32:334-339.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Flores–Ayala, F. 2014. Caracterización morfológica de colectas de aguacate del sur del Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Edo. Méx. 85 p.
- Galindo-Tovar M. E., Arzate-Fernández A. M., Ogata-Aguilar N., Landero-Torres I. 2007. The avocado (*Persea americana*, Lauracea) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*. 12(2):325-334.
- García, A. 1970. Estudio botánico-citológico del “Canelillo” (*Persea* af. *cinerascens*, Blake) y su posible utilización. *Agrociencia* 5:119-127
- García Neria, L. D. C. 2012. Caracterización morfológica y molecular de 34 colectas nativas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de Mexico. 45 p.
- González-Andrés, F. 2001a. Caracterización Morfológica. pp. 199-217 *In*: González-Andrés y J. M. Pita V. (eds.). Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid, España. 279 p.

- González-Andrés, F., 2001b. La caracterización vegetal: objetivos y enfoques. pp. 189-198. *In*: González-Andrés y J. M. Pita V. (eds.). Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Publicaciones INEA. Valladolid España. 279 p.
- Gutiérrez-Díez, A.; Martínez-de la Cerda, J.; García-Zambrano, E.A.; Iracheta-Donjuan, L.; Ocampo-Morales, J.D.; Cerda-Hurtado, I.M. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:9-18
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. pp. 2-26. *In*: Franco, T.L., Hidalgo, R. (eds.). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín técnico No. 8. IPGRI. Cali, Colombia. 89 p.
- IPGRI. 1995. Descriptores para aguacate-Descriptors for avocado (*Persea* spp.) Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI-FAO). Roma, Italia. 54 p.
- Joaquin, M. M. C., Cruz, C. J. G., De la Cruz, M. J., Del Angel, C. O. 2007. Distribución ecogeográfica y características del fruto de *Persea schiedeana* Nees en los Tuxtlas, Veracruz, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(4):403–410.
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea-Lauracea*). *Mem. New York Bot. Gard.* 14:1-117
- Mac Neish, R. S. 1964. Ancient Mesoamerican Civilization. *Science* 143:531-537.
- Núñez-Colín, C. A., Valadez-Moctezuma E. 2010. Análisis Estadístico de Huellas Genómicas. Un uso práctico de los paquetes computacionales más populares. Libro científico Núm. 1. INIFAP, Celaya, Guanajuato, México. p.21-39

- Pavlíček, A., Hrdá, S., J. Flegr. 1999. FreeTree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol-Prague*. 45: 97-99.
- Quintero, S. R., Bárcenas, G. Iván Joel David. 2000. El Cultivo del aguacate orgánico en México. Memoria XIII Curso Internacional de Actualización Frutícola Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S. C. México p.80-82
- Rambaut A. 2014. Figtree, a graphical viewer of phylogenetic trees [Internet]. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. (Consultado el 27 de Mayo 2017)
- Ramírez–Mendoza, M.C., 2015. Caracterización molecular de colectas de aguacate del Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Edo. Méx. 86 p.
- Rentería-Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. (Capítulo 18). pp. 541-566. *In*: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. (eds). *Ecología Molecular*. 1ra Edición. Editorial SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO. México. 592 p.
- Rentaría, A. M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. pp.541-566. *In*. SEMARNAT, UNAM Y CONABIO (eds). *Ecología molecular*. Mexico. 594 p.
- 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. p. 28
- Reyes-Aleman, J. C., Valadez-Moctezuma, E., Barrientos-Priego, A. F. 2015. Assessment of genetic relationship in *Persea* spp. by traditional molecular

markers. Genetics and Molecular Research. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027359> [Consultado: El 18 de Mayo 2017].

Reyes-Alemán, J. C.; Valadez-Moctezuma, E., Simuta-Velázco, L., Barrientos-Priego, A. F.; Gallegos-Vázquez, C. 2013. Distinción de especies del género *Persea* mediante RAPD e ISSR de ADN. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 4:517-529.

Riepl M., Graehl H., Funk H., Gawanbacht A., Klopocki E. and R. Kartha. The nanophotometerm Pearl- Comparison of the performance characteristics of the new nanophotometerm 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 el16 de junio de 2017].

Rogers, S. O., & Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant molecular biology. 5(2): 69-76.

Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences. 81(24):8014-8018.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press. New York, USA. 1546 p.

Schroeder, C. A. 1951. Avocado materials for horticultural research. California Avocado Society Year book 35:107-112.

Scora, R. W. and Bergh, B. O. 1990. The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill.). Lauraceae. Acta Hort. 275:387-394.

Scora, R. W. and B. O. Bergh. 1992. Origin of and taxonomic relationships within the genus *Persea*. Pages 505–514. *In*: Lovatt, C. J. (ed). Proceedings of the Second World Avocado Congress Pebble Beach. California.

SIAP. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera 2015. México. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (Consultado el: 23 September 2017).

Somma, M. y Querci M. 2007a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *In*: Querci M., Jermini M. y Guy Van den Eede (Eds.) Curso de formación sobre análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Comunidades Europeas. Luxemburgo. Disponible en: <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf> [Consultado el 6 de Abril de 2017]

Somma, M., Querci M. 2007b. Electroforesis en gel de agarosa. *In*: Querci M., Jermini M. y Guy Van den Eede (Eds.) Curso de formación sobre análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Comunidades Europeas. Luxemburgo. Disponible en: <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf> [Consultado el 6 de Abril 2017]

Tamay, L, C. Ibarra, C Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F., Medigraphic. 2(2):70-78. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf> [Consultado el 21 de febrero de 2017]

Teliz O., D. y Marroquín, P., F. J. 2015. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. pp. 1-28. *In*: Teliz D. y Mora A. (Eds). El aguacate y su manejo integrado. Biblioteca Básica de Agricultura. México. 321 p.

- Tiselius, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, Trans. Faraday Society. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/-/content/articlelanding/1937/ft/ft9373300524/unauth#!divAbstract>
[Consultado el 21 de febrero de 2017]
- Torres, L. M. E., Moreno, V. S. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. pp: 235-252. *In*: González, A. F., V. J. M. Pita (eds). Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos. Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. 279 p.
- UPOV. 2006. Avocado (*Persea americana* Mill). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Enlarged Editorial Committee, Geneva, Switzerland. 34 p.
- Valadez, M. E. y Kahl, G. 2000. Amplificación del ADN por PCR. pp. 39-87. *In*: Valadez, M. E. y Kahl, G (Eds). Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa. México. 147 p.
- Velasco, M. R. 2005. Marcadores Moleculares y la Extracción del ADN. Grupo de investigación ASUBAGROIN FCA Unicauca (Universidad del Cauca Colombia). Facultad de Ciencias Agropecuarias. pp. 14-18
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., Romero, A. C. 2014. Extracción y purificación de ADN. pp. 1-26. *In*. Cornejo R. A., Serrato D. A., Rendón A. B., Rocha M. M. G. (eds.) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México. 251 p.
- Vladimir, H., Pavlíček, A. and Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:731-735.

- Watson, D. J., Gilman, M., Witkowski, and M. Zoller. 1992. The Polymerase Chain Reaction. pp. 79-98. *In*. Watson, D. J., Gilman, M., Witkowski, M. Zoller. (eds.) Recombinant DNA. Scientific American Books. 2nd Edition. New York USA. 626 p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in Plant: Principles, Methods and Applications, 2nd ed., CRC Press Taylor & Francis Group. 427 p.
- Whiley, A. W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. 2007. El Aguacate: Botánica, Producción y Usos. CABI, Ediciones Universitarias de Valparaíso. Valparaíso. 380 p.
- Williams, L. O. 1976. The botany of the avocado and its relatives. Proc. 1st International Tropical fruit Short Course, The Avocado. University of Florida, Gainesville, Florida. USA. pp. 9-15
- Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subgenus *Persea*. Economic Botany 31: 315-320
- Zentmyer G. A. and E. Schieber 1989. Aguacate de Mico. California Avocado Society Yearbook. 73:167-172
- Zentmyer, G. A. and E. Schieber, 1990. *Persea tolimanensis*: a new species for Central América. Acta Hort. 275: 383-386.
- Zentmyer, G. A. 1991. “The Genus *Persea*” California Avocado Society. Yearbook. 75: 119-123.

X. ANEXOS

- Geles de acrilamida RAPD:

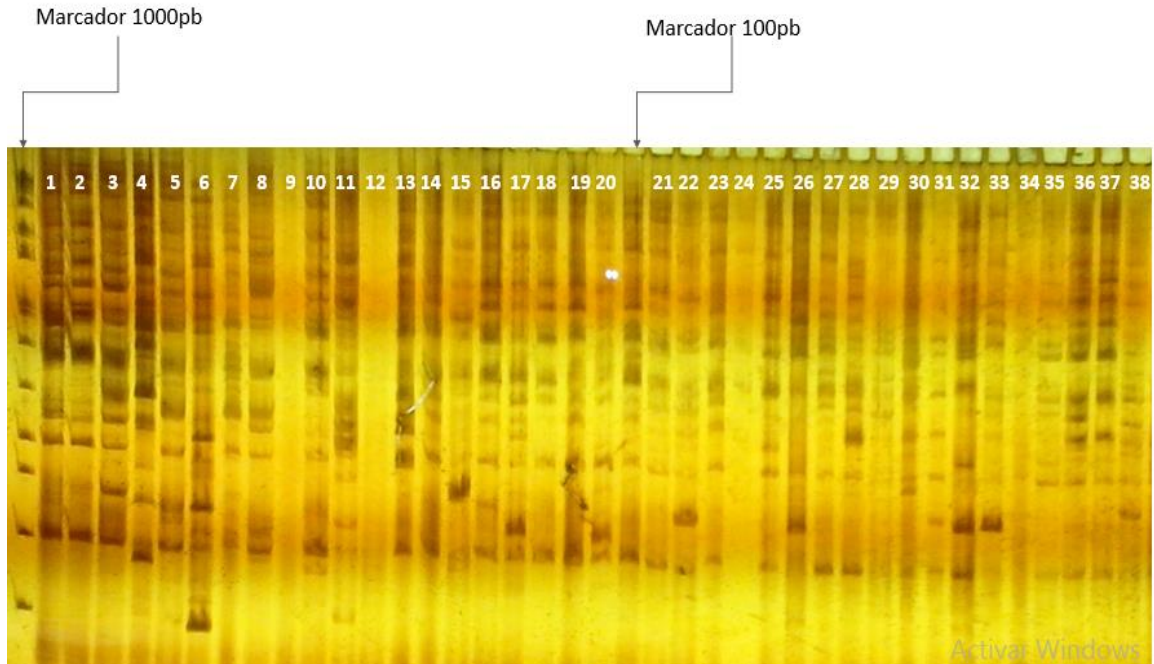


Figura 32. Gel de Acrilamida RAPD Primer (E14).

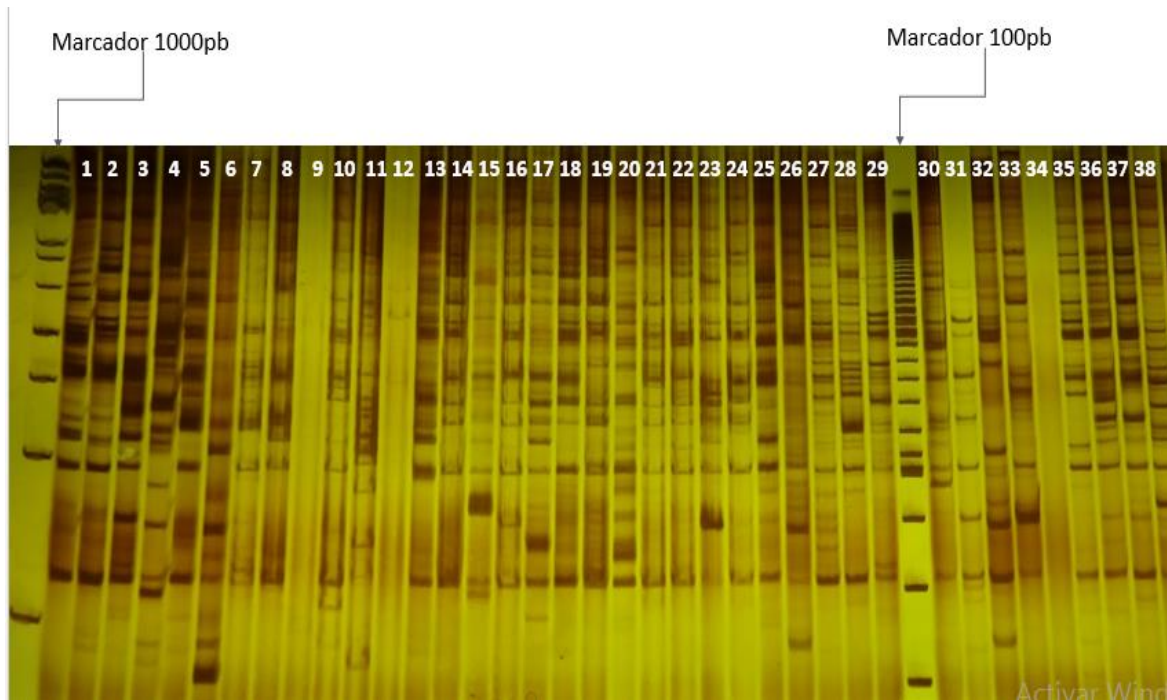


Figura 33. Gel de Acrilamida RAPD Primer (E18).

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género persea”

- Geles de acrilamida ISSR:

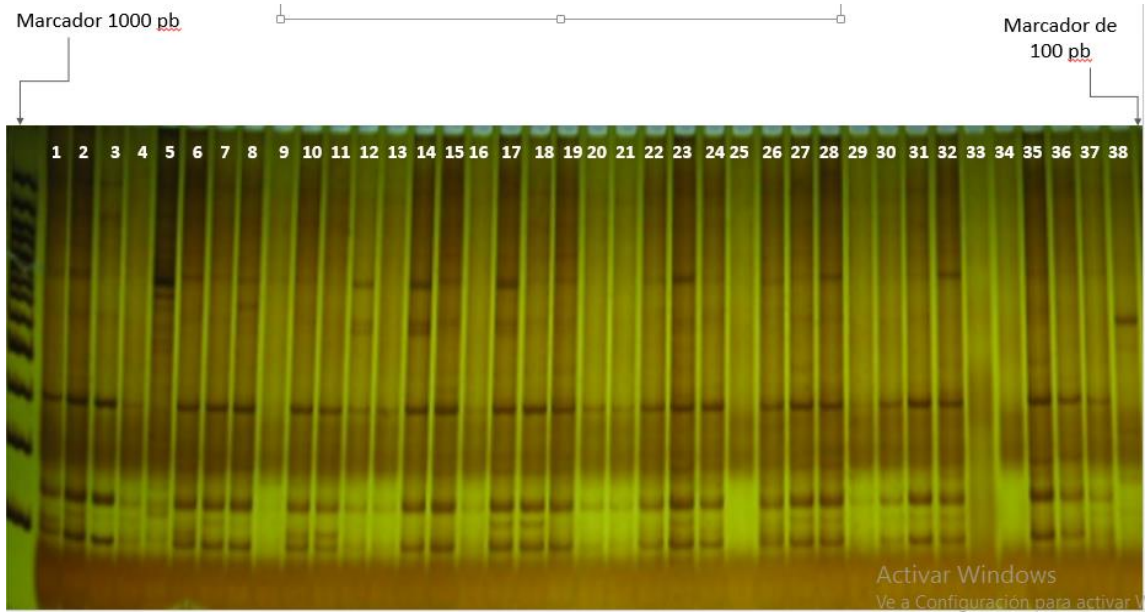


Figura 34. Gel de Acrilamida ISSR Primer (AC)8YG.

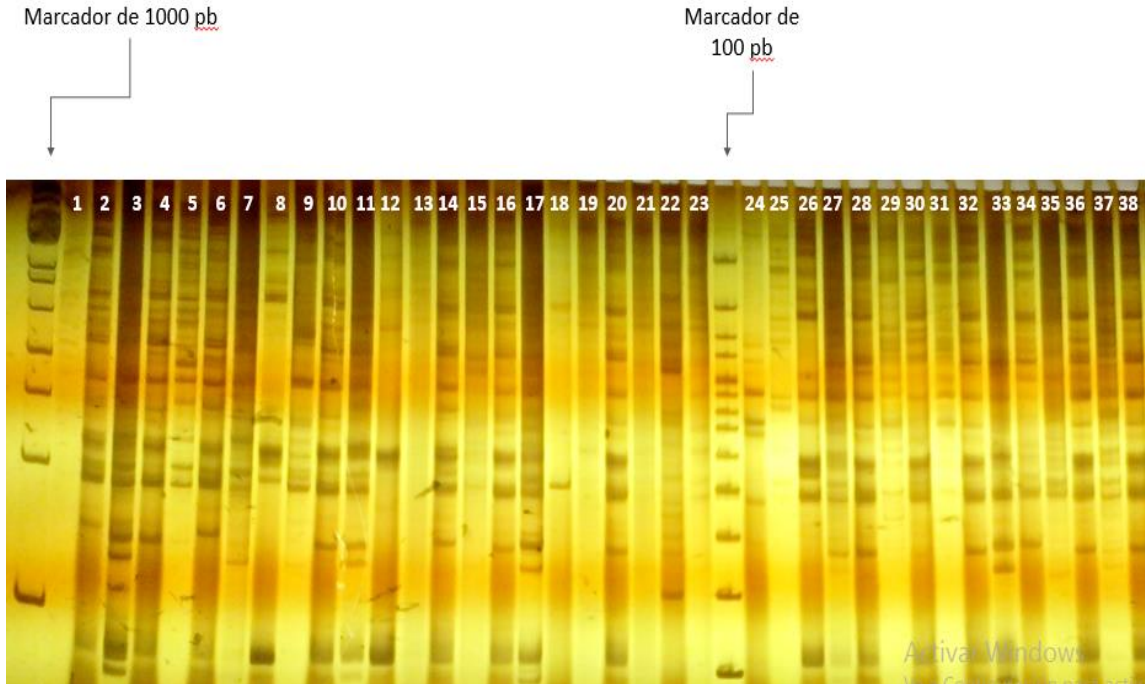


Figura 35. Gel de Acrilamida ISSR Primer (GA)8YC.

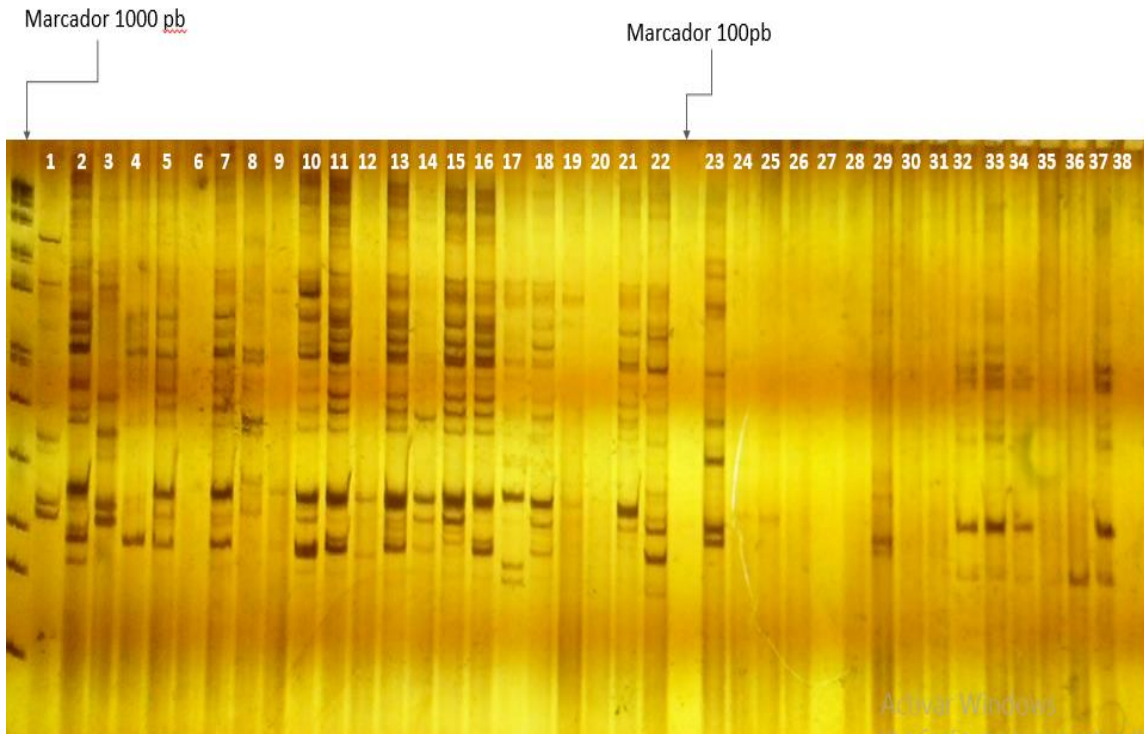


Figura 36. Gel de Acrilamida ISSR Primer (TCC)5RY.

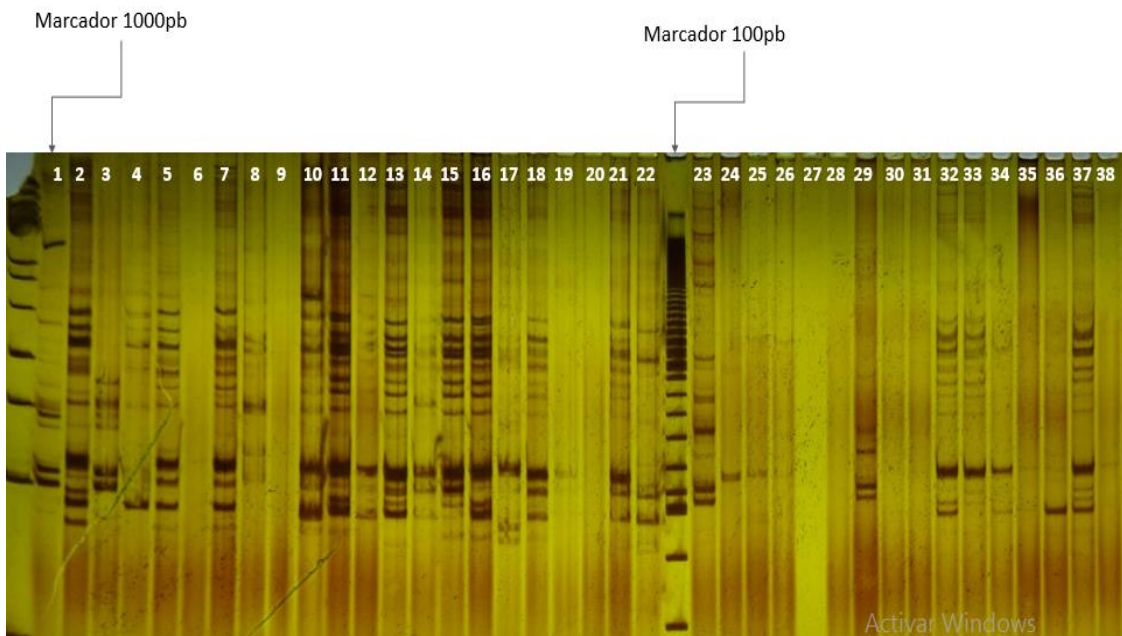
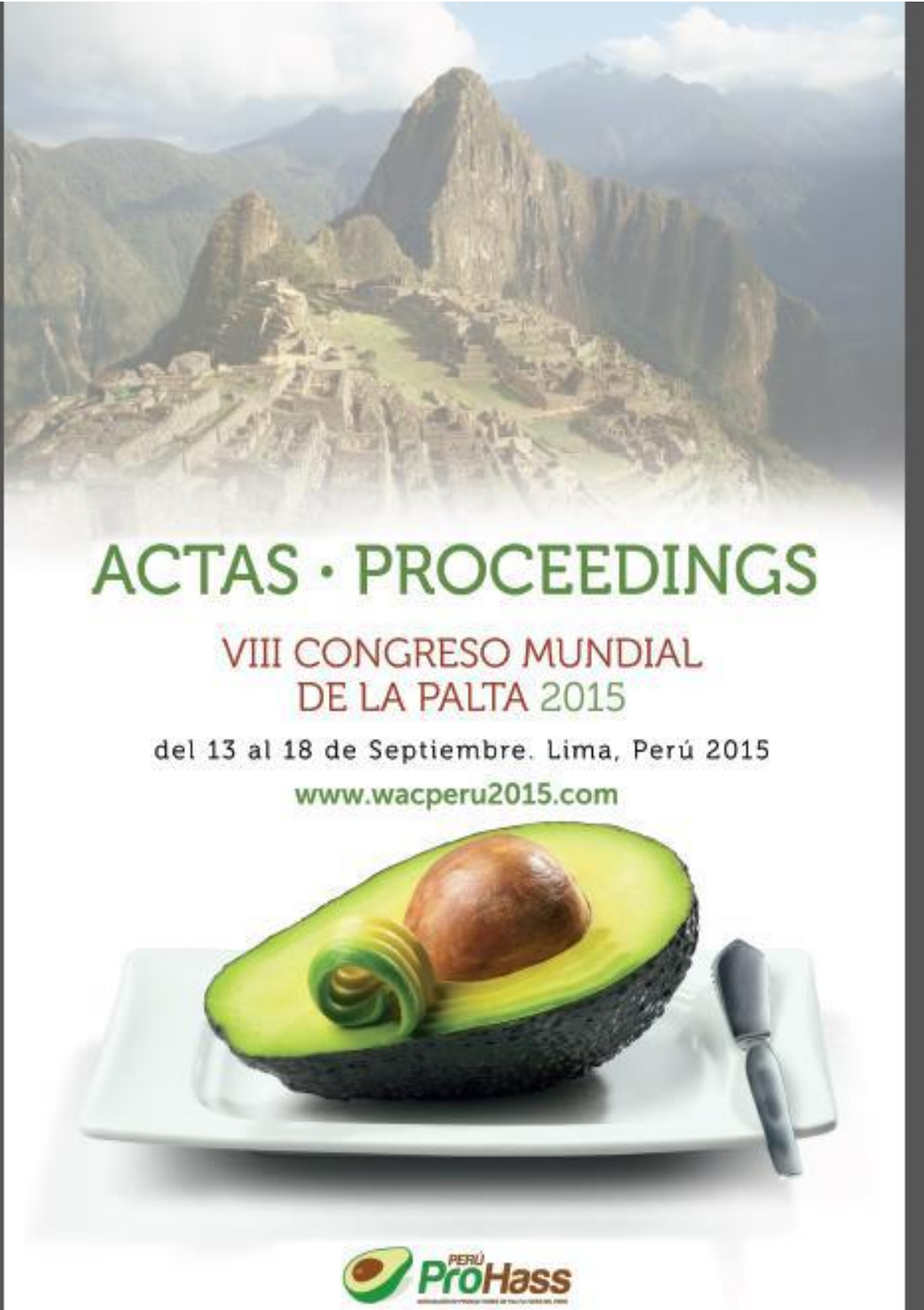


Figura 37. Gel Acrilamida ISSR Primer AC(GACA)4.



ACTAS PROCEEDINGS

VIII CONGRESO MUNDIAL
DE LA PALTA 2015



■ Caracterización morfológica y molecular de germoplasma de aguacate en el centro de México

J.C. Reyes-Alamán¹, Ma del C. Ramírez-Mendoza², F. Flores-Ayala², M. Serrano-Hernández¹, L.M. Vázquez-García², J. Mejía-Camarozá², S. Aguilar-Modo², R. Berdeja-Abreu² y M. de la C. Espindola-Barquera³

¹ Centro Universitario Teracingo, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

² Facultad de Ingeniería Agrícola, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

³ Fundación Salvador Sánchez Colín, CICTAMEX S.C. Estado de México, México.

El Centro de México es una región donde prevalece diversidad de aguacates nativos, algunos de ellos utilizados por los pobladores y otros aún sin conocer. Desde hace años se desarrolla la conservación *ex situ* de algunos, pero la labor principal de conservación la desarrolla el poblador de manera *in situ*. El conocimiento de la diversidad de una región comprende el trabajo de descripción e identificación de genotipos sobresalientes, al mismo tiempo pueden ser conocidos y utilizados sus atributos: destacando su uso potencial como variedad para el consumo en fresco, industria, portainjerto o atractivo ornamental. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio ha consistido en desarrollar un trabajo sistemático de descripción morfológica e identificación de polimorfismos genético-moleculares de individuos para distinguir sus similitudes. Con base en los polimorfismos generados en una muestra de 45 individuos, se han distinguido especies relacionadas como *Persea cinerascens*, *P. ficosa*, y la variabilidad de *P. americana* var. *arvensis* en la región. Se han generado agrupamientos que han sido comparados con *P. avicadana*, *P. nabiligna* y *P. atrovirens* encontrándose algunas relaciones. Se describe a los genotipos identificados, se muestra su ubicación de acuerdo a dendrogramas generados y se comenta la eficiencia de la combinación de los marcadores morfológicos y moleculares.

Palabras clave: Marcadores moleculares, Polimorfismos, Marcadores morfológicos, Portainjerto.

INTRODUCCIÓN

México junto con otros países de Centroamérica forma parte del centro de origen del aguacate (Barrón-Priego, 2000), sin embargo a pesar de la enorme diversidad de especies y razas prevalece el monocultivo con la variedad Hass, debido a que presenta las características deseables en cuanto a producción y comercialización.

La zona centro de México forma parte de la denominada franja aguacatera, actualmente prevalecen genotipos de aguacates nativos pertenecientes al género *Persea* principalmente, considerando que se han hallado algunas especies y razas de este género como: *Persea americana* (raza mexicana), *Persea cinerascens* (aguacatillo silvestre), *Persea bintineri* y *Persea ficosa* (Flores, 2014).

Al haber una gran dispersión de los recursos ha surgido una gran confusión en la ubicación taxonómica de especies, razas y variedades de *Persea* debido a su alto grado de hibridación entre ellas; sin embargo al llevar a cabo la caracterización morfológica y molecular de los diferentes especímenes que se hallan en el estado de México es posible identificar la diversidad de los recursos genéticos con que se cuenta en una región y así hacer uso eficiente de ellos, creando nuevas variedades que puedan cumplir con las exigencias de los diferentes mercados al igual que la variedad Hass y aprovechar la diversidad genética que está a nuestro alcance en nuestra región es el objetivo.

La conservación y caracterización de germoplasma vegetal es una actividad que nos brinda la posibilidad de preservar nuestro patrimonio de biodiversidad, requiriéndose de un gran esfuerzo para proteger a los genotipos de plantas con potencial de utilidad (González-Andrés, 2001). Se han estado desarrollado trabajos sobre la caracterización morfológica y molecular de germoplasma de aguacate; sin embargo de acuerdo a revisiones, cuando ambas técnicas se conjuntan podrían permitir una descripción más completa, precisa y robusta de la información, generando una descripción y distinción más exacta entre los individuos (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se trajo con la colecta de germoplasma (hojas jóvenes secas) en distintos sitios ubicados en la zona centro del Estado de México, incluyendo algunos ejemplares del huerto de Centro Universitario UAEM Teracingo y de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S. C.

Caracterización molecular. Mediante la técnica de PCR se sintetizaron fragmentos de DNA en el genoma de aguacate. Se utilizaron las técnicas de RAPDs e ISSRs (Rentaría-Alcántara, 2005).

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial InnuPREP Plant DNA Kit analítico de Biometra®, siguiendo la metodología marcada por el fabricante.

Mediante los perfiles de las bandas que se generan, se elaboró una matriz básica de datos para cada individuo. Para el estudio de similitud entre genotipos, se construyeron dendrogramas combinando los métodos de construcción mediante la distancia/ matriz de similitud Nei and Li / Dice y el método de construcción Neighbor – joining, mediante la matriz de similitud Jaccard y el método de construcción UPGMA y Jaccard con Neighbor-joining, con un remuestreo (“Bootstrapping”) de 1000 repeticiones en el programa Free Tree versión 0.9.1.50 (Pudický *et al.*, 1999). 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 dendrogramas obtenidos se utilizó el programa Tree View 1.6.6.

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género *persea*”

Caracterización morfológica (fenotípica). Las plantas seleccionadas para el estudio se caracterizaron de acuerdo a los descriptores morfológicos propuestos para describir germoplasma de aguacate: IPGRI (1995) y UPOV (2006). En fruto se mide el peso y diámetros polar y ecuatorial, peso y diámetros polar y ecuatorial de hueso, espesor de pulpa, color de cáscara y presencia de lentículas. En hoja se determina el largo y ancho, relación largo-ancho, color y forma de bordes. Por otra parte se determina el hábito de crecimiento de la copa de los árboles de cada uno de los genotipos. De los caracteres mencionados anteriormente se realizaron análisis estadísticos descriptivos mediante el análisis multivariado, para ello se utilizó el programa InfoStat versión (2008) (Di Stasio *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Exploración y genotipos colectados

Se realizaron 2 viajes de exploración y colecta a cada uno de los 6 municipios de la franja aguacatera del Estado de México, en los cuales se identificaron y referenciaron los materiales colectados (Cuadro 1). La mayor parte de los materiales colectados son nativos de la región. Otros han sido introducidos por el propio productor y que para efectos de esta investigación fueron considerados como genotipos seleccionados, pero todos ellos se preservan *in situ* por los pobladores, con fines comparativos fueron incluídas en la descripción 2 colectas de la raza Guatemalteca y 2 de la raza Antillana del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Collín, CICTAMEX S.C.

Cuadro 1. Genotipos colectados en la franja aguacatera del Estado de México

#	Nombres / del genotipo	Fecha de colecta	Sitio de colecta	Coordenada y altitud sobre el nivel del mar	Colector	Donador	Materiales colectados	Observaciones
1	Itzapán / 1	13/01/12	Itzapán del Oro Estado de México	19°16'20.1" 100°15'21.1" 1706 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán	Camino	Hoja, Fruto	Camino al río, árbol de +/- 90 años, híbrido tipo cacahuto
2	Itzapán / 2	13/01/12	Itzapán del Oro Estado de México	19°16'24.9" 100°15'24" 1740 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán	Camino	Hoja	Camino al río, árbol de +/- 70 años, híbrido cacahuto
3	Itzapán / 3	13/01/12	Itzapán del Oro Estado de México	19°16'26.3" 100°15'22.4" 1743 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán	Felipe Juárez	Hoja, Fruto	Árbol de más de 100 años de edad, Fruto cacahuto
4	UAEM / 1		Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'3.23" 99°56'45.08" 2064 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro universitario	Hoja	Criollo de raza mexicana de unos 20 años de edad
5	UAEM / 2	23/03/1	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'3.57" 99°56'45.19" 2064 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro Universitario	Hoja, Fruto	Entrada al Huevo, árbol +/- 90 años, árbol grande de unos 12 m de altura
6	UAEM / 3	26/03/12	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'3.9" 99°56'45.15" 2063 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro Universitario	Hoja	Criollo de raza mexicana, ubicado cerca del Asilento, árbol +/- 120 años
7	UAEM / 4	23/03/12	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'6.13" 99°56'45.0" 2062 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán	Centro Universitario	Hoja	Criollo de raza mexicana, Huevo Universitario, árbol +/- 50 años
8	UAEM / 5	26/03/12	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'6.37" 99°56'45.0" 2062 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro Universitario	Hoja	Criollo de raza mexicana, Huevo Universitario, árbol +/- 2 años
9	UAEM / 6	26/03/12	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'6.84" 99°56'45.34" 2062 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro Universitario	Hoja	Criollo de raza mexicana, Huevo universitario, árbol +/- 40 años
10	UAEM / 7	26/03/12	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'6.66" 99°56'46.42" 2064 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro Universitario	Hoja, Fruto	Variedad del centro universitario, fruto productivo, buen donador de semilla, árbol +/- 20 años
11	UAEM / 8	26/03/12	Centro Universitario UAEM Tlaxianguillo	19°58'6.18" 99°56'46.0" 2064 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán Felipe Flores Apala	Centro Universitario	Hoja	Criollo de raza mexicana, Centro universitario, árbol +/- 12 años

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género *persea*”

#	Nombre / del genotipo	Fecha de colecta	Sitio de colecta	Coordenadas y altura sobre el nivel del mar	Colector	Donador	Materia colectada	Observaciones
12	UAEM/9	26/03/12	Centro Universitario UAEM Toluca	19°58' 6.17" N 99°26' 45.96" W 2060 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán Felipe Flores Aguilera	Centro Universitario	Hoja.	Criollo de raza mexicana, Centro Universitario. Edad +/- 7 años
13	UAEM/10	26/03/12	Centro Universitario UAEM Toluca	19°58' 6.25" N 99°26' 45.86" W 2060 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán Felipe Flores Aguilera	Centro Universitario	Hoja.	Criollo de raza mexicana, Centro Universitario. Edad +/- 8 años
14	UAEM/12	11/04/12	Centro Universitario UAEM Toluca	19°58' 6.50" N 99°26' 47" W 2060 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán Felipe Flores Aguilera	Centro Universitario	Hoja. Fruta.	Junto a la fin del Invernadero Universitario. Edad +/- 25 años
15	UAEM/13	11/04/12	Centro Universitario UAEM Toluca	19°58' 6.41" N 99°26' 46.86" W 2060 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán Felipe Flores Aguilera	Centro Universitario	Hoja. Fruta.	Criollo mexicano, Invernadero Universitario. Edad +/- 15 años
16	UAEM/14	17/04/12	Centro Universitario UAEM Toluca	19°58' 6.16" N 99°26' 47.17" W 2060 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán Felipe Flores Aguilera	Centro Universitario	Hoja. Fruta.	Junto a la huerta de 15 especies de altura, en una viga del Invernadero. Edad +/- 120 años
17	UAEM/15	17/04/12	Centro Universitario UAEM Toluca	19°58' 6.14" N 99°26' 47.07" W 2060 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán Felipe Flores Aguilera	Centro Universitario	Hoja. Fruta.	Muñal y altura, el mismo es muy ancho. Altura 15 metros. Edad +/- 150 años
18	Zampalacano/1	21/03/12	San Pedro Gochalá, Zampalacano Estado de México	19°49' 11.76" N 99°02' 11.67" W 1812 msnm	Luis Miguel Vázquez García, Juan Carlos Rojas Alemán, Felipe Flores Aguilera	St. Crisótopo Hernández Mérida	Hoja. Fruta.	Híbrido de parentesco indeterminado, semejante a <i>Bemouliococca</i> Fruta Cacaonillo Requillo
19	Zampalacano/2	21/03/12	San Pedro Gochalá, Zampalacano Estado de México	19°49' 11.40" N 99°02' 11.22" W 1815 msnm	Luis Miguel Vázquez García, Juan Carlos Rojas Alemán, Felipe Flores Aguilera	St. Crisótopo Hernández Mérida	Hoja. Fruta.	Híbrido de parentesco indeterminado, Fruta Cacaonillo Grande
20	Zampalacano/3	28/03/12	San Pedro Gochalá, Zampalacano Estado de México	19°49' 11.1" N 99°02' 11.35" W 1818 msnm	Luis Miguel Vázquez García, Juan Carlos Rojas Alemán, Felipe Flores Aguilera	St. Crisótopo Hernández Mérida	Hoja.	Híbrido de Hoja Muy Pubescente, altura de un árbol viejo, Edad +/- 90 años, tipo cacaonillo
21	Zampalacano/4	28/03/12	San Pedro Gochalá, Zampalacano Estado de México	19°49' 12.39" N 99°02' 10.92" W 1804 msnm	Luis Miguel Vázquez García, Juan Carlos Rojas Alemán, Felipe Flores Aguilera	St. Crisótopo Hernández Mérida	Hoja.	Robusta de Un árbol viejo, de 1.5 m. de diámetro, Edad estimada +/- 150 años. Raza mexicana
22	Zampalacano/5	28/03/12	San Pedro Gochalá, Zampalacano Estado de México	19°49' 12.44" N 99°02' 10.88" W 1804 msnm	Luis Miguel Vázquez García, Juan Carlos Rojas Alemán, Felipe Flores Aguilera	St. Crisótopo Hernández Mérida	Hoja. Fruta.	Edad +/- 20 años. Tipo cacaonillo, probable <i>Bemouliococca</i>
23	Pilar/1	03/04/12	El Hacer Mier, Donato Guerra, México	19°45' 39.36" N 100°07' 35.73" W 2235 msnm	Luis Miguel Vázquez García, Juan Carlos Rojas Alemán, Felipe Flores Aguilera	St. Erasmo Cordón	Hoja. Fruta.	Criollo de raza mexicana, árbol enorme de unos 17 m. +/- 120 años
24	Pilar/2	03/04/12	El Hacer Mier, Donato Guerra, México	19°45' 39.73" N 100°07' 32.89" W 2241 msnm	Juan Carlos Rojas A., José de Jesús Zárate Chávez, Alfredo López Jimenez	St. Erasmo Cordón	Hoja. Fruta.	Criollo de raza mexicana, Buen productor de semilla. Edad +/- 20 años
25	Pilar/3	03/04/12	El Hacer Mier, Donato Guerra Estado de México	19°45' 38.76" N 100°07' 32.99" W 2242 msnm	Juan Carlos Rojas A., José de Jesús Zárate Chávez, Alfredo López Jimenez	St. Erasmo Cordón	Hoja. Fruta.	Criollo de raza mexicana, Buen productor de semilla año con año, Edad +/- 20 años
26	Guzarratoca/3	15/03/12	Rancho la Cruz, Cauaque Ixtamal, Estado de México	18°55' 11.86" N 99°05' 33.34" W 2230 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán	CICTAMEX S.C.	Hoja.	Raza Guzarratoca, acroton del banco de germoplasma, originario de Chiapas. Edad +/- 12 años
27	Guzarratoca/114 (Olanca 25)	15/03/12	Rancho la Cruz, Cauaque Ixtamal, Estado de México	18°55' 11.76" N 99°05' 33.12" W 2230 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán	CICTAMEX S.C.	Hoja.	Raza Guzarratoca, acroton del banco de germoplasma, originario de Chiapas. Edad +/- 12 años
28	Arellano/102 (Marchal)	15/03/12	Rancho la Cruz, Cauaque Ixtamal, Estado de México	18°55' 14.28" N 99°05' 32.87" W 2227 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán	CICTAMEX S.C.	Hoja.	Raza Arellano, acroton del banco de germoplasma, originario de Costa Rica. Edad +/- 12 años
29	Arellano/100	15/03/12	Rancho la Cruz, Cauaque Ixtamal, Estado de México	18°55' 12.14" N 99°05' 31.75" W 2228 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán	CICTAMEX S.C.	Hoja.	Raza arellano, acroton del Banco de germoplasma, originario de Sonora. Edad +/- 12 años
30	Oleandil 1	28/03/13	El Peñal del Maquepando	19°07' 31.83" N 100°16' 23.45" W 1680 msnm	Juan Carlos Rojas Alemán	St. Luis Oleandil	Hoja.	Probablemente <i>Bemouliococca</i> , población nativa de aguacatillo.

#	Nombre / del genotipo	Fecha de colecta	Sitio de colecta	Coordenadas y altitud sobre el nivel del mar	Colector	Donador	Materiales colectados	Observaciones
31	Cáscara	14/03/13	Villa Guerrero, México	18° 57' 46.22" N 99° 39' 03.77" W 2179 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán	St. Alfonso García	Hoja	Raza mexicana, accesión sobresaliente por su calidad de fruto para consumo en fresco
32	Mejorado de aceite	14/03/13	Villa Guerrero, México	18° 57' 46.22" N 99° 39' 03.77" W 2179 msnm	Juan Carlos Reyes Alvarán	St. Alfonso García	Hoja	Raza mexicana, accesión sobresaliente por su fruto grande, de excelente calidad para consumo en fresco y alto contenido de aceite en su pulpa

Diversidad colectada

Las actividades de exploración, colecta y caracterización del presente trabajo permitieron conocer mediante una muestra representativa la diversidad existente en 6 municipios del Estado de México. El género *Persea* se divide en dos subgéneros *Persea* y *Frisodiopsea*; aunque morfológicamente existen diferencias en el hábito de crecimiento y desarrollo vegetativo entre ambos subgéneros; lo que los distinguen es sin duda el tamaño del fruto: aguacates grandes y verdaderos en el primer caso y aguacatillos (1-2 cm de diámetro) en el segundo caso. En la población de Tenaría en Tejupilco, pero en el Pital del Marquésado en Otzolotlán localizamos a otra población de genotipos, cuyo fruto tipo aguacatillo es muy parecido al de Tejupilco aunque sus hojas son menos pubescentes siendo más semejantes a *Persea cinerascens*, este último es otro aguacatillo reportado para la región de Tlaxiahuacán, Michoacán (García, 1970).

Otro grupo de genotipos fue colectados se denominaron "cascarados" (Itzapán 1, 2 y 3) y (Zampahuacán 1, 2, 3, y 5), cuyos frutos de formas que va de redondo a aplanados son de cáscara gruesa de 0.2-0.3 cm y dura y de longitud de 8 a 10 cm con lenticelas grandes y cerosas. Las hojas de estos ejemplares son hojas grandes de 12 a 20 cm de longitud, de textura gruesa y muy pubescentes, estos genotipos son muy semejantes a *Persea floccosa* (Williams, 1976). *P. floccosa* es una especie reportada en Puebla, Veracruz y Chiapas, es probable que los tipos cascarrados del Estado de México tengan relación con esta especie.

La tercer especie que habita el Estado de México y la de mayor variabilidad con genotipos nativos en casi todos los municipios del sur es *Persea americana*. Esta especie comprende tres razas hortícolas: Mexicana, Antillana y Guatemalteca (*P. americana* var. *Drymifolia*, *P. americana* var. *americana* y *P. americana* var. *guatemalensis* respectivamente). En el estudio se incluyeron 17 genotipos de la raza mexicana, que es la raza de *P. americana* dominante en la región estatal. Al interior de esta especie prevalece una gran variabilidad de tipos de hojas, con formas variadas, de frutos diversos aunque conservando sus características propias de la raza mexicana como lo es el olor a ajo de sus hojas, frutos de cáscara delgada con alto contenido de aceite, estas y otras características morfológicas se describen ampliamente en el catálogo de accesiones que se integra.

Dentro de la raza Mexicana sobresalen tipos que tienen un trabajo previo de selección por parte del productor como es el caso del "Mejorado de Aceite" y "Cáscara" de Villa Guerrero, Estado de México; ambos genotipos constituyen variedades criollas mejoradas identificadas por el Sr. Alfonso García, quien en un esquema de Conservación in situ ha desarrollado a pequeña escala dichas variedades de manera comunitaria.

También son de interés los genotipos identificados con el nombre de pilares (1, 2 y 3), que son criollos de raza mexicana provenientes de la localidad "El Batán", municipio de Dorado Guerra. Uno de estos árboles tiene una edad cercana a los 100 años, son muy productivos año con año y sus semillas medianas (3-4 cm de diámetro) sobresalen como fuente de semilla para el vivero por su uniformidad y alto porcentaje de germinación.

Otro grupo importante de esta raza lo constituyen los genotipos denominados "UAEM" (del 1 al 15), estos genotipos son conservados in situ en el huerto del Centro Universitario UAEM Texcoco, se desconoce su origen y su colector, aunque algunos se originaron en el sitio por sí mismos, otros fueron establecidos como plantas injertadas de las variedades "Hao" y "Fuerte", algunos persisten como tal, en otros el injerto murió y lo que prevalece es el rebrote del portainjerto, cualquiera que haya sido su origen fueron caracterizados morfológicamente; algunos muestran los frutos típicos de la raza mexicana y poseen un tamaño de mediano a grande de fruto con buena palatabilidad, en casi todos los casos fueron evaluados el porcentaje de germinación de su semilla y sus cualidades viverísticas están siendo observadas en vivero, este último aspecto constituye otro tema de investigación.

La conjugación de polimorfismos de RAPDs e ISSRs analizados en el dendrograma de la Figura 1, 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 *Blechnioidia aray* (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 pero que comparten un genoma semejante con poca variación como lo señala Reyes, et al. (2013) al mencionar que tanto los marcadores basados en RAPD e ISSR son útiles para diferenciar los diferentes genotipos de *Persea*.

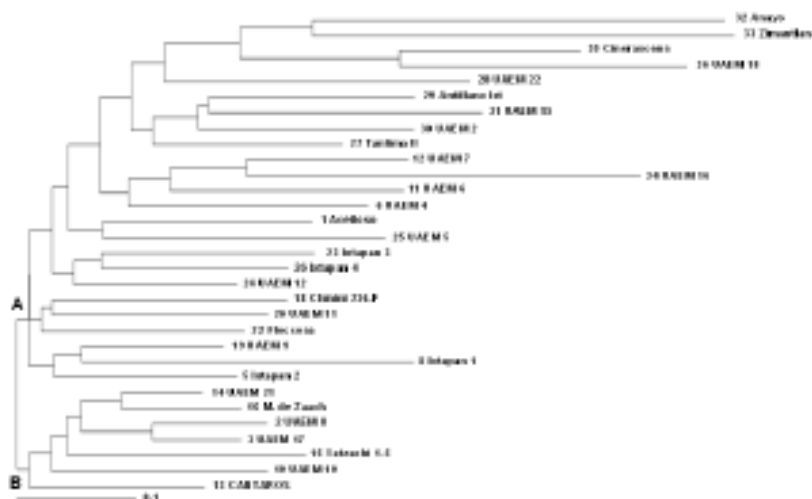


Figura 1. Dendrograma Combinado con datos RAPDs e ISSRs mediante la distancia/matrix de similitud Nei and Li/Dico- y el metodo de construcción Neighbor joining. (5) en genotipos de *Persea* spp.

Sin embargo, mediante RAPDs fue posible observar una tendencia a 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 rebrotos del árbol original injertado.

CONCLUSIONES

El análisis molecular sugiere que los individuos agrupados, por el análisis de dendrograma, comparten similitud en su genoma probablemente como producto de hibridaciones naturales a lo largo del tiempo.

Los marcadores moleculares tipo RAPDs e ISSRs resultaron eficientes en la caracterización de colectas de aguacate realizadas en el Estado de México, logrando robustecer su interpretación al combinar ambas técnicas.

LITERATURA CITADA

- Barrero-Priego, A. F., Luis López L. 2000. Historia y genética del aguacate. pp. 3-15. In: Teller D. (ed.). El aguacate y su manejo integrado. Ed. Maná-prensa, México, 300 p.
- Flores-Ayala, F. 2014. Caracterización Morfológica de Colectas de Aguacate del sur del Estado de México. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Edn. Méx. 85p.
- García, A. 1970. Estudio botánico-citológico del "Canelillo" (*Persea cf. cinerascens*, Blake) su posible utilización. *Agrociencia* 5(1): 119-127.
- González-Andrés, F. 2001. Caracterización Morfológica. Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. pp. 199-217. In: González-Andrés y J. M. Pita V. (eds.). Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid, España, 278 p.
- Gutiérrez-Díez A., Martínez-de la Cerdá J., García-Zambrano E., Iracheta- Dorjain L., Ocampo-Morales J. y I. M. Cerdá-Hurtado. 2009. Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Fitotecnia Mexicana*. 32(1): 9-18.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. 2008. InfoStat, versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (<http://www.infostat.com.ar>)
- IPGRI. 1995. Descriptors para aguacate-Descriptors for avocado (*Persea* spp.) Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI-FAO). Roma, Italia. pp.54
- Kopp, L. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea*-Lauracea). *Mem. New York Bot. Gard* 14: 1-117.

“Comparación morfológica y molecular entre un híbrido natural y especies del género *persea*”

Paolock A., Hrdá S. and J. Flegl. 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 to the RAPD analysis of genus *Frankia*. *Folia Biologica* 45 (3), pp. 97-99.

Hernández-Alcántara M. 2005. Breve revisión de los marcadores moleculares. Capítulo 18: Disponible en: www.2line.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap-18.pdf. Consultado 6 de agosto, 2013.

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

Vladimic H., A. Paolock and J. Flegl. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomesalparattica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:731-735.

Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Econ. Bot.* 31: 315-320.

MOLECULAR MARKERS 2017

CONTACT
7-10 March 2017
Napier War Memorial Conference Centre,
Napier, New Zealand

Dr Reyes-Alemán Juan Carlos

Centro Universitario UAEM Tenancingo- UAEMex
reyesaleman@hotmail.com

Juan Carlos Reyes-Alemán ⁽¹⁾, Marisol Serrano-Hernández ⁽¹⁾, Jaime Mejía-Carranza ⁽¹⁾, Luis Miguel Vázquez-García ⁽¹⁾, Elizabeth Urbina-Sánchez ⁽¹⁾, Ernestina Valadez-Moctezuma ⁽²⁾ and Alejandro F. Barrientos-Priego⁽²⁾

⁽¹⁾Centro Universitario UAEM Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5 Tenancingo, Estado de México, C.P. 52400, Tels. 714 1407725, 714 1407724, cutenan@uaemex.mx

⁽²⁾ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. Texcoco Estado de México, México. C.P. 56230. evaladez@correo.chapingo.mx

The present study consisted of molecular analysis of 39 genotypes of the genus *Persea* and a related genus: *P. cinerascens* (1), *P. schiedeana* (1), *P. floccosa* (1), *P. parvifolia* (1), *P. lingue* (1), *P. meyeniana* (1), *P. americana* (33) y *Beilschmiedia anay* (1), after collection the DNA was extracted, washed, cut and amplified in PCR. RAPD and ISSR molecular markers were used, the products were developed in gels of Acrylamide. Statistical analyzes were performed based on amplified bands that were recorded as discrete variables: "1" presence, "0" absence and transformed into a binary character matrix, subsequently data were processed with the FreeTree software (Version 0.9.1.5) to produce a genetic distance matrix using Nei and Li / Dice similarity coefficient, the resulting matrix was computed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) to construct the phenogram with 1000 bootstrap replicates. Tree View 1.6.6. Software was used to display the obtained tree (Hampel et al., 2001). The RAPD system generated a total of 144 polymorphic bands with an average of 36 bands per primer; with a contribution rate of 16.38 to 31.26; A polymorphic information content (PIC) of 0.28 to 0.40, with an average of 0.34. Through ISSR, 114 polymorphic bands were obtained, averaging 28.5 bands per primer; a contribution percentage of 22.5 to 27.64; a PIC of 0.20 to 0.23, with an average of 0.22. RAPD distinguished 2 main branches: in group A, it grouped UAEM genotypes and hybrids belonging to the Mexican race (*P. americana* var. *Drymifolia*) and *P. floccosa*, in branch B are *P. cinerascens*, *P. lingue* and *P. meyeniana* of Chile and *Persea* sp., these belong to the subgenus *Eriodaphne* ("aguacatillos"), associated with these, *B. anay* (anayo), a genus related to *Persea* and predominant in Puebla, Mexico. Because of their ability to identify specific polymorphisms within the genome, ISSRs distinguished almost a similar group in all individuals, making it difficult to distinguish them, but the closeness of *P. cinerascens*, *P. floccosa* and *P. schiedeana* is remarkable. The second group included genotypes of *P. americana* var. *Drymifolia* ("UAEM"), Hybrids: "Ixtapan", "Yatsachi", belonging to the subgenus *Persea*. Individuals may share similarity to the interior of their genome despite their distinct geographic origin.