



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AGUACATE (*Persea americana* MILL.) RAZA MEXICANA MEDIANTE ISSRs

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL, PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN EL ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

PRESENTA:

HELIODORO CUIRIS PÉREZ

TUTOR DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE

COTUTOR DR. RAÚL MEDINA TORRES

ASESOR DR. IGNACIO VIDALES FERNÁNDEZ

XALISCO, NAYARIT, FEBRERO 2008

C. MC. FRANCISCO DE JESÚS CARO VELARDE

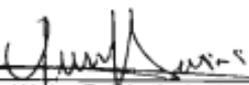
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP

PRESENTE

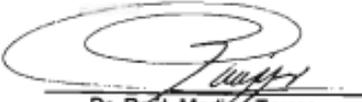
Los que suscribimos, integrantes del Consejo Tutorial del C. Ing. Heliodoro Cuiris Pérez, declaramos que hemos revisado en forma y contenido la tesis "Caracterización de Colectas de Aguacate Raza Mexicana Mediante ISSRs" y en nuestra opinión cumple como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agrícolas

EL CONSEJO TUTORIAL

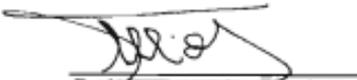
DIRECTOR


Dr. Héctor Guillén Andrade

COTUTOR


Dr. Raúl Medina Torres

ASESOR


Dr. Ignacio Vidales Fernández

15
- FAKW - 08



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



SISTEMA DE PROMOCIÓN

CBAP/05/08

Tepic, Nayarit., 21 de Enero de 2008

C. ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN DE ESCOLAR
P R E S E N T E

En base al oficio de fecha 17 de enero del presente año, enviado por los **CC. Dr. Héctor Guillén Andrade, Dr. Raúl Medina Torres, Dr. Ignacio Vidales Fernández**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con los establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se está autorizando de nuestra parte que el **C. HELIODORO CUIRIS PÉREZ**, continúe ante ustedes con los trámites necesarios para que sea autorizada la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias del citado estudiante.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LO NUESTRO A LO UNIVERSAL"

M. EN C. FRANCISCO DE JESÚS CARO VELARDE
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE NAYARITPOSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICO
AGROPECUARIAS

C.c.p.-Archivo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque ha iluminado y bendecido mi caminar y a pesar de mis desaciertos no me ha soltado de su mano.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, por la oportunidad que me dio al abrirme sus puertas para continuar con mi formación profesional.

A los Drs. Clemente Lemus Flores, Arturo Aguirre Hernández y MC. Francisco de Jesús Caro Velarde, por su apoyo y atenciones brindadas.

Al Dr. Ignacio Vidales Fernández, por sus atinadas sugerencias, recomendaciones y las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones del CEFAP-Uruapan.

Al Dr. Raúl Medina Torres, por su valiosa orientación y recomendaciones otorgadas en la realización de la presente investigación.

A la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo y a mi segunda casa la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", por las facilidades otorgadas.

A la Dra. María Ercelia Ángel Palomares, por la motivación y la excelsa amistad que siempre me ha dispensado.

Dejé al último a propósito, porque quiero de manera especial agradecer al Dr. Héctor Guillén Andrade, su apoyo, dedicación, y orientación para la culminación de este trabajo, pero sobre todo por tu amistad, "Gracias Amigo".

DEDICATORIAS

A la memoria de mis padres, Heliodoro (†) y Carmen (†). Porque supieron ser grandes en medio de la pobreza y su ejemplo perdurará eternamente en mí.

A mi esposa Luz María Ambríz Ramírez, quien ha compartido conmigo toda una vida, y por ser una ejemplar madre de familia.

A mis Hijos, Luz Gabriela, Olga Lucía, Mario Alberto y en especial a Elio Daniel, quienes saben que mi origen me llena de orgullo, que han sido el motivo de mi lucha constante para transitar hacia mejores niveles de bienestar.

A mis hermanos, Elizabeth, María Teresa, Rosa María, Martha Guadalupe, María, Juan Manuel, José Antonio, Alejandro y Verónica del Carmen, porque somos una verdadera familia y ninguno hemos pretendido ser mejor que el otro.

A mis nietas, Leslye Marlene, Valentina y Xadani, por inyectar en mí la energía necesaria para esta segunda etapa de mi vida.

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCION	1
1.1. Objetivo general	4
1.2. Objetivos específicos	4
1.3. Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Generalidades del cultivo del aguacatero	5
2.1.1. Importancia económica	5
2.1.2. Clasificación botánica	5
2.1.3. Origen y dispersión	6
2.1.4. Domesticación	6
2.2. Diversidad genética del aguacate	7
2.3. Conservación de germoplasma	10
2.4. Marcadores genéticos	12
2.4.1. Marcadores morfológicos	12
2.4.2. Marcadores bioquímicos	13
2.4.2.1. Isoenzimas	13
2.4.3. Marcadores moleculares	15
2.4.3.1. Principales usos de los marcadores moleculares	15
2.5. Marcadores no basados en la PCR	17
2.5.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción RFLPs	17
2.6. Marcadores basados en la PCR	18
2.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa PCR	18
2.6.2. Polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias RAPDs	20
2.6.3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados AFLPs	21
2.6.4. Minisatélites y microsatélites	22
2.6.5. Secuencia Simple Repetidas SSRs	23
2.6.6. Inter Secuencias Simple Repetidas ISSRs	25
2.7. Caracterización convencional y biotecnológica del cultivo del aguacatero	28
2.8. Marcadores moleculares en aguacate	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. Determinación del protocolo de aislamiento de ADN genómico de aguacate	36
3.1.1. Material genético	36
3.1.2. Protocolos de aislamiento de ADN	36
3.1.2.1. Protocolo propuesto por Clarke <i>et al.</i> , (1989)	37

3.1.2.2.	Protocolo propuesto por Istvan Nagy <i>et al.</i> , (1998)	39
3.1.2.3.	Protocolo propuesto por Dellaporta <i>et al.</i> , (1983)	40
3.1.2.4.	Protocolo propuesto por Saghai-Marooof <i>et al.</i> , (1984), modificado por Hoisngtong <i>et al.</i> , (1994)	41
3.1.2.5.	Protocolo propuesto por Clarke <i>et al.</i> , (1989) modificado en el laboratorio de biotecnología (INIFAP, Uruapan)	43
3.2.	Colecta del material vegetal	45
3.3.	Cuantificación del ADN	47
3.4.	Electroforesis en gel de agarosa	48
3.5.	Caracterización genética por ISSRs	49
3.5.1.	Iniciadores	49
3.5.2.	Condiciones de amplificación	49
3.5.2.1.	Mezcla de reacción	49
3.5.2.2.	Programa de amplificación	50
3.6.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	51
3.6.1.	Montaje del sistema Sequi.Gen	51
3.6.2.	Preparación en geles de poliacrilamida al 6 %	52
3.7.	Identificación de fragmentos amplificados	53
3.8.	Análisis de datos moleculares	54
3.8.1.	Captura y verificación de datos moleculares	54
3.8.2.	Relaciones de parentesco	55
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1.	Calidad y cantidad de ADN	56
4.1.2.	Protocolo propuesto por Clarke <i>et al.</i> , (1989)	56
4.1.3.	Protocolo propuesto por Istvan Nagy <i>et al.</i> , (1998)	57
4.1.4.	Protocolo propuesto por Dellaporta <i>et al.</i> , (1983)	57
4.1.5.	Protocolo propuesto por Saghai-Marooof <i>et al.</i> , (1984)	58
4.1.6.	Protocolo propuesto por Clarke <i>et al.</i> , (1989) modificado	61
4.2.	Cuantificación del ADN	63
4.3.	Prueba de la viabilidad del ADN	65
4.4.	Nivel de complejidad de los protocolos probados	66
4.5.	Resolución en geles de agarosa	67
4.6.	Resolución en geles de poliacrilamida	67
4.7.	Amplificación del ADN para las colectas de aguacate de la raza mexicana	68
4.8.	Nivel de polimorfismo	69
4.9.	Determinación de relaciones de parentesco	72
V.	CONCLUSIONES	78
VI.	LITERATURA CITADA	79
VII.	APÉNDICE	87

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Relación entre las razas hortícolas de aguacate y sus ambientes de adaptación	10
2	Comparativa de marcadores genéticos moleculares	27
3	Colectas de aguacate criollo utilizadas en las extracciones de ADN	36
4	Componentes de reacción de la solución extractora en el protocolo descrito por Clarke <i>et al.</i> , (1989).	38
5	Componentes de reacción del amortiguador utilizado en el protocolo descrito por Istvan Nagy <i>et al.</i> , (1998).	40
6	Componentes de reacción de la solución extractora utilizada en el protocolo descrito por Dellaporta <i>et al.</i> , (1983).	41
7	Componentes de reacción de la solución extractora utilizada en el protocolo descrito por Saghai-Marooof <i>et al.</i> , (1984), modificado por Hoisington <i>et al.</i> , (1994).	43
8	Componentes de reacción de la solución extractora utilizada en el protocolo descrito por Clarke <i>et al.</i> , (1989), modificado en el laboratorio de Biotecnología (INIFAP, Uruapan).	45
9	Identificación de los sitios de las 77 colectas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) raza mexicana.	47
10	ISSRs utilizadas en la caracterización de colectas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) de la raza mexicana.	49
11	Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de ADN de colectas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) raza mexicana, mediante ISSRs.	50
12	Componentes de reacción para la preparación de geles de poliacrilamida para la separación de amplicones de tipo ISSRs.	53
13	Cantidad de ADN obtenido de tejido foliar de aguacate de acuerdo a Clarke <i>et al.</i> , (1989), modificado.	64
14	Nivel de polimorfismo obtenido con siete microsatélites del tipo ISSRs en 231 individuos de 77 colectas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) raza mexicana.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ubicación de los sitios de procedencia de frutos de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) raza mexicana.	46
2	Programa de amplificación utilizado con muestras de ADN de las colectas de aguacate y secuencias iniciadoras del tipo ISSRs.	51
3	Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Clarke <i>et al.</i> , (1989). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (A).	59
4	Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Istvan Nagy <i>et al.</i> , (1998). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (A).	59
5	Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Dellaporta <i>et al.</i> , (1983). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (A).	60
6	Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Saghai-Marooif <i>et al.</i> , (1984), modificado por Hoisington <i>et al.</i> , (1994). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (A).	60
7	Fotografía del gel de calidad de ADN aislado de tejido foliar de 15 colectas de tres razas de aguacate mediante modificaciones hechas al procedimiento descrito por Clarke <i>et al.</i> , (1989) modificado. El marcador de peso molecular es el fago Lambda (A).	63
8	Productos de amplificación obtenidos con muestras de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate y el iniciador del tipo SSR AVAG-05. El marcador (M) de peso molecular es $\Phi X174/HaeIII$.	66
9	Patrón de bandas obtenidas en gel de agarosa al 4 %, con cinco secuencias ISSRs y ADN de cuatro colectas de aguacate de la raza mexicana.	67
10	Patrón de bandas obtenidas con poliacrilamida, un iniciador y ADN de 96 colectas de aguacate de la raza mexicana.	68
11	Perfil genético de colectas de aguacate de la raza mexicana obtenido mediante el iniciador (AG) _n C.	69
12	Dendograma de encadenamiento completo de 77 colectas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) de la raza mexicana obtenido mediante siete secuencias internas de repetición corta (ISSR).	77

SUMMARY

In this research, five genomic DNA extraction protocols were tested: 1) Clarke et al. (1989), 2) Istvan Nagy et al. (1998), 3) Dellaporta et al. (1983), 4) Saghai-Marooof et al. (1984) modified by Hoisington et al., (1994) and 5) Clarke et al. (1989) modified by Guillén et al. (2003). With the exception of the latter, all other protocols have been successfully utilized in different plant species. The amount of leaf tissue was standardized for use with all five DNA extraction procedures. With the exception of the Saghai-Marooof et al. (1984) protocol, leaf tissue was collected a day prior to its processing; processed leaf tissue was stored at 20 °C. Seven ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) microsatellite primers were used to generate a great number of randomly amplified DNA sequences in a total of 77 (231 plants) avocado (*Persea americana* Mill. Mexican race) accessions located at the Germplasm Repository belonging to the "Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Centro (CEFAP) Uruapan" in Michoacan, Mexico. The modified Clarke et al. (1989) protocol turned out a viable method for use in avocado. ISSR markers were capable of detecting DNA polymorphisms ranging from 82.28 to 95.39 %. Two major distinct groups were formed, one with 11 subgroups and the other with three subgroups. Within the first group, accessions # 237 (Atlixco, Puebla) and CXTC01 (Uruapan, Michoacan) had the same number of polymorphic bands. Accessions # 532 (Atlixco, Puebla) and # 309 (Chilchota, Michoacan) were the most dissimilar ones within the second group. Some variation existed in the grouping of the avocado genetic material. Nonetheless, there were no duplicate materials within the wide diversity of avocado accessions tested; these accessions should be kept by the CEFAP-Uruapan for breeding purposes.

RESUMEN

Se probaron cinco protocolos de aislamiento de ADN genómico: Clarke *et al.*, (1989), Istvan Nagy *et al.*, (1998), Dellaporta *et al.*, (1983), Saghai-Marroof *et al.*, (1984) y el método de Clarke *et al.*, (1989) modificado por Guillén *et al.*, (2003). Todos los protocolos indicados se han utilizado con éxito en diferentes especies vegetales a excepción del de Clarke *et al.*, (1989) modificado. En todos los procedimientos de aislamiento de ADN, se estandarizó la cantidad de tejido foliar utilizado. Con excepción del método propuesto por Saghai-Marroof *et al.*, (1984) el tejido foliar fue colectado el día previo a su procesamiento y se almacenó a una temperatura de -20 °C. Los iniciadores microsátélites del tipo ISSRs (intersecuencias simples repetidas) empleados fueron siete para obtener un amplio número de fragmentos de ADN amplificado por secuencias aleatorias de 77 colectas (231 individuos), de aguacate (*Persea americana* Mill.) raza mexicana existentes en el Banco de Germoplasma del INIFAP- CEFAP-Uruapan, Michoacán. El protocolo descrito por Clarke *et al.*, (1989), modificado por Guillén *et al.*, (2003), resultó ser un método viable para ser utilizado en aguacate. Los marcadores genéticos ISSRs fueron capaces de detectar altos porcentajes de polimorfismo desde un 82.28 a 95.39 %. Se formaron dos grandes grupos, el primero con 11 subgrupos y el segundo con tres subgrupos. Se encontraron materiales con un número similar de bandas polimórficas, en el subgrupo I provenientes de las colectas 237 de Atlixco, Puebla y CXTC01 de Uruapan, Michoacán, las más disímiles fueron las colectas 532 de Atlixco, Puebla y 309 de Chilchota, Michoacán, pertenecientes al segundo grupo. Existieron algunas variaciones en el agrupamiento de los materiales de *Persea americana* Mill. La amplia diversidad de las colectas en el banco de germoplasma del CEFAP-Uruapan, indicó que no existieron materiales duplicados por lo que deben mantenerse para posteriores trabajos de mejoramiento genético.

I. INTRODUCCIÓN

La progresiva alteración del medio ambiente, acelera la pérdida de recursos naturales y de biodiversidad, amenaza así la existencia del hombre sobre el planeta. Por lo que se hace necesaria la generación de nuevos conocimientos encaminados principalmente a evitar y preservar la pérdida de germoplasma de especies vegetales y animales útiles al hombre. El germoplasma vegetal es un recurso natural, limitado y perecedero que proporciona materia prima o genes que debidamente utilizados y combinados por las técnicas de fitomejoramiento pueden formar variedades nuevas de plantas. Los genes se encuentran dispersos en especies locales y poblaciones naturales de plantas, que han sido seleccionadas a lo largo de miles de años por la naturaleza y los agricultores, por sus características de adaptación, resistencia y/o productividad. Sin la disponibilidad de estos recursos para los centros de investigación agrícola la mejora de variedades no sería posible (Borojevic, 1990).

Lo anterior ha llevado a esfuerzos para la protección y explotación de recursos naturales, bajo una correcta colección, conservación, evaluación, documentación e intercambio adecuado de germoplasma vegetal. El objetivo es el garantizar provisiones para futuras generaciones humanas, lo cual no es simple, ya que involucra cuestiones, económicas, técnicas y políticas. Se ha observado el incremento significativo del número de colecciones en los centros de almacenamiento de todo el mundo tanto *ex situ* como *in situ* (Villalobos y Engelmann, 1995).

En el área de origen del aguacate con sus tres razas, se ha dado a través de miles de años un proceso que ha generado una gran diversidad genética (Ben Ya'acov, 1992a); decenas de miles de árboles silvestres provenientes de semilla (francos) existen actualmente bajo condiciones ecológicas muy variadas. La selección natural principalmente, y la acción (selección) del hombre durante miles de años, ha producido tipos adaptados a esas regiones (Ben Ya'acov, 1992; Gama y Gómez, 1992).

En las actividades de un banco de germoplasma el intercambio de materiales es uno de los procesos más importantes en el manejo de las colecciones sin embargo, para que estos materiales puedan ser intercambiados e incluso conservados dentro de éste, es necesaria su correcta clasificación e identificación, con el propósito de evitar duplicación tanto en el intercambio como en la conservación de las accesiones dentro del banco, así como para mantener un rango adecuado de diversidad genética. La falta de información confiable sobre los recursos genéticos del aguacate en nuestro país limita los esfuerzos enfocados a su mejoramiento genético (Ben Ya'acov, 1992; Gama y Gómez, 1992).

Por ser el aguacate una especie de polinización abierta, presenta una gran variabilidad genética con posibilidades casi ilimitadas para su aprovechamiento (Bergh, 1992; Schieber y Zentmyer, 1992). Una amplia diversidad de germoplasma permite el avance del conocimiento botánico y agronómico así como el desarrollo de nuevas variedades. Varios problemas prácticos y restricciones mayores en la producción de aguacate, tales como enfermedades, salinidad, producción, calidad,

precocidad a madurez, etc., quizás pudieran encontrar solución en los recursos genéticos de *Persea* (Bowman y Scora, 1992).

La caracterización agromorfológica y molecular del material colectado es una actividad primaria para el uso de germoplasma de aguacate. El estudio de la variabilidad morfoagronómica es el camino clásico para evaluar la diversidad genética. En muchas especies vegetales, es la aproximación usada por los mejoradores. Sin embargo, la tecnología de marcadores moleculares (TMM), es una poderosa herramienta para que los recursos genéticos puedan evaluarse y caracterizarse a nivel de ADN (Lanaud y Lebot, 1995).

La utilización de la tecnología de marcadores moleculares facilita y acorta el proceso de selección clonal y hace viable en muchos casos la mejora mediante cruzamientos e, incluso, la introducción de genes de interés agronómico (Moreno *et al.*, 1997). La presencia de metabolitos secundarios (taninos y fenoles) dificulta la obtención de ADN de alta pureza en el aguacate ya que estos inhiben la acción de las enzimas y el ADN es inmanejable en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), derivándose la necesidad de contar con métodos eficientes para la caracterización de esta especie con el empleo de marcadores moleculares.

Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se plantearon los objetivos e hipótesis siguientes:



1.1. Objetivo General

Establecer las relaciones de parentesco de colectas de aguacate de la raza mexicana existentes en el Banco de Germoplasma del CEFAP-Uruapan, Michoacán.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar un protocolo óptimo para el aislamiento de ADN genómico de aguacate.
- Aislar el ADN de 231 genotipos provenientes de 77 colectas del banco de germoplasma del CEFAP-Uruapan.
- Determinar las relaciones de parentesco entre las colectas de aguacate, en función del polimorfismo dominante.

1.3. Hipótesis

El ADN genómico de aguacate es susceptible de ser aislado con cualquier protocolo de extracción utilizado con éxito en otras especies vegetales.

Las colectas de aguacate establecidas en el banco de germoplasma del CEFAP-Uruapan, presentan una amplia diversidad genética.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo del aguacatero

2.1.1. Importancia económica

El cultivo de aguacate prospera en diversas condiciones ecológicas del mundo. En el estado de Michoacán, México se cultiva una superficie de alrededor de 94,000 ha, obteniéndose una producción de 871,883 t, situándose como el principal productor a nivel mundial (Guillén *et al.*, 2007). Este cultivo tiene además una gran importancia económica y social, por su actividad se generan alrededor de 40 mil empleos directos y permanentes, 25 mil empleos entre directos y estacionales y 60 mil estacionales por diversas actividades derivadas del proceso de la cadena productiva (Sánchez *et al.*, 2000).

2.1.2. Clasificación botánica

El aguacate es un miembro de la familia Lauraceae, la cual comprende poco más de 50 géneros entre los cuales se encuentra *Persea*, al cual pertenece el aguacate (*Persea americana* Mill.). La familia Lauraceae comprende alrededor de 2200 especies, y la mayoría de ellas son tropicales y subtropicales (Bergh y Ellstrand, 1986). El género *Persea* tiene un número desconocido de especies (Bergh, 1992), aunque algunos autores aseguran que son unas 80 reconocidas como válidas (Storey *et al.*, 1986; Zentmyer, 1991). El género está constituido por dos subgéneros, uno de ellos *Persea*, contiene pocas especies estrechamente relacionadas entre sí, incluyendo a *Persea americana*, el aguacate comercial. El otro subgénero es

Eriodaphne, bastante numeroso y variable, claramente diferenciado, y que contiene algunas especies que tienen una resistencia total a la pudrición de la raíz causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands (Bergh y Ellstrand, 1986; Bergh, 1992).

2.1.3. Origen y dispersión

Los miembros reconocidos del subgénero *Persea* ocurren primariamente en la misma región: desde la parte central de México, a través de Guatemala hasta gran parte de Centroamérica. Como evidencia de lo anterior, están los hallazgos de aguacates primitivos en esa área general desde la Sierra Madre Oriental en el Estado de Nuevo León, México, hasta Costa Rica en Centroamérica, apoyando la suposición de que se trata de un centro de origen del aguacate, y probablemente de todo el subgénero *Persea* (Bergh y Ellstrand, 1986; Storey *et al.*, 1986; Schroeder, 1990; Hawkes, 1991; Ben Ya'acov, 1992,1992a; Bergh, 1992). Esa área general coincide en gran parte con la descripción de Vavilov (1931-1951), del llamado centro principal de Origen VII, que incluye a México, Centroamérica y el Caribe.

2.1.4. Domesticación

Evidencias arqueológicas señalan que el aguacate era consumido por los pueblos nativos hace 10,000 años, y su cultivo se habría iniciado posiblemente hace unos 6,000 años (Storey *et al.*, 1986; Schieber y Zentmyer, 1992). No se sabe cuando se inició una selección consciente del aguacate primitivo en busca de mejor calidad de fruto para su propagación (Storey *et al.*, 1986). Consideró que eso pudo haber ocurrido hacia el año 900 a.C. sin embargo sus evidencias han sido muy

cuestionadas Según Kopp (1966), el origen de las actuales formas de aguacate es oscuro debido a su estrecha conexión con representantes de civilizaciones muy antiguas del área México - Guatemala - Honduras, quienes valoraban mucho sus frutos. Ese es por lo tanto un problema de Etnobotánica.

Gama y Gómez (1992), hicieron un estudio en la región Maya de México y Centroamérica para adentrarse más en los aspectos de Etnobotánica en relación al aguacate. De acuerdo con sus conclusiones, la domesticación del aguacate ocurrió hace miles de años, cuando los antiguos pobladores movieron plantas de su medio silvestre hacia la cercanía de sus sitios de morada, a huertos, y las semillas ahí obtenidas fueron regresadas al medio silvestre.

Las especies del género *Persea* se han utilizado desde hace miles de años no sólo por su fruto en la alimentación humana, sino también se han utilizado los árboles como leña, en la construcción de viviendas, elaboración de herramientas de trabajo, como árbol de sombra, también se le ha utilizado como alimento de animales domésticos, condimento y medicina (Bergh y Ellstrand, 1986; Gama y Gómez, 1992) y más recientemente en la elaboración de tés y vinos, aceite de cocinar y cosméticos (Schroeder, 1990; Bergh y Ellstrand, 1986; Bergh, 1992).

2.2. Diversidad genética del aguacate

No se puede asegurar que las antiguas civilizaciones o grupos étnicos que participaron en el proceso de domesticación del aguacate hayan contribuido de alguna manera a la diferenciación de *Persea americana* en subespecies, pero es

evidente que se dieron tipos divergentes que se desarrollaron en aislamiento geográfico que finalmente dieron lugar a tipos botánicos distintos (Storey *et al.*, 1986), con diferencias además en adaptación climática (Bergh, 1992).

Tres de esos tipos diferentes son en la actualidad ampliamente conocidos a nivel mundial como subespecies o variedades botánicas de *Persea americana*: *drymifolia*, *guatemalensis* y *americana* (Bergh, 1992). Desde hace varios años esos tres tipos se han conocido en los círculos hortícolas como razas ecológicas o razas hortícolas: raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia* [Schlet & Chain.] Blake), raza Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis* Williams.) y raza Antillana (*Persea americana* var. *Americana* Mill.), respectivamente (Bergh, 1992; Bergh y Ellstrand, 1986). Las razas Mexicana y Guatemalteca se originaron y domesticaron en las tierras altas de México y Guatemala, respectivamente (Storey *et al.*, 1986; Bergh, 1992) mientras que la raza Antillana muy probablemente tuvo su origen en la costa del Pacífico de Centroamérica, desde Guatemala hasta Costa Rica (Storey *et al.*, 1986).

Esas tres razas no son lo suficientemente diferentes como para ser consideradas especies diferentes, pero si lo son para considerarse como formas separadas ya sea como subespecies o variedades botánicas (Bergh y Ellstrand, 1986; Storey *et al.*, 1986). Ya que las tres razas tienen un genoma muy parecido ($2n=24$), la hibridación entre ellas ocurre con facilidad, y sus híbridos obtienen ventajas de adaptación climática, así como características agronómicas mejoradas (Bergh, 1992).

El orden de adaptación tropical de las tres razas, de mayor a menor, es: Antillana, Guatemalteca y Mexicana. En una zona tórrida, a una misma latitud, desde el nivel del mar hasta 1,000 m de altitud, se adapta la raza Antillana, junto con algunos frutales como mango. Entre 1,000 y 2,000 msnm se adapta la Guatemalteca, con cítricos, chirimoya y otros. De unos 1,500 a 3,000 msnm las líneas mexicanas se desempeñan mejor junto con manzanos, duraznos, bosque de pino-encino, etc. (Bergh, 1992; Gama y Gómez, 1992). Sin embargo como lo señala Bergh (1992), las tres razas pueden convivir y prosperar bien una junto a otra en partes de Israel y Marruecos, así como tal vez en otras partes del mundo. Existen diferentes teorías que tratan de explicar el origen y desarrollo de los diferentes tipos de aguacate (Williams, 1977), pero ninguna ha podido ser probada.

Por ser el aguacate una especie de polinización abierta, presenta una gran variabilidad genética con posibilidades casi ilimitadas para su aprovechamiento (Bergh, 1992; Schieber y Zentmyer, 1992). Una amplia diversidad de germoplasma permite el avance del conocimiento botánico y agronómico así como el desarrollo de nuevas variedades. Varios problemas prácticos y restricciones mayores en la producción de aguacate, tales como enfermedades, salinidad, producción, calidad, precocidad a madurez, etc., quizás pudieran encontrar solución en los recursos genéticos de *Persea* (Bowman y Scora, 1992).

De esta manera, la utilización de la diversidad genética existente ya sea como variedades, portainjertos y en general para el mejoramiento de la especie, es invaluable para el desarrollo del aguacate bajo condiciones de estrés (Ben Ya'acov,

1992; Gama y Gómez, 1992; Schieber y Zentmyer, 1992). Investigaciones sobre la posible utilización de parientes botánicos del aguacate para la obtención de genotipos mejorados, han puesto al descubierto un amplio rango de materiales vegetales que como el aguacate tienen frutos y plantas útiles e interesantes (Schroeder, 1990).

Cuadro 1. Relación entre las razas hortícolas de aguacate y sus ambientes de adaptación.

Raza hortícola	Origen	Temperatura media anual (°C)	Precipitación media anual (mm)	Altitud (msnm)
Mexicana: (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	Nativos	13.5 – 20.5	650 – 2200	950 – 2250
	Introducidos	(20.5 – 25.5)	(300 – 2250)	(50 – 2350)
Guatemalteca: (<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>)	Nativos	21.0 – 28.0	800 – 3400	20 – 1200
	Introducidos	(18.0 – 28.5)	(250 – 700)	(1850 – 1950)
Antillana: (<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>)	Nativos	24.0 – 27.0	1100 – 3350	50 – 800
	Introducidos	(19.0 – 20.0)	(600 – 700)	(1350 – 1450)

Fuente: Sánchez, P. J. L. 1999.

2.3. Conservación de germoplasma

Uno de los grandes problemas del siglo XX y posiblemente si no se toman las provisiones necesarias del siglo XXI, fue y será el cambio climático, reflejándose

entre otros por una acelerada pérdida de recursos naturales y de biodiversidad, amenazando así la existencia del hombre sobre el planeta. Por lo que se hace necesaria la generación de nuevos conocimientos encaminados principalmente a evitar y preservar la pérdida de germoplasma de especies vegetales y animales útiles al hombre. El germoplasma vegetal es un recurso natural, limitado y perecedero que proporciona materia prima o genes que debidamente utilizados y combinados por las técnicas de fitomejoramiento pueden formar variedades nuevas de plantas. Los genes se encuentran dispersos en especies locales y poblaciones naturales de plantas, que han sido seleccionadas a lo largo de miles de años por la naturaleza y los agricultores, por sus características de adaptación, resistencia y/o productividad. Sin la disponibilidad de estos recursos para los centros de investigación agrícola la mejora de variedades no sería posible (Borojevic, 1990).

Lo anterior ha llevado a esfuerzos para la protección y explotación de recursos naturales, bajo una correcta colección, conservación, evaluación, documentación e intercambio adecuado de germoplasma vegetal. El objetivo es el garantizar provisiones para futuras generaciones humanas, lo cual no es simple, ya que involucra cuestiones, económicas, técnicas y políticas. Se ha observado el incremento significativo del número de colecciones en los centros de almacenamiento de todo el mundo tanto *ex situ* como *in situ* (Villalobos y Engelmann, 1995).

2.4. Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son características distintivas que se manifiestan de manera constante en un organismo o una población, el hombre generalmente utiliza estos marcadores para la discriminación de genotipos cuando utiliza o clasifica cierto germoplasma. Hay diversos tipos de marcadores genéticos, pero se pueden definir tres grandes grupos morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los rasgos morfológicos son los marcadores más antiguos y más ampliamente usados, y estos pueden ser óptimos para ciertas aplicaciones en el manejo de germoplasma. Su primera ventaja es la simplicidad y rapidez, bajo costo, para especímenes de herbario y otros tejidos muertos (Bretting y Widrechner, 1995).

2.4.1. Marcadores morfológicos

El mejoramiento de varias especies se complica por algunas características, por ejemplo la ausencia de semillas en algunas variedades de vid (*Vitis* spp.) y la maduración temprana en durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch.), en donde el fruto madura antes que el embrión. Otro factor que complica la hibridación es debido a que muchas especies frutales son altamente heterocigóticas. Esta heterogénesis, junto con la carencia de conocimiento genético para muchas de estas especies, da como resultado una hibridación seguida de una progenie con características impredecibles (Moore y Durham, 1992).

Los marcadores morfológicos se han usado en programas de mejoramiento genético para obtener variedades mejoradas de diversos cultivos. Sin embargo, su desventaja es su tendencia a ocasionar grandes efectos fenotípicos, ya que normalmente el marcador se encuentra ligado no sólo a las características de interés sino también a otras características indeseables (Tanksley *et al.*, 1989). La clasificación basada en rasgos morfológicos (Py, 1970), no forma un criterio de confianza por que están limitados por efectos ambientales y fenotípicos. Usando rasgos morfológicos, puede ser difícil el distinguir entre varios cultivares de cítricos (Fang y Roose, 1997).

Muchos de los problemas asociados con los programas de mejoramiento basados en la estimación fenotípica de un rasgo agronómico, tales como un mayor efecto ambiental o herencia cuantitativa, se pueden eliminar por el uso de diagnósticos basados en ADN. Estas aproximaciones se espera sean ventajosas particularmente en programas de mejoramiento que involucran rasgos multigénicos o cuantitativos, los cuales son notoriamente difíciles cuando se trata de un solo ensayo fenotípico (Tanksley *et al.*, 1989).

2.4.2. Marcadores bioquímicos

2.4.2.1. Isoenzimas

La historia de los marcadores moleculares comienza cuando en 1959 Market y Moller acuñan el término isoenzima. Las isoenzimas son variantes de una misma

enzima que tienen función similar en un individuo, estas fueron el tipo de marcadores más comúnmente usados. La técnica de isoenzimas es relativamente simple y el equipo requerido es poco costoso (Moore y Durham, 1992).

Las técnicas electroforéticas y el estudio de las enzimas como marcadores en poblaciones naturales constituyen una metodología de uso relativamente fácil en nuestro medio y de largos alcances por sus diversas implicaciones en diferentes campos tales como la genética de poblaciones, biología reproductiva y fitomejoramiento (Mejía, 1992).

La caracterización de germoplasma por isoenzimas se ha usado para examinar el grado de diversidad genética y las relaciones entre y dentro de las especies (Malikarjuna *et al.*, 1994). El uso más conveniente de las isoenzimas es su aplicación en investigaciones intraespecíficas; cuando gran cantidad de accesiones se agrupan confiablemente por estos marcadores moleculares (Klass, 1998).

Una de las desventajas de los marcadores isoenzimáticos es que pueden afectarse por condiciones ambientales en diferentes fases de desarrollo (Kuhns y Fretz, 1978; Falkenhagen, 1985). En suma, el número de loci por enzima que se puede analizar es limitado, y la discriminación (separación) de diferentes genotipos no es siempre posible. Los marcadores basados en el ADN pueden superar ampliamente esta limitante y pueden aplicarse exitosamente para discriminar entre

genotipos individuales en un amplio rango de especies animales y vegetales (Nybom, 1991; Weising *et al.*, 1991).

2.4.3. Marcadores moleculares

2.4.3.1 Principales usos de los marcadores moleculares

Los trabajos pioneros con uso de los marcadores moleculares no se desarrollaron en especies perennes y mucho menos en frutales, sino en especies como tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.), maíz (*Zea mays* L.) y (*Arabidopsis thaliana* L. Henry), en los que existe información muy extensa al respecto (Moore y Durham, 1992).

El análisis genético de especies perennes frutales esta limitado por varios factores incluyendo el gran tamaño de las plantas, largos periodos de juvenilidad autoincompatibilidad e incompatibilidad cruzada, depresión endogámica y apomixis (Moore y Janick, 1993).

Tres áreas potenciales donde los marcadores moleculares pueden ser utilizados: 1) identificación varietal y parentesco, 2) identificación de loci genético que afectan un rasgo cuantitativo de importancia económica, y 3) programas de mejoramiento genético, incluyendo registro y evaluación de germoplasma, introgresión, mejoramiento de híbridos comerciales y selección dentro de poblaciones (Clegg *et al.*, 1995).

La importancia de los marcadores moleculares, se basa en la infinidad de aplicaciones que se tienen según Moore y Durham (1992). Los principales usos de los marcadores moleculares son de manera general: hacer mapas genómicos, análisis de germoplasma como nuevas fuentes de variación, identificación de genotipos, detección de híbridos y determinación de rangos de autocruzas, análisis de pedigree, etiquetado de genes que controlan caracteres de importancia comercial, elaboración de mapas de locus con rangos cuantitativos, estudios de introgresión de genes, población genética y estudios taxonómicos, expansión de nuestro conocimiento a la estructura del genoma y mapas basados en reproducción de genes. Los marcadores moleculares basados en ADN según Tanksley *et al.*, (1989), se detectan como diferencias o poliformas en la información genética entre individuos.

Según Castillo (1996), las principales ventajas de los marcadores moleculares, respecto a los caracteres morfológicos, proteínas y flavonoides son:

1. No están influenciados por el medio ambiente,
2. Puede usarse cualquier parte de la planta,
3. Requiere pequeñas cantidades de tejido vegetal,
4. El ADN es muy estable en condiciones de un refrigerador común,
5. Puede obtenerse y registrar un ilimitado número de datos.

Sin embargo, este mismo autor señala algunas desventajas de su uso:

1. Generalmente caracteriza una pequeña parte del genoma y no necesariamente está relacionado a caracteres morfológicos,
2. Muchos de ellos son costosos y requieren equipos especiales.

Para detectar variaciones en el ADN de dos individuos diferentes, se requiere de técnicas especializadas. Un gran número de técnicas pueden ser utilizadas para la detección de variación en el ADN (polimorfismo), algunos de estos se basan en la digestión inicial de ADN con enzimas de restricción, mientras otras dependen del uso de una reacción enzimática diferente, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Karp *et al.*, 1997).

2.5. Marcadores no basados en la PCR

2.5.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)

Posterior a las isoenzimas, los marcadores considerados como clásicos son los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) llamados en español polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (Moore y Durham, 1992; Karp *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1997).

La detección de RFLPs depende de la variación natural en la secuencia básica de ADN entre individuos. Estas diferencias se detectan por el corte de ADN en fragmentos mediante enzimas de restricción. El ADN fragmentado se separa por tamaño mediante una electroforesis, se desnaturaliza y se transfiere a una

membrana, y se hibrida con una sonda de ADN que debe estar marcada para poder visualizar los fragmentos de restricción que hibridan con la sonda (Moore y Durham, 1992; Rafalski y Tingey, 1993; Karp y Edwards, 1995; Karp *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1997).

Según Moore y Durham (1992), la acción de los RFLPs tiene ciertas ventajas sobre las isoenzimas: un modelo de herencia genética simple puede frecuentemente deducirse, la herencia es codominante y el polimorfismo es fenotípicamente neutral. La mayor ventaja de los RFLPs sobre las isoenzimas es el número de marcadores RFLPs que pueden ser detectados, como las variaciones en la secuencia de aminoácidos que se realiza para las isoenzimas. Las desventajas del análisis mediante RFLPs es que estos consumen una gran cantidad de tiempo, se requiere el uso de materiales radioactivos, es necesaria experiencia en clonación, elevada cantidad de ADN, entre otras (Karp y Edwards, 1995; Karp *et al.*, 1997).

2.6. Marcadores basados en la PCR

2.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa

En 1985, Mullis desarrolló un método de amplificación *in vitro* de ADN, que permitió producir grandes cantidades de uno o más fragmentos específicos (productos amplificados) a partir de un ADN molde de gran complejidad o bien ARN, seguido de transcripción inversa (Mullis, 1990). Lo denominaron reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) (Saiki *et*

et al., 1988; Erlich y Arnheim, 1992; White, 1996). Para que produzca la amplificación de ADN, el método requiere de una ADN polimerasa y uno solo o dos iniciadores. El ADN amplificado puede ser visualizado por simple tinción, sin necesidad de una sonda (en este caso el iniciador hace la función de sonda). La PCR detecta diferencias en la secuencia nucleotídica de los fragmentos amplificados de los individuos en estudio. Estas diferencias se pueden deber al cambio de una a más pares de bases en el sitio de unión de los iniciadores o a cambios estructurales mayores que modifican la distancia de unión entre iniciadores. La PCR ha permitido el desarrollo de marcadores moleculares que han abierto nuevas perspectivas para resolver los problemas tradicionales de caracterización (Saiki *et al.*, 1988; Karp *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1997; Henry, 1998).

Hay un número de ventajas en el uso de la PCR en la determinación de genotipos a partir de una muestra de ADN. El ensayo toma unas cuantas horas comparado con la transferencia de 'Southern' blotting requerido con los RFLPs, el cual toma días o semanas; puede automatizarse, procesa un gran número de muestras para ser rápidamente etiquetadas con poca labor requerida. Finalmente la PCR es económica en cuanto al ADN; se requiere menor cantidad de ADN desde 10 nanogramos (ng) a diferencia de RAPD, AFLPs y microsatélites que requieren cantidades de hasta 100 ng (Rafalski y Tinguey, 1993), mientras en transferencia se requieren nanogramos o microgramos de ADN. En una reacción de PCR, muchos loci genéticos distintos pueden ser etiquetados al mismo tiempo por amplificaciones múltiples usando múltiples pares de iniciadores (Erlich y Arnheim, 1992).

En años recientes se ha reconocido que marcadores de ADN basados en PCR son una poderosa herramienta para análisis genéticos así como para programas de mejoramiento por su simplicidad y facilidad de manejo (Karp y Edwards, 1995; Karp *et al.*, 1997; Kojima *et al.*, 1998).

2.6.2. Polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias RAPDs

Con el advenimiento de PCR, un número de técnicas estrechamente relacionadas basadas en este principio se desarrollan al mismo tiempo y son referidas colectivamente como *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling* (MAAP) (Caetano-Annollés, 1994; Karp *et al.*, 1997). La más usada de éstas son los análisis de polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias, conocidas como RAPD (*Randomly Amplified Polimorphic DNA*) por sus siglas en inglés, en las cuales los iniciadores son usualmente de 10 a 20 pares de bases y en los cuales los productos de la amplificación se separan en geles de agarosa y los productos de amplificación se tiñen con bromuro de etidio y finalmente son visualizados bajo luz ultravioleta (Williams *et al.*, 1990). AP-PCR (PCR con iniciadores arbitrarios) (Welsh y McClelland, 1990) y DAF (Amplificación de huellas genómicas de ADN) (Caetano-Annollés *et al.*, 1991), difieren de los RAPDs principalmente en la longitud del iniciador, las condiciones de astringencia y en los métodos de separación y detección de los fragmentos. En todos los casos, el polimorfismo se obtiene al amplificar *in vitro* el ADN genómico con iniciadores escogidos al azar y, por tanto, no es necesario un conocimiento previo sobre el genoma del organismo a estudiar (Moreno *et al.*, 1997)

el polimorfismo es detectado como presencia o ausencia de bandas (Karp y Edwards, 1995).

Los RAPDs también han detectado altos niveles de polimorfismo comparado con los RFLPs en casos donde las dos técnicas se han aplicado para el mismo material (Karp y Edwards, 1995).

Debido a los problemas de reproducibilidad entre laboratorios y su característica de ser marcadores dominantes, no se aconseja su utilización en la identificación varietal para el establecimiento de bancos internacionales de datos (Wolff *et al.*, 1995).

2.6.3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs)

La técnica de los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism* por sus siglas en inglés) se basa en la amplificación selectiva por medio de la PCR de fragmentos de restricción del total de ADN genómico digerido (Vos *et al.*, 1995; Karp *et al.*, 1997). Es considerada básicamente una tecnología intermedia entre los RFLPs y RAPDs (Karp y Edwards, 1995). La técnica involucra tres pasos: 1) restricción del ADN y ligación de los adaptadores de oligonucleótidos, 2) amplificación selectiva de los juegos de fragmentos de restricción y 3) análisis del gel de los fragmentos amplificados. Usando este método, se pueden visualizar series de fragmentos de restricción por medio de la reacción en cadena de la polimerasa sin el conocimiento

de la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, el número de fragmentos que pueden ser amplificados simultáneamente, dependen de la resolución del sistema de detección. Típicamente 50-100 fragmentos de restricción son detectados y amplificados en un gel de poliacrilamida, pueden ser marcadores dominantes y codominantes (Karp y Edwards, 1995; Vos *et al.*, 1995; karp *et al.*, 1997). Los AFLPs proveen una nueva y muy poderosa técnica de marcar ADN de cualquier origen o complejidad (Vos *et al.*, 1995; Karp *et al.*, 1997).

2.6.4. Minisatélites y microsatélites

Recientemente se han descubierto la existencia de secuencias de ADN extremadamente variables tanto en animales como en plantas. Uno de estos son las secuencias de ADN en minisatélites que consiste en repeticiones en serie de una secuencia (Nybon, 1991; Moore y Durham, 1992). Las secuencias están a menudo dispersas a través del genoma y representan diferentes loci (Moreno *et al.*, 1998). En cada locus los alelos pueden representarse por un número variable de repeticiones de secuencia una tras otra. De esta manera, una simple prueba homóloga para la secuencia común puede revelar simultáneamente variabilidad en muchos loci, produciendo la huella genética de un organismo (Nybon, 1991; Moore y Durham, 1992).

El ADN repetitivo en secuencia una tras otra, se puede clasificar en tres clases

1) ADN satélite, el cual muestra unidades de repetición con una longitud mayor a

300 pares de bases (pb), 2) monómeros minisatélite que comprenden las repeticiones de 9 a 100 pares de bases (pb) y 3) microsátélites o secuencias simples que exhiben unidades de repetición de 1 a 6 pares de bases (pb) de longitud (Hamann *et al.*, 1995).

Rothuizen *et al.* (1994), probaron la incidencia de mini y microsátélites repetitivos en el genoma canino, concluyeron que las repeticiones cortas en tandem de di-, tri- y tetranucleótidos, así como algunas secuencias minisatélites, pueden ser usadas potencialmente como marcadores genéticos.

2.6.5. Secuencias Simples Repetidas (SSRs)

Conocidas en español como secuencias simples repetidas (SSR: *Simple Sequence Repeat* por sus siglas en inglés) o ADN microsátélite mediante PCR (STMS: *Sequence Tagged Microsatélite Site*), también conocidos como microsátélites tales como (GA) n o (CT) n , son muy abundantes y se encuentran dispersos en el genoma de la planta (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewics *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1997; Wu y Tanksley, 1983; Kojima *et al.*, 1998). Con el uso de esta técnica se ha observado un alto nivel de polimorfismo, que deriva de diferencias en el grado de repetición de la unidad repetida dentro del microsátélite, resultando en numerosas variantes alélicas (Karp *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, Smith *et al.*, 1997).

Los SSRs comprenden secuencias de oligonucleótidos cortas (Albani y Wilkinson, 1998), se analizan mediante la amplificación *in vitro* de una región genómica corta que contiene la secuencia repetida, y la estimación del tamaño de la longitud repetida por separación en gel. Una pequeña cantidad de ADN es requerida, y es posible que el desarrollo de una tecnología automatizada para manejar RAPDs o amplificación de muestras PCR se pueda aplicar directamente a un análisis de repetición simple (Moreno *et al.*, 1997; Albani y Wilkinson, 1998). Los geles de agarosa pueden usarse para la separación de bandas, sin embargo, la resolución de todos los alelos puede requerir el uso de geles de acrilamida (Rafalski y Tingey, 1993). Son marcadores codominantes y altamente reproducibles (Karp *et al.*, 1997).

Los SSR se han desarrollado y usado para elaboración de mapas genómicos y etiquetados de ADN en diferentes especies de plantas (Morgante y Olivieri, 1993) tales como árboles tropicales (Condit y Hubbell, 1991), maíz (Tamarino y Tingey, 1996, Simth *et al.*, 1997), *Sorghum bicolor* (Taramino *et al.*, 1997), *Arabidopsis* (Westman y Kresovich, 1998).

Los minisatélites producen bajos niveles de polimorfismo. Esta técnica tiene desventaja cuando se estudia el polimorfismo intravarietal, ya que sólo deben detectarse cambios menores; además de que el diseño de los iniciadores para etiquetar el locus lleva mucho tiempo y resulta poco práctico cuando muchos loci necesitan ser explorados (Moreno *et al.*, 1998).

2.6.6. Intersecuencias Simples Repetidas (ISSRs)

Recientemente se ha descrito una novedosa técnica molecular que permite la detección de polimorfismo en loci minisatélites así como microsátélites sin el conocimiento previo de la secuencia de ADN (Wu *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1997). Se han propuesto dos nombres para esta técnica: repeticiones de secuencia simple interna (ISSR-PCR, o ISSR en inglés *Inter Simple Sequence Repeat*) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y polimorfismo de microsátélites amplificadas al azar (RAMPs *Random Amplified Microsatellite Polymorphism*) (Wu *et al.*, 1994). La técnica involucra el uso de un solo iniciador compuesto por una secuencia microsátélite más una secuencia arbitraria corta, la cual se ancla a la región microsátélite y amplifica por medio de PCR la región entre los dos SSR relacionados y opuestamente orientados (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996; Fang y Roose, 1997; Albani y Wilkinson, 1998; Moreno *et al.*, 1998).

La amplificación por ISSR puede revelar un mayor número de fragmentos por iniciador comparado con el análisis mediante RAPDs (Wolff *et al.*, 1995). Zietkiewicz *et al.*, (1994) fue el primero en usar esta tecnología para diferenciar entre individuos altamente relacionados. El análisis ISSR se ha usado para evaluar diversidad genética en maíz dentado y para rosetas (Kantely *et al.*, 1995), para identificar cultivares de crisantemo (Wolff *et al.*, 1995); abeto (Tsumura *et al.*, 1996), sorgo (Wepeng *et al.*, 1996), cítricos (Fang y Roose 1997; Fang *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Fang y Roose, 1999), trigo (Nagaoka y Ogihara, 1997), melón (Danin *et al.*,

1998), *Penstemon roseus* (Wolfe *et al.*, 1998), arroz (Blair *et al.*, 1999), *Calamagrostis* (Esselman *et al.*, 1999), grosellero (Lanhan y Brennam, 1999), Chen *et al.*, (1998), la usaron en la identificación de plantas derivadas del cultivo de anteras. Kojima *et al.*, (1998), reportan su uso en la elaboración de un mapa de linaje en trigos. Moreno *et al.*, (1998), utilizaron esta técnica para la caracterización de germoplasma de vid y no detectaron diferencias intravarietales pero encontraron polimorfismo altamente reproducible entre las dos variedades de vid probadas; Albani y Wilkinson (1998), la utilizaron para detectar variación somaclonal en papa. Por su parte Ratnaparkhe *et al.*, (1998), los usaron para etiquetar genes asociados con enfermedades de garbanzo.

Los ISSR se han propuesto como una nueva fuente de marcadores moleculares los cuales superan las limitaciones técnicas de los RFLPs y RAPDs Ratnaparkhe *et al.*, (1998). Esta tecnología provee un sistema fácil, confiable y altamente informativo para tomar huellas de ADN (Prevost y Wilkinson, 1999), Al respecto, diversos autores han comparado los ISSRs con otras técnicas moleculares. Fang *et al.*, (1997), caracterizaron accesiones de naranjo trifoliado y reportaron que mediante las isoenzimas y los RFLPs se detectó poco polimorfismo entre las diferentes accesiones; mientras que, con los ISSRs se generó un mayor número de bandas, considerando a estos más informativos. Nagaoka y Okijara (1997), evaluaron diferentes marcadores moleculares para detectar polimorfismo en trigos y mencionan que los iniciadores ISSRs producen mayor información que los RAPDs y RFLPs. En estudios de diversidad en arroz, con diferentes marcadores moleculares

Person *et al.*, (1997), reportaron un mayor polimorfismo generado a partir de unos cuantos iniciadores ISSRs en comparación con RAPDs e isoenzimas. Similar a lo reportado por Esselman *et al.*, (1999), quienes obtuvieron mejores resultados que con SSRs. Danin *et al.*, (1998), mencionan haber obtenido similares resultados que con AFLPs. Por su parte Lanham y Brennam (1999) reportan mejores niveles de polimorfismo que con AFLPs en la caracterización de grosellero.

Dadas sus características de generar altos niveles de polimorfismo, altamente informativos, fácil manejo, reproducibilidad y bajo costo en relación con otros marcadores moleculares, se consideran como marcadores ideales para el manejo de gran cantidad de accesiones, para su caracterización, identificación, o elaboración de mapas de ligamiento (Kantely *et al.*, 1995; Tsumura *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Nagaoka y Okijara, 1997; Prevost y Wilkinson, 1999). El Cuadro 2 muestra la comparación de algunas características entre marcadores genéticos moleculares.

Cuadro 2. Comparativa de marcadores genéticos moleculares.

	RFLPs	RAPDs	Microsatélites	STS
Abundancia genómica	Alto	Muy Alto	Medio	Alto
Nivel de polimorfismo	Medio	Medio	Alto	Medio
Acción génica	Codominante	Dominante	Codominante	Codominante
Cantidad de ADN requerido	2-10 ng	10-25 ng	50 – 100 ng	50 – 100 ng
Conocimiento de secuencia	No	No	Si	Si
Detección de Southern	Si	No	No	No
Costos de desarrollo	Medio	Bajo	Alto	Medio/Alto
Costos de inicio	Medio/Alto	Bajo	Alto	Alto

2.7. Caracterización convencional y biotecnológica del cultivo del aguacatero

Si los recursos fitogenéticos se conservan ya sea como semillas, *in vitro*, o como colecciones de campo, los administradores de las colecciones *ex situ* necesitan mantener la integridad de las accesiones conservadas e identificar duplicados. Se requiere caracterización para determinar la identidad de las accesiones. Todas las actividades de conservación de recursos genéticos requieren de la caracterización de la diversidad genética tanto dentro de las accesiones como entre ellas, o sea de toda la población que constituye el banco de germoplasma (Karp *et al.*, 1997).

En primera instancia esto usualmente implica la descripción de la variación de los caracteres morfológicos, particularmente de características agromorfológicas de interés directo para los usuarios. Desafortunadamente los descriptores morfológicos (incluso los bioquímicos) presentan varios inconvenientes entre los que destacan por su impacto en los resultados y costos:

- La inconsistencia de las descripciones causada por la influencia ambiental, provocando que para tener una descripción confiable sea necesario hacer dicha descripción en varios ambientes con un alto costo de recursos humanos, tiempo y económicos.
- El bajo número de descriptores, lo cual repercute en que no tienen adecuada habilidad discriminatoria, tampoco son suficientes para realizar un muestreo adecuado del genoma con el fin de tener su huella genética y de ésta manera estar en posibilidades de estimar las distancias genéticas con respecto a otras



colectas (Karp *et al.*, 1997).

Sin embargo, con el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas y consecuentemente la emergencia de tecnologías que analizan directamente el ADN ha permitido a los investigadores realizar un muestreo altamente eficiente del genoma. La información proporcionada por dichos marcadores tiene varios usos importantes, entre los que destacan: a) el conocer el grado de relación genética de los materiales y en algunas especies, permite la selección de progenitores para maximizar efectos de heterosis; b) la evaluación de pureza genética y descripción varietal con gran precisión y enorme poder de discriminación. Dichas metodologías también son útiles para la identificación de líneas o materiales que deben preservarse para maximizar la diversidad genética de un banco de germoplasma (Karp *et al.*, 1997).

Diversos marcadores moleculares de ADN como RFLPs, AFLPs, RAPDs y SSRs han sido usados en los últimos años para estudiar la diversidad genética en distintas especies, (Weising *et al.*, 1995; Guillén *et al.*, 2000). La metodología de detección de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) fue de las primeras usadas con estos objetivos, con ella pueden compararse decenas o cientos de *loci* polimórficos en varias plantas cultivadas; puede ser altamente discriminativa y dar un muestreo del genoma suficientemente amplio.

Con la implementación de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) con el fin de amplificar ADN, nuevos procedimientos basados en ella han sido

desarrollados como son: el método de detección de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Vos *et al.*, 1995) que es una poderosa técnica de marcadores de ADN concebida originalmente para construir mapas de marcadores de ADN de alta densidad. Se basa en la detección de una amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN genómico. El ADN es cortado normalmente con dos endonucleasas de restricción, una de corte raro y otra de corte frecuente; los productos de éstas digestiones se ligan a secuencias conocidas de ADN de doble cadena llamadas adaptadores, la secuencia adaptador-sitio de restricción de estos fragmentos sirve como ADN blanco para las posteriores amplificaciones. Por su confiabilidad, reproducibilidad y potencia, esta técnica se considera altamente versátil y de gran utilidad para producción de "huellas genéticas" de ADN, análisis de diversidad genética y construcción de mapas genéticos.

Otro procedimiento es mediante el polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias (RAPD; Williams *et al.*, 1990), que consiste en la amplificación de ADN genómico utilizando oligonucleótidos con una secuencia de bases en un orden al azar. Normalmente un sólo oligonucleótido es utilizado como iniciador y las regiones flanqueadas por repetidos invertidos con homología al oligonucleótido, son amplificadas de acuerdo a las condiciones normales para amplificación por PCR, por lo que fragmentos pequeños y grandes tendrán oportunidad de ser amplificados. En estos marcadores idealmente, cada uno de los fragmentos amplificados por el uso de iniciadores con una secuencia de bases aleatoria representaría un *locus* específico en el genoma y los polimorfismos detectados pueden básicamente ser el resultado de varios tipos de eventos: a) inserción de grandes fragmentos de ADN entre los dos

sitios de alineación lo que origina un fragmento muy largo provocando que se pierda; b) la delección de un fragmento de ADN que lleve uno de los dos sitios de alineación lo que provoca también su pérdida; c) la sustitución de un nucleótido que puede afectar el alineamiento de uno de los dos iniciadores por cambios en la homología lo que provoca la ausencia o presencia del polimorfismo o el cambio en el tamaño del fragmento; y d) inserción o delección de pequeños fragmentos de ADN lo que origina cambios en el tamaño del fragmento. En la práctica, sin embargo, cambios en el tamaño son raros. Un fragmento particular de RAPD está usualmente presente (alelo 'A') o ausente (alelo 'a') la cual es una distribución típica para marcadores dominantes. Un fragmento se ve únicamente cuando es homocigoto (AA) o heterocigoto (Aa), y su ausencia da a entender la presencia del genotipo (aa). Los RAPD son una técnica muy poderosa por su simplicidad, la calidad de los datos que proporciona y su aplicabilidad en cualquier genoma es especialmente útil para la identificación de variedades y monitoreo de la pureza genética.

Otra metodología es la detección de secuencias simples repetidas o cortas (SSRs) (Akkaya *et al.*, 1992; Senior y Heun, 1993). Las SSRs son secuencias de ADN que tienen una unidad núcleo de dos o cinco nucleótidos tales como (AT); (CTT) y (ATGT) las cual están repetidas en tandem y dispersas por todo el genoma. Estas pequeñas secuencias son la base del PCR ya que se utilizan iniciadores complementarios a las regiones que las flanquean, las cuales son generalmente conservadas entre genotipos de la misma especie, amplificando de esta manera los fragmentos que contienen las SSR. El polimorfismo es creado cuando los productos de PCR de diferentes individuos varían en longitud como resultado de la variación en

el número de unidades repetidas en las SSR. Varios investigadores han iniciado su desarrollo y uso en un amplio rango de especies de plantas, como por ejemplo: maíz (*Zea mays* L.), (Senior y Heaun 1993), trigo (*Triticum aestivum* L.), (Devos *et al.*, 1995) soya (*Glycine max* L.), (Akkaya *et al.*, 1992; Morgante y Olivieri, 1993), cebada (*Hordeum vulgare* L.), (Saghai-Maroo *et al.*, 1994), arroz (*Oryza sativa* L.), (Wu y Tanksley, 1993; Zhao y Rochert, 1993), aguacate (*Persea americana* Mill.), (Lavi *et al.*, 1991), y muchas otras.

En general estos nuevos métodos son igualmente eficientes para discriminar variedades y evaluar la pureza genética en distintos materiales, con la ventaja de que son mucho más rápidos que los RFLP y el uso de uno u otro depende básicamente de la especie. Además, se puede señalar que la utilización de estas técnicas que detectan polimorfismos al nivel de ADN, permite el muestreo de cientos de pseudoloci (fragmentos de ADN de peso molecular específico), posibilitando el muestreo aleatorio de una gran parte del genoma de la especie y permitiendo por tanto un estudio mucho más minucioso de la variabilidad intra e inter poblacional (Akkaya *et al.*, 1992; Senior y Heun, 1993).

El mejoramiento de los cultivos tiene tres objetivos fundamentales: el primer objetivo es manipular cruzamientos sexuales para combinar genes deseables de diferentes linajes en uno solo. El segundo objetivo es seleccionar genotipos deseables a partir de combinaciones complejas de genotipos resultados de la reproducción sexual. Y el tercer objetivo es mantener y propagar aquellas combinaciones genotípicas que son más útiles para el fitomejorador. Los marcadores

genéticos suministran valiosas herramientas para ayudar en la creación de las combinaciones genéticas deseadas, y en la identificación y selección de genotipos deseables (Clegg, 1999).

2.8. Marcadores moleculares en aguacate

El aguacate al igual que otras plantas cuenta con la presencia de metabolitos secundarios (taninos, fenoles) que inhiben la acción de enzimas y otros compuestos, adicionalmente se dificulta el aislamiento del ADN con respecto a las especies que tienen pequeñas cantidades de esos compuestos. Generalmente el ADN obtenido es de baja pureza e inmanejable para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han hecho pocos estudios biotecnológicos en aguacate en los cuales se involucra el ADN.

En un estudio hecho por Huanosto (2000); para la caracterización de tres especies de aguacate (*Persea americana*, *Persea tolimenensis* y *Persea schiedeana*), utilizando RAPDs como marcadores moleculares, se utilizaron hojas jóvenes para la extracción de ADN. Los métodos utilizados fueron el de Dellaporta *et al.*, (1983); Plant DNAzol (GIBCO) y el de CTAB, encontrándose que la cantidad de ADN que se obtuvo fue de baja calidad y cantidad.

Clegg *et al.*, (1999), mencionan la comparación de tres técnicas de marcadores moleculares ISSRs, RAPDs y RFLPs para la identificación de genotipos

en aguacate de la variedad 'Bacon', 'Fuerte' y 'Zutano'. Para este trabajo se aisló ADN de embriones de las variedades mencionadas usando una modificación del método de extracción de Rawson *et al.*, (1982); descrito por Kobayashi *et al.*, (2000).

Sharon *et al.*, (1997); utilizaron marcadores moleculares como: RAPDs y SSR para construir un mapa genético con los cultivares de aguacate 'Pinkerton' y 'Ettinger'. La extracción de ADN la realizaron con hojas jóvenes, utilizando el método de Murray y Thompson, (1980); con modificaciones descritas por Lavi *et al.*, (1991).

Los marcadores *ISTR* (*Inverse Sequence-Tagged Repeat*) demostraron su eficiencia en la detección del polimorfismo existente entre los diferentes genotipos. Los valores de disimilitud obtenidos oscilaron desde 0.24 entre las variedades 'Suardía' y 'Hass' hasta 1.00 entre las variedades 'Lula' y 'Los Moros' o 'CHI-3' con un promedio de disimilitud de 0.78. La eficiencia del *UPGMA* para estimar las relaciones genéticas entre las variedades fue corroborada mediante el coeficiente de correlación cofenética, el cual indicó que el grado de distorsión en los estimados de disimilitud fue mínimo. Los grupos ecológicos no estuvieron representados adecuadamente en el dendrograma, de forma tal que los genotipos antillanos, guatemaltecos y mexicanos, se distribuyeron indistintamente en él. Se discute la utilidad de los marcadores *ISTR* para la identificación de genotipos y estimación de la diversidad genética entre las variedades comerciales de aguacate (Ramírez *et al.*, 2002).

Las correlaciones entre los datos fenotípicos, AFLP y microsatélites, sugieren la conveniencia de usar estimados de distancias genéticas basado en sistemas de marcadores de ADN como un indicativo de la diversidad fenotípica en variedades de aguacatero (Fuentes *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Determinación del protocolo de aislamiento de ADN genómico de aguacate

3.1.1. Material genético

El material vegetativo utilizado fue colectado del Banco de Germoplasma del Campo Experimental (INIFAP) de la Ciudad de Uruapan, Michoacán. Se seleccionaron cinco individuos de cada una de las razas: Antillana, Mexicana y Guatemalteca, las colectas utilizadas se indican en el Cuadro 3. De las 15 plantas en selección se cortó una hoja de cada una de ellas, eliminando la nervadura central con la ayuda de tijeras; posteriormente, cada una se colocó en bolsas de glaciene debidamente marcadas e identificadas para su procesamiento en el laboratorio.

Cuadro 3. Colectas de aguacate criollo utilizadas en las extracciones de ADN.

Raza					
Mexicana		Antillana		Guatemalteca	
1.	681-04	6.	659-02	11.	670-06
2.	681-03	7.	660-01	12.	670-05
3.	681-02	8.	661-04	13.	670-03
4.	681-01	9.	661-03	14.	670-01
5.	680-02	10.	661-01	15.	674-01

3.1.2. Protocolos de aislamiento de ADN

En el presente trabajo de investigación se probaron cinco protocolos de aislamiento de ADN genómico: Clarke *et al.*, (1989), Istvan-Nagy *et al.*, (1998) Modificado, Dellaporta *et al.*, (1983), Saghai- Maroof *et al.*, (1984) y el método de

Clarke *et al.*, (1989) modificado en el laboratorio de biotecnología (INIFAP, Uruapan).

Todos los protocolos indicados se han utilizado con éxito en diferentes especies vegetales a excepción del de Clarke *et al.*, (1989) modificado.

En todos los procedimientos de aislamiento de ADN se estandarizó la cantidad de tejido foliar utilizado. Con excepción del método propuesto por Saghai-Marroof *et al.*, (1984) el tejido foliar fue colectado el día previo a su procesamiento y se almacenó a una temperatura de -20 °C. A continuación se describe cada uno de los protocolos probados.

3.1.2.1. Protocolo propuesto por Clarke *et al.*, (1989).

1. Se colectan de 2 a 3 segmentos de hojas (10 cm, c/uno) jóvenes por muestra (200 mg) y se colocan en tubos de plástico de 2.0 ml o en bolsas de glacine. Almacenar inmediatamente en una hielera para su transporte al laboratorio.
2. Obtener la savia de cada muestra con ayuda del extractor agregando 1.0 ml de la solución extractora. Agua bidesionizada (ddH₂O), Cloruro de Sodio (NaCl), Trizma-base (Tris), Ácido Etilenediamino-Tetracético de Sodio Dihidratado (EDTA), Poli-Vinil Pirrolidona (PVP), Bromuro de Hexadecil-Trimetil-Amonio (CTAB), Beta Mercapto-Etanol (BME), las cantidades empleadas, se describen en el Cuadro 4.
3. Incubar el extracto en un horno a una temperatura de 65 °C durante 30 min. Agitar suavemente cada 15 min. Posteriormente se destapan los tubos y se dejan enfriar durante 5 min.

4. Agregar 1.0 mL de la mezcla cloroformo:octanol (24:1). Mezclar suavemente de 5 a 10 min. Centrifugar a 3200 rpm por 10 min.

5. Transferir 600 μ L de la fracción acuosa a tubos Eppendorf nuevos de 2.0 mL. Agregar 15 μ L de RNAsa (10mg/mL) e incubar durante 15 min.

Se recomienda hervir la RNAsa durante 10 minutos previo uso

6. Agregar 500 μ L de la mezcla fenol:cloroformo (1:1) mezclar suavemente de 5 a 10 min posteriormente centrifugar durante 10 min a 3200 rpm. Transferir la fase acuosa (500 μ L) a tubos nuevos.

Preparar la mezcla de fenol:cloroformo previo a su uso.

7. Agregar 750 μ L de etanol absoluto completamente frío. Colocar los tubos a -80°C por 30 min y centrifugar de 5 a 10 min a 3200 rpm.

8. Decantar el etanol y lavar la pastilla con 500 μ L de etanol al 70 %, centrifugar de 5 a 10 min a 3200 rpm.

9. Decantar el etanol (70 %) y secar los tubos invirtiéndolos durante 30 min, resuspender sobre 500 μ L de solución Tris y EDTA (TE) frío.

Cuadro 4. Componentes de reacción de la solución extractora en el protocolo descrito por Clarke *et al.*, (1989).

Componente	Concentración final	20 mL	100 mL
ddH ₂ O		3.4 mL	10 mL
5000 mM NaCl	2100 mM	8.4 mL	13 mL
1000 mM Tris [†]	100 mM	2.0 mL	42 mL
500 mM EDTA [†]	150 mM	6.0 mL	30 mL
PVP	2.0 %	0.4 g	2.0 g
CTAB	2.0 %	0.4 g	2.0 g
14000 mM BME	140 mM	0.2 mL	1 mL

[†] pH 8.0

3.1.2.2. Protocolo propuesto por Istvan Nagy et al., (1998).

- 1.** Colectar 3.5 cm² de tejido foliar fresco sin nervadura. Transferir la muestra a un mortero, adicionar nitrógeno líquido y moler hasta obtener un polvo fino.
- 2.** Transferir el tejido foliar molido a un tubo Eppendorf de 2.0 mL. Agregar 1.0 mL de la solución de extracción, Agua desionizada (dH₂O), Cloruro de Sodio (NaCl), Trizma-base (Tris), Ácido Etilenediamino-Tetracético de Sodio Dihidratado (EDTA), Poli-Vinil Pirrolidona (PVP), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Beta Mercapto-Etanol (BME), las cantidades empleadas se describen en el Cuadro 5, tapar los tubos y mezclar suavemente durante 15 min hasta incorporar perfectamente la solución con la muestra de tejido foliar.
- 3.** Adicionar 450 µL de fenol equilibrado, posteriormente agregar 450 µL de la mezcla cloroformo:alcohol isoamilico (24:1) y agitar suavemente durante 10 min.
- 4.** Centrifugar por 10 min a 12,000 rpm. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos Eppendorf y agregar 500 µL de isopropanol.
- 5.** Dejar precipitar durante 10 min a temperatura ambiente, agitando mediante inversión suave.
- 6.** Centrifugar 10 min a 12,000 rpm y eliminar el sobrenadante. Lavar la pastilla con 500 µL de etanol frío al 70 %.
- 7.** Centrifugar a 12,000 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y dejar secar la pastilla durante 10 min.
- 8.** Resuspender la pastilla de ADN en 100 µL de solución Tris y EDTA (TE).

Cuadro 5. Componentes de reacción del amortiguador utilizado en el protocolo descrito por Istvan Nagy *et al.*, (1998).

Componente	Concentración final	20 mL	100 mL
dH ₂ O		11 mL	53 mL
1000 mM Tris ¹	100 mM	2.0 mL	10 mL
5000 mM NaCl	500 mM	2.0 mL	10 mL
500 mM EDTA ¹	50 mM	2.0 mL	10 mL
SDS	3.0 %	3.0 mL (20 %)	15 mL (20 %)
PVP	1.0 %	0.2 g	1 g
14000 mM BME	10 mM	0.014 mL	0.070 mL

¹pH 8.0

3.1.2.3. Protocolo propuesto por Dellaporta *et al.*, (1983).

1. Macerar 200 mg de tejido foliar fresco en un mortero, adicionando nitrógeno líquido. Transferir el tejido molido a un tubo de plástico de 2.0 mL y agregar 1.0 mL de la solución de extracción. Agua bidesionizada (dH₂O), Cloruro de Sodio (NaCl), Trizma-base (Tris), Ácido Etilenediamino-Tetracético de Sodio Dihidratado (EDTA), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Beta Mercapto-Etanol (BME), las cantidades empleadas, se describen en el Cuadro 6.
2. Incubar a 65 °C por 15 min en baño María. Agregar 800 µL de acetato de potasio 5000 mM. Mezclar suavemente por inversión e incubar por 60 min manteniendo los tubos en hielo. Centrifugar durante 30 min a 4000 rpm, de 4 a 10 °C.
3. Transferir el sobrenadante a otro tubo de plástico de 2.0 mL y adicionarle 1.0 mL de isopropanol frío, mezclar ligeramente por inversión e incubar a -20 °C, de 30 a 60 min.

4. Con un gancho de vidrio transferir el ADN a un tubo nuevo Eppendorf de 2.0 mL. Agregar 35 μ L de solución Tris y EDTA (TE).
5. Agregar 2 μ L de RNAsa (10 mg mL⁻¹) e incubar a 37 °C, durante 1 h. Detener la reacción con 37 μ L de acetato de sodio 3000 mM y 250 μ L de isopropanol frío, incubar a -20 °C durante 2 h.
6. Colectar y transferir el ADN a un nuevo tubo Eppendorf de 2.0 mL con un gancho de vidrio, lavarlo con etanol al 80 %, decantar el etanol y esperar hasta que se evapore totalmente. Resuspender el ADN en 50 μ L de amortiguador Tris y EDTA (TE) y almacenar las muestras de ADN a 4 °C hasta su uso.

Cuadro 6. Componentes de reacción de la solución extractora utilizada en el protocolo descrito por Dellaporta *et al.*, (1983).

Componente	Concentración final	20 mL	100 mL
ddH ₂ O		13.24 mL	66.7
1000 mM Tris ¹	100 mM	2.0 mL	10 mL
5000 mM NaCl	500 mM	2.0 mL	10 mL
500 mM EDTA ¹	50 mM	2.0 mL	10 mL
SDS	1.3 %	2.6 mL (10 %)	13 mL (10 %)
14000 mM BME	2.0 %	0.040 mL	0.200 mL

¹pH 8.0

3.1.2.4. Protocolo propuesto por Saghai-Marooof *et al.*, (1984), modificado por Hoisington *et al.*, (1994).

1. Utilizar hojas de plantas cultivadas en campo o invernadero y es recomendable procesar hojas jóvenes con ausencia de áreas necróticas y sin lesiones producidas por plagas y enfermedades. En el caso de que las hojas presenten nervadura central gruesa, eliminarla.

2. Cortar las hojas en secciones y colocarlas en bolsas de malla de fibra de vidrio (10 x 15 cm). Dentro de la bolsa incluir una etiqueta de identificación de la muestra. Adicionar nitrógeno líquido y colocar las muestras inmediatamente en el liofilizador por 96 h.
3. Transcurridas las 96 horas, sacar las muestras del liofilizador y moler las muestras de tejido foliar en un mortero hasta lograr un polvo fino. Posteriormente colocar aproximadamente 1.0 mL de tejido en un tubo nuevo Eppendorf de 15.0 mL.
4. Agregar 4.0 mL de solución extractora. Agua desionizada (ddH₂O), Cloruro de Sodio (NaCl), Trizma-base (Tris), Ácido Etilenediamino-Tetracético de Sodio Dihidratado (EDTA), Poli-Vinil Pirrolidona (PVP), Bromuro de Hexadecil-Trimetil-Amonio (CTAB), Beta Mercapto-Etanol (BME), las cantidades empleadas, se describen en el Cuadro 7 (precalentada a 65 °C) al tubo que contiene el tejido molido. Para evitar que el tejido se compacte, es mejor distribuirlo sobre las paredes laterales del tubo antes de agregar la solución amortiguadora. Mezclar con suavidad invirtiendo el tubo varias veces.
5. Incubar durante 90 min en un horno a 65 °C, agitando los tubos continuamente con suavidad.
6. Retirar del horno los tubos, esperar 5 min para que se enfríe la solución y agregar 4.0 mL de cloroformo:octanol (24:1). Agite suavemente los tubos de 5 a 10 min.
7. Centrifugar durante 10 min a 3200 rpm a temperatura ambiente.
8. Vertir la capa acuosa superior en tubos nuevos Eppendorf de 15.0 mL. Agregar 4.0 mL de cloroformo:octanol y agitar suavemente de 5 a 10 min. Centrifugar durante 10 min a 3200 rpm a temperatura ambiente.

9. Con una pipeta, trasladar la capa superior acuosa a tubos nuevos de 15.0 mL que contengan 30 μL de 10 mg mL^{-1} de RNAsa A, mezclar invirtiendo con suavidad los tubos e incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
10. Agregar 4.0 mL de isopropanol, cuidando que este se encuentre frío. Mezclar invirtiendo los tubos con suavidad.
11. Con un gancho de vidrio trasladar el ADN a nuevos tubos de 2.0 mL y resuspender el ADN en 500 μL de solución Tris y EDTA (TE).

Cuadro 7. Componentes de reacción de la solución extractora utilizada en el protocolo descrito por Saghai-Marroof *et al.*, (1984), modificado por Hoisington *et al.*, (1994).

Componente	Concentración final	100 mL	400 mL
dH ₂ O		17.0 mL	68.0 mL
1000 mM Tris ¹	100 mM	10.0 mL	40.0 mL
5000 mM NaCl	700 mM	42.0 mL	168.0 mL
500 mM EDTA ²	50 mM	30.0 mL	120.0 mL
PVP	2.0 %	2.0 g	8.0 g
CTAB	3.0 %	3.0 g	12.0 g
14000 mM BME	140 mM	1.0 mL	4.0 mL

¹pH 7.5, ²pH 8.0

3.1.2.5. Protocolo propuesto por Clarke *et al.*, (1989) modificado en el laboratorio de biotecnología (INIFAP, Uruapan).

1. Se colectan de dos a tres segmentos de hojas (10 cm, c/uno) jóvenes por muestra (200 mg) y se colocan en tubos de plástico Eppendorf de 2.0 mL o en bolsas de glaciene. Las muestras se almacenan en una hielera mientras se transportan al laboratorio.

2. En un mortero se muelen las muestras adicionando nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino y se agrega 1.0 mL de la solución extractora. Agua desionizada (ddH_2O), Cloruro de Sodio (NaCl), Trizma-base (Tris), Ácido Etilenediamino-Tetracético de Sodio Dihidratado (EDTA), Poli-Vinil Pirrolidona (PVP), Bromuro de Hexadecil-Trimetil-Amonio (CTAB), Beta Mercapto-Etanol (BME), las cantidades empleadas, se describen en el Cuadro 8.
3. Incubar el extracto en el horno a $65\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 min. Agitar suavemente cada 15 min posteriormente se destapan los tubos y se dejan enfriar durante 5 min.
4. Agregar 1.0 mL de la mezcla cloroformo:octanol (24:1). Mezclar suavemente de 5 a 10 min y centrifugar a 3200 rpm por 10 min.
5. Transferir 600 μL de la fracción acuosa a tubos nuevos Eppendorf de 2.0 mL.
6. Agregar 500 μL de la mezcla cloroformo:octanol (24:1), mezclar suavemente de 5 a 10 min, posteriormente centrifugar durante 10 min a 3200 rpm. Transferir la fase acuosa (500 μL) a tubos nuevos.
7. Agregar 15 μL de RNAsa (10 $\text{mg}/\mu\text{L}$) e incubar durante 30 min a $37\text{ }^\circ\text{C}$
Se recomienda hervir la RNAsa durante 10 minutos previo uso
8. Agregar 75 μL de 5 M NaCl y 750 μL de etanol absoluto frío. Colocar los tubos a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, centrifugar durante 15 min a 3200 rpm.
9. Decantar el etanol y NaCl , secar invirtiendo los tubos durante 30 min. Resuspender sobre 150 μL de solución Tris y EDTA (TE) y almacenar la muestra de ADN a $4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

A veces es necesario utilizar pañuelos faciales para secar completamente los tubos.

Cuadro 8. Componentes de reacción de la solución extractora utilizada en el protocolo descrito por Clarke *et al.*, (1989), modificado en el laboratorio de Biotecnología (INIFAP, Uruapan).

Componente	Concentración final	20 mL	100 mL
dH ₂ O		3.4 mL	17.0 mL
1000 mM Tris ¹	100 mM	2.0 mL	10.0 mL
5000 mM NaCl	2100 mM	8.4 mL	42.0 mL
500 mM EDTA ¹	150 mM	6.0 mL	30.0 mL
CTAB	4.0 %	0.8 g	4.0 g
PVP	4.0 %	0.8 g	4.0 g
14000 mM BME	140 mM	0.200 mL	1.0 mL
pH 8.0			

3.2. Colecta del material vegetal

En esta fase de investigación se colectaron muestras de 231 accesiones de aguacate *Persea americana* raza mexicana, existentes en el Banco de Germoplasma del Campo Experimental de Uruapan; Michoacán. De cada colecta se tomaron tres segmentos de 10 cm de longitud de hojas jóvenes y visiblemente sanas, las hojas se guardaron en bolsas de glacyne, se etiquetaron e inmediatamente fueron almacenadas en hielo; para su posterior traslado al laboratorio de marcadores genéticos moleculares (LAMAGEM) del campo experimental CEFAP del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Uruapan, Michoacán. En la Figura 1 se muestran los sitios de procedencia de las colectas y en el Cuadro 9, se indican los materiales colectados y clasificados para la investigación.

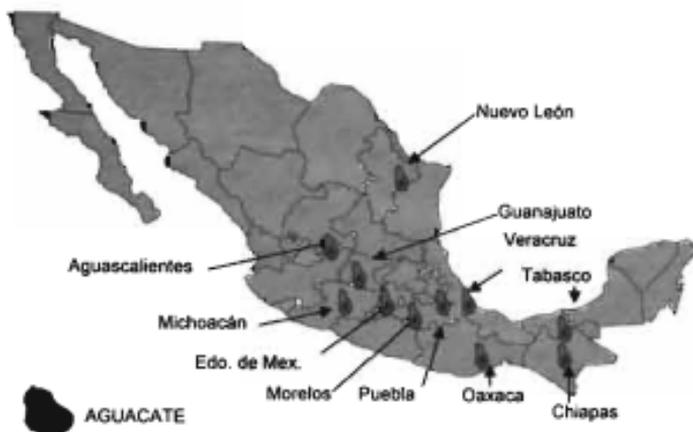


Figura 1. Ubicación de los sitios de procedencia de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) raza mexicana.

Cuadro 9. Identificación de los sitios de las 77 colectas de aguacate (*Persea americana* Mill.) raza mexicana

No.	Id.	Localidad	Mun/Edo	No.	Id.	Localidad	Mun/Edo
1	257	Atlixco	Atlixco, Pue.	40	542	Santa Cruz	San Vicente Coyula, Pue.
2	247	San Pablo Etla	San Pablo Etla, Oax.	41	543	Santa Cruz	San Vicente Coyula, Pue.
3	305	Huachuclingo	Huachuclingo, Pue.	42	546	Tototepac	Tototepac, Pue.
4	308	Chiconauhtla	Huachuclingo, Pue.	43	551	Ocotlán	Ocotlán, Oax.
5	314	San Miguel	Zacatlán, Pue.	44	563	Patabán	Tanganicouaro, Mich.
6	315	San Miguel	Zacatlán, Pue.	45	588	Puebla	Puebla, Pue.
7	320	Ahuacatlán	Ahuacatlán, Pue.	46	632	Aramberí	Aramberí, N.L.
8	321	Xalacapán	Zacapoxtla, Pue.	47	633	Aramberí	Aramberí, N.L.
9	322	Xalacapán	Zacapoxtla, Pue.	48	635	Aramberí	Aramberí, N.L.
10	326	San Juan Telexco	Teztlután, Pue.	49	640	San Felipe de Los	Zitácuaro, Mich.
11	327	San Sebastián	Teztlután, Pue.	50	642	Santa María P.	Valle de Bravo, Mex.
12	331	Jalacingo	Jalacingo, Ver.	51	643	Tenancingo	Tenancingo, Mex.
13	332	Jalacingo	Jalacingo, Ver.	52	644	Tenancingo	Tenancingo, Mex.
14	334	Atlixongo	Atlixongo, Ver.	53	645	San José Tenorio	Tenancingo, Mex.
15	336	Atlixongo	Atlixongo, Ver.	54	646	Malinalco	Malinalco, Mex.
16	337	Atlixongo	Atlixongo, Ver.	55	647	Ozumba	Ozumba de Zárate, Mex.
17	356	AguaCalientes	AguaCalientes, Aps.	56	648	Tetela del Volcán	Tetela del Volcán, Mor.
18	362	Cañada	Chichota, Méch.	57	649	Tepeaccolula	Tepeaccolula, Oax.
19	369	Cañada	Chichota, Méch.	58	650	Achiutla	San Juan Achiutla, Oax.
20	370	Cañada	Chichota, Méch.	59	652	San Pablo Etla	San Pablo Etla, Oax.
21	371	Cañada	Chichota, Méch.	60	666	San Pedro Chens	Chenatho, Chis.
22	435	Comonfort	Comonfort, Glo.	61	667	San Juan Chamul	Chamela, Chis.
23	508	Valle de Bravo	Valle de Bravo, Mex.	62	667	San Juan Chamul	Chamela, Chis.
24	508	Tepeicatltepec	Tenancingo, Mex.	63	670	Huixtán	Huixtán, Chis.
25	509	Tecomatlán	Tenancingo, Mex.	64	677	Carapan	Chichota, Mich.
26	511	Acazingo	Tenancingo, Mex.	65	678	Carapan	Chichota, Mich.
27	513	Malinalco	Malinalco, Mex.	66	679	Carapan	Chichota, Mich.
28	514	Malinalco	Malinalco, Mex.	67	680	Tingambato	Tingambato, Mich.
29	518	Tetela del Volcán	Tetela del Volcán, Mor.	68	681	Unupan	Unupan, Mich.
30	519	Tlatema	Ozumba de Zárate, Mex.	69	687	El Diez	Tuxtla Chico, Chis.
31	520	Tlatema	Ozumba de Zárate, Mex.	70	690	El Diez	Tuxtla Chico, Chis.
32	524	Comonfort	Comonfort, Glo.	71	724	La Motoquilla	Avarado, Ver.
33	525	Comonfort	Comonfort, Glo.	72	725	La Motoquilla	Avarado, Ver.
34	532	Atlixco	Atlixco, Pue.	73	728	Cunduacán	Cunduacán, Tab.
35	533	Atlixco	Atlixco, Pue.	74	729	Cunduacán	Cunduacán, Tab.
36	534	Atlixco	Atlixco, Pue.	75	740	Tacambaro	Tacambaro, Mich.
37	535	Atlixco	Atlixco, Pue.	76	XTCO1	Unupan	Unupan, Mich.
38	538	Mariscala	Tepeal de Rguez., Pue.	77	XTR02	Unupan	Unupan, Mich.
39	541	Xalostepac	Tepeal de Rguez., Pue.				

3.3. Cuantificación del ADN

El ADN aislado fue cuantificado en un espectrofotómetro (DR/4000 U HACH™), utilizando 40 µL de ADN más 1960 µL de solución TE (relación 1:50) por muestra, registrándose las lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros

para estimar la proporción de absorbancia (260/280). La concentración del ADN de cada una de las muestras fue determinada de acuerdo a la siguiente relación.

$$[\text{ADN } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}] = [(\text{ABS } 260) (50) (50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1})/1000]$$

Donde:

$[\text{ADN } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}]$ = Concentración del ADN en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$

ABS 260 = Longitud de onda que mide el espectrofotómetro en nanómetros

50 = Factor de dilución (relación 1:50)

$50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ = Cantidad de ADN cuando el valor de absorbancia es de 1.0

1000 = Factor para llevar la concentración de AND a $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$

Finalmente se prepara un gel para verificar la calidad del ADN.

3.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles para determinar cualitativamente la calidad del ADN se hicieron disolviendo 1.4 g de agarosa ultra pura (GIBCO, BRL™) en 200 ml (0.7 %) de amortiguador TAE 1X, utilizando una cámara de electroforesis horizontal Maxicell EC360M™. La alícuota de carga incluyó 3 μL de azul de bromofenol (5X SGB) y 2 μL de cada muestra de ADN. Finalmente se colocaron 4 μL del marcador molecular λ (25 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) como marcador estándar. El gel se corrió a 60 voltios por un tiempo de 1.30 horas, posteriormente, el ADN se ajustó a una concentración de 20 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para finalmente ser almacenado a -20 °C y continuar con las determinaciones.

3.5. Caracterización genética por ISSRs

3.5.1. Iniciadores

Para detectar las diferencias a nivel de ADN entre los genotipos muestra se utilizaron secuencias del tipo ISSRs, el número y características de las secuencias iniciadoras de cada tipo de marcador se presentan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. ISSRs utilizadas en la caracterización de colectas de aguacate (*Persea americana* Mill.) de la raza mexicana.

Número	Identificación	Iniciador ¹
1	Agubanuru03-6	HVH(CA) ₇ T
2	Agubanuru03-22	(CT) ₈ RC
3	Agubanuru03-31	(AG) ₈ G
4	Agubanuru03-32	(CA) ₈ ^a
5	Agubanuru03-34	(GA) ₈ C
6	Agubanuru03-35	(AG) ₈ C
7	Agubanuru03-36	(AG) ₈ T

¹La temperatura de alineamiento fue de 52 °C

3.5.2. Condiciones de amplificación

3.5.2.1. Mezcla de reacción

El volumen total de reacción fue de 20 µL, y estuvo constituido por los componentes desglosados en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de ADN de colectas de aguacate (*Persea americana* Mill.) raza mexicana, mediante ISSRs.

Componente	Concentración final	Volumen total
Volumen final	-	20 μ L
ddH ₂ O	9.3 μ L	9.3 μ L
Amortiguador de Taq	1X	2.2 μ L
MgCl ₂	2mM	0.8 μ L
Mezcla dNTPs	187 μ L	1.5 μ L
Enzima Taq	1 U	0.2 μ L
Iniciador	1.0 μ M	2.0 μ L
ADN Templado	40 ng	4.0 μ L

3.5.2.2. Programa de amplificación

Para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usó el termociclador MJ Research DNA Engine Tetrad[®], enfriado por agua. El programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de amplificación de 94 °C por 4 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min para separar, 52 °C por 1 min de alineación, y 72 °C por 2 min de extensión; y un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min (Figura 2).

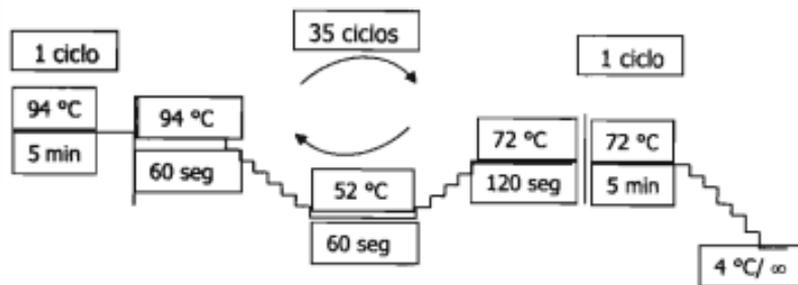


Figura 2. Programa de amplificación utilizado con muestras de ADN de las colectas de aguacate y secuencias iniciadoras del tipo ISSRs.

3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

3.6.1. Montaje del sistema Sequi-Gen

Se utilizaron sistemas de electroforesis vertical (Sequi-Gen[®] GT Sequencing Cell BIO-RAD), el primer paso fue limpiar las placas de vidrio varias veces con dH₂O y alcohol de caña al 96 %. Después de haber limpiado meticulosamente las placas, se procedió a preparar las soluciones adherente y repelente. Placa corta (solución adherente). La solución adherente se preparó con 950 µL de EtOH, 40 µL de dH₂O, 5 µL de CH₃ COOH y 5 µL de Bind-Silane; se hizo una sola mezcla de estos reactivos y se distribuyó uniformemente sobre toda la superficie de la placa, transcurridos un par de minutos se eliminaron los excesos con pañuelos faciales impregnados con alcohol de caña al 96 %. Placa larga (solución repelente). Se tomaron 1000 µL de Sigmacote, de igual manera se distribuyó sobre la superficie de la placa y se dejó transcurrir un par de minutos y después se eliminaron los excesos con pañuelos faciales impregnados con alcohol de caña al 96 %.

Después de haber vertido las soluciones, se procedió al montaje del sistema, sobre la placa corta se colocaron los espaciadores de aproximadamente 0.8 mm de grosor, y se colocó encima la placa larga, ajustándose ambas placas con los brazos sujetadores, y colocando la base para que la poliacrilamida no se fugara. Se preparó el gel hasta que el sistema fue montado, se vació la poliacrilamida entre las dos placas cuidando que no se formaran burbujas, ya que estas no permitirían el buen corrimiento de las muestras, se insertó el peine en posición invertida entre las placas, con la finalidad de formar un solo pozo a lo largo de toda la parte superior del gel, en donde al polimerizar se volteó el peine para formar el número requerido de pozos, la polimerización tardó aproximadamente 45 min.

3.6.2. Preparación de geles de poliacrilamida al 6 %

La separación de los amplicones se hizo en geles de poliacrilamida (37.5:1) al 6 % en sistemas verticales de electroforesis de 38 x 50 cm, Sequio-Gen GT (BIO-RAD®). La solución amortiguadora TBE 1X (0.09M Tris-Ácido bórico y 2 mM de EDTA). Se utilizaron como catalizadores de la polimerización persulfato de amonio al 25 % hasta obtener una concentración final de 0.028 % y 0.11 % de TEMED®. Esta solución se debe mezclar perfectamente antes de verterse. Por cada 20 µL de amplificación se agregaron 5 µL del colorante 5X SGB-XVC (M Tris pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0, 25% sucrosa, BPB 2 mg ml⁻¹, XC 2 mg ml⁻¹) y se cargaron 7 µL aproximadamente de los amplicados y se corrieron a 120 W durante 3 h.

Cuadro 12. Componentes de reacción para la preparación de geles de poliacrilamida para la separación de amplicones de tipo ISSRs.

Componente	Concentración final	90 mL
dH ₂ O	-	67.5 mL
TBE (10X)	1X	9.0 mL
Poliacrilamida 37.5:1 (40 %)	6 %	13.5 mL
APS (25 %)	0.028 %	100 µL
TEMED® (100 %)	0.11 %	100 µL

3.7. Identificación de fragmentos amplificados

La detección de los fragmentos amplificados se hizo mediante tinción con nitrato de plata, el procedimiento utilizado se describe a continuación: en una charola conteniendo 2.0 L de solución fijadora (1790 mL de dH₂O, 10 mL de CH₃ COOH mL de EtOH), se sumergió la placa corta, con el gel adherido, durante 15 min. En agitación suave y constante. Se recuperó la solución para volverse a usar en el paso final de la detección.

Se agregan 2 L de la solución de nitrato de plata (2 L dH₂O más 4 g AgNO₃) a la charola conteniendo el gel. La incubación se hizo durante 15 min. En agitación suave y constante, se recupera dicha solución, y se conserva a temperatura ambiente y protegiéndola contra la luz. Posteriormente el gel se enjuaga rápidamente con agua destilada con la finalidad de eliminar los excesos de nitrato de plata.

En seguida se realizó un lavado con 2.0 L de la solución reveladora (2.0 L de H_2O más 60 g de NaOH) agregándola justo antes de usarse el formaldehído en solución al 37 % éste último necesario para obtener una concentración final del 0.0925 %. En este paso se recomienda realizar la agitación a una velocidad mayor con la finalidad de evitar la formación de "manchas" en el gel. El tiempo de duración en este paso es variable de acuerdo a los resultados esperados aproximadamente 8 min, finalmente se enjuaga el gel con la solución fijadora recuperada y de esta manera detener la reacción.

Los geles se conservaron en los cristales, se utilizó el programa de fotografías Kodak Digital Science ID para obtener una imagen digitalizada y capturar la información necesaria en una base de datos.

3.8. Análisis de datos moleculares

3.8.1. Captura y verificación de datos moleculares

Para cada colecta se determinó el número de bandas (*i.e* alelos) visualizados en los geles de poliacrilamida por cada iniciador (*i.e* locus microsatélite), así como el registro del grado de polimorfismo detectado para cada línea analizada, generándose con esto una matriz binaria, en donde la ausencia de bandas se registró con un valor de 0 (cero) y la presencia como 1 (uno). Toda la información de los datos moleculares fue capturada y verificada mediante el programa HyperMapData descrito por Hoisington (1983).

Los resultados sobre el contenido de información de polimorfismo (PIC), se obtuvieron de acuerdo a la siguiente relación:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia de i^{th} alelo para el individuo p .

3.8.2.- Relaciones de parentesco

A partir de la matriz binaria; en donde se tradujo como 1 (uno) a la presencia de la banda y 0 (cero) a la ausencia, se calculó el coeficiente de similitud genética con ayuda del paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYS-PC), versión 2.02 (Rohlf, 1993). El cálculo de las distancias genéticas se hizo con ayuda del programa para datos genéticos SIMGEND. Los dendogramas fueron construidos por el método secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento de anidamientos (SAHN Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering Method).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Calidad y cantidad de ADN

En los protocolos probados para la obtención de ADN, con excepción del descrito por Clarke *et al.*, (1989), el tejido foliar fue sometido a un tratamiento con nitrógeno líquido y el molido del tejido se llevó a cabo mediante un mortero, en el caso del protocolo antes indicado se utilizó un extractor de savia marca MEKU™. A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de los procedimientos empleados en las muestras de tejido foliar de las 15 colectas de aguacate pertenecientes a tres razas: Mexicana, Antillana y la Guatemalteca.

4.1.2. Protocolo propuesto por Clarke *et al.*, (1989)

El ADN obtenido con este procedimiento resultó ser de mala calidad y mínima cantidad, esto en relación a los 100 ng de ADN del fago lambda (λ) utilizado como referencia.

Aunque este procedimiento se ha utilizado con éxito en algunas especies como el frijol y el maíz. En tejido foliar de aguacate no se obtienen resultados similares, un factor determinante para la no obtención de ADN de buena calidad es que el tejido foliar no se congela con nitrógeno líquido, la savia obtenida mediante un extractor es susceptible de una rápida oxidación por compuestos fenólicos presentes en el tejido foliar de aguacate, además de que en éste procedimiento no se incluye la PVP (Poli-Vinil Pirrolidona) el cual es útil en prevenir la oxidación. En la Figura 3, el

ADN se observa como un barrido, tal y como si el ADN fuera sometido a una digestión con enzimas de restricción.

4.1.3. Protocolo propuesto por Istvan Nagy *et al.*, (1998)

Con este procedimiento no se pudo obtener ADN, tal y como se observa en la Figura 4, solamente se puede observar ARN. Las condiciones en las que se maneja la solución extractora a temperatura ambiente impiden que los compuestos utilizados se mezclen con el tejido de aguacate, la temperatura de 65 °C, no solo favorece el mezclado entre la solución y el tejido, sino que interviene para que la solución extractora provoque lisis en la célula y de esta forma poder lograr el aislamiento de los ácidos nucleicos.

4.1.4. Protocolo propuesto por Dellaporta *et al.*, (1983)

Con este procedimiento, al igual que en el método anterior (Nagy *et al.*, 1998), no se obtuvo ADN en ninguna de las colectas de aguacate criollo, donde los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 5. Una de las observaciones que se hicieron fue que el tiempo empleado (15 minutos) en la incubación a 65 °C es muy corto e insuficiente para que los ácidos nucleicos sean liberados completamente de la célula, otro factor que probablemente limitó la no obtención de ADN, es la ausencia de PVP en la solución extractora, sin este reactivo la oxidación del tejido es muy severa, aún después de estar ya mezclado con la solución.

4.1.5. Protocolo propuesto por Saghai Maroof *et al.*, (1984)

Con este procedimiento, modificado por Hoisington *et al.*, (1994), se obtuvo ADN de buena calidad aunque no en suficiente cantidad como se muestra en la Figura 6, esto en función a los 100 ng de ADN del marcador lambda (λ) que se utilizó como referencia. La diferencia básica de este procedimiento en relación a todos los anteriores radica en el pretratamiento a que es sometido el tejido foliar antes de iniciar el procedimiento de extracción. El pretratamiento consiste en que el tejido foliar es congelado con nitrógeno líquido, liofilizado y molido. Este pre tratamiento permite mantener la estructura celular intacta, y por ende los ácidos nucleicos, por largos periodos a una temperatura de aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en cuanto a la viabilidad para utilizarlo en estudios en aguacate en donde se requieren grandes cantidades de ADN, esta metodología presenta la ventaja adicional que se llegan a obtener rendimientos de hasta $400\text{ }\mu\text{g}$ de ADN partiendo de aproximadamente 400 mg de tejido foliar de maíz y de trigo (Hoisington *et al.*, 1994). En la Figura 6 observa una mínima cantidad de ADN obtenido de cada una de las muestras de tejido foliar de las 15 colectas sujetas al análisis, y no se obtuvieron los resultados reportados por Hoisington *et al.*, (1994), una de las posibles explicaciones de lo anterior es que el tejido foliar utilizado se mantuvo a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 30 días antes de su pretratamiento para su procesamiento respectivo.



Figura 3. Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Clarke *et al.* (1989). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (λ).



Figura 4. Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Istvan Nagy *et al.*, (1998). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (λ).

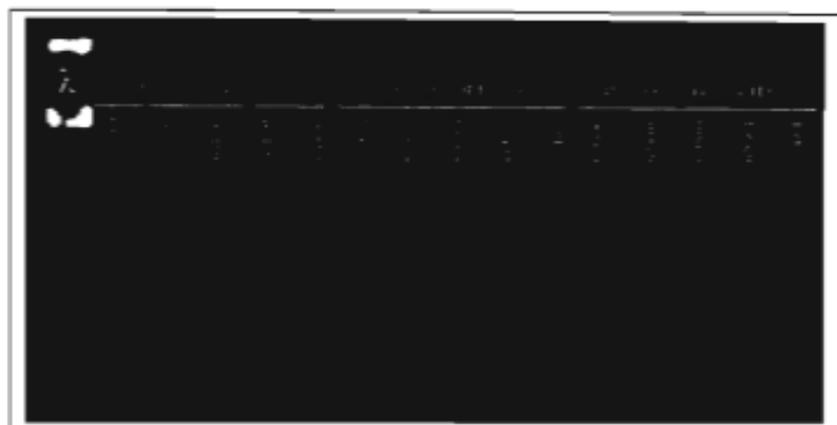


Figura 5. Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Dellaporta *et al.*, (1983). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (λ).



Figura 6. Gel de calidad de ADN de 15 colectas de tres razas de aguacate obtenido mediante el procedimiento descrito por Saghai-Marooof *et al.*, (1984), modificado por Hoisington *et al.*, (1994). El marcador de peso molecular es el fago Lambda (λ).

4.1.6. Protocolo propuesto por Clarke *et al.*, (1989) modificado

Con las experiencias adquiridas en los cuatro protocolos de aislamiento de ADN probados, se decidió utilizar como base el procedimiento descrito por Clarke *et al.*, (1989) para definir uno con viabilidad en el cultivo del aguacate. Las modificaciones hechas para la determinación de este protocolo, se hicieron tomando en cuenta el contenido de compuestos fenólicos en el tejido foliar de aguacate, en la solución extractora se usó un alto contenido de PVP (4 %) para inhibir la oxidación provocada por los compuestos fenólicos, se utilizó el detergente (CTAB) a la misma concentración que el reactivo anterior para desplazar proteínas y en mínima función, prevenir la oxidación. Otra modificación realizada fue la sustitución del extractor de savia por la maceración del tejido foliar en mortero, utilizando nitrógeno líquido. Los dos lavados hechos con cloroformo:octanol (24:1) ayudaron a eliminar posibles residuos de contaminantes, principalmente de los reactivos de la solución extractora y algunas proteínas. Estas modificaciones fueron determinantes para obtener un ADN de excelente calidad, así como una cantidad alta, esto en relación a los 100 ng de ADN del fago lambda (λ) utilizado como referencia para la cuantificación. Los resultados obtenidos con este procedimiento se presentan en la Figura 7.

Las plantas contienen tres tipos de ADN: nuclear, mitocondrial y de cloroplastos. Aunque se han propuesto métodos muy precisos y elaborados para aislar ADN de cada uno de los tipos anteriores, la mayoría de los experimentos necesitan algo más que la simple preparación del ADN total. Todos los métodos involucran la remoción de las envolturas que se encuentran alrededor del ADN; como son la pared y membrana celular. Además de la separación del ADN de otros

componentes tales como fibras de pared, proteínas, lípidos o ARN, y el mantenimiento de la integridad del ADN durante el procedimiento, por ejemplo: la protección de la actividad de las nucleasas y daños mecánicos. En la mayoría de los métodos que son aplicables a las especies vegetales, las células son abiertas mediante su molido en nitrógeno líquido, ya que la temperatura previene la degradación del ADN por la actividad de las nucleasas.

Una limitante en el aislamiento del ADN, especialmente de plantas, es la presencia de otras macromoléculas las cuales se copurifican o se polimerizan al ADN durante el procedimiento de aislamiento. La actividad de las nucleasas es reducida removiendo cationes como Mg^{2+} el cual es necesario para la actividad de las nucleasas. Algunos componentes como el EDTA se han utilizado en un intervalo de concentraciones, en diferentes protocolos, dependiendo de la especie vegetal que se está analizando. De la misma manera, algunos detergentes como el SDS son frecuentemente utilizados para inhibir actividades enzimáticas. Los problemas creados por los compuestos fenólicos son reducidos por la adición de 1 % o más de Poli Vinil Pirrolidona (PVP) en la solución extractora inicial. Los detergentes como el SDS disuelven membranas y disocian proteínas del ADN haciéndolas más accesibles a la degradación por proteinasas usadas en el aislamiento de ADN. El CTAB es un reactivo que se une fuertemente al ADN desplazando proteínas y previniendo la degradación, se remueve mediante lavados con cloroformo, dejando al ADN en la fase acuosa superior para ser precipitado con etanol. La fase acuosa contiene ADN, ARN, polisacáridos y algo de proteínas, mientras que los lípidos se encuentran en la fase orgánica y las fibras celulares así como la mayoría de los

agregados proteínicos en la interface. Finalmente la precipitación con etanol concentra el ADN.

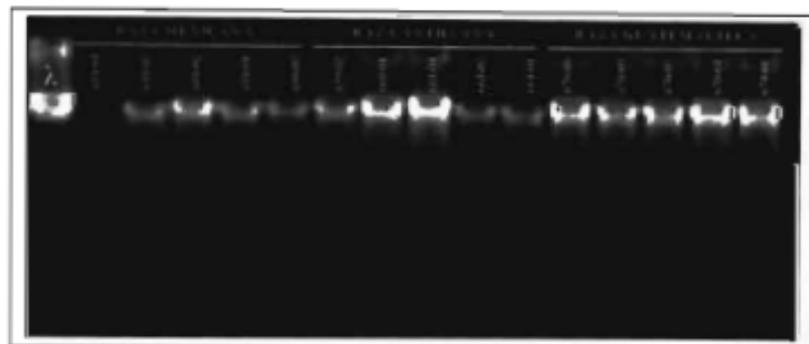


Figura 7. Fotografía del gel de calidad de ADN aislado de tejido foliar de 15 colectas de tres razas de aguacate mediante modificaciones hechas al procedimiento descrito por Clarke *et al.*, (1989) modificado. El marcador de peso molecular es el fago Lambda (λ).

4.2. Cuantificación del ADN

De acuerdo al resultado obtenido en el gel de agarosa, en el cual se verificó cualitativamente la calidad y cantidad de ADN obtenida con el método de aislamiento de Clarke *et al.*, (1989) modificado, se verificó cuantitativamente, mediante un espectrofotómetro, la pureza y concentración de ADN de las colectas de aguacate. Los resultados de la cuantificación del ADN se presentan en el Cuadro 13, en la muestra de la colecta 681-04, se obtuvo la menor cantidad de ADN ($0.035 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) mientras que en la colecta 680-02 la mayor ($0.437 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). En promedio se obtuvieron $0.200 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN y un total promedio de $4 \mu\text{g}$ de ADN, suficiente para hacer al menos 100 reacciones de amplificación. Sin embargo, la cuantificación

hecha con el espectrofotómetro es una medida indirecta de la concentración de ADN, ya que en ella se incluye a todos los cuerpos contenidos en la solución y que son capaces de absorber la luz ultravioleta, esto último es la principal razón de hacer el gel de calidad de ADN. Para determinar la pureza del ADN, Sélter y Monak, (1989), determinaron un intervalo de medida de absorbancia de 1.8 a 2.0 manómetros, en donde valores por debajo de estos, indican contaminación por proteínas y valores superiores indican contaminación con cloroformo o fenol. En cuanto a la pureza del ADN obtenido en el método analizado, se puede observar que algunas muestras de ADN como la 4, 7, 8, 9, 10 y 15 presentan un intervalo muy próximo al óptimo (1.8-2.0 manómetros) indicando la presencia de un ADN de buena calidad, pero también se tienen muestras donde se presenta una fuerte contaminación por proteínas y cloroformo, como se muestra en el cuadro antes mencionado.

Cuadro 13. Cantidad¹ de ADN obtenido de tejido foliar de aguacate de acuerdo a Clarke *et al.*, (1989), modificado.

Id.	Colecta	A ₁₍₂₆₀₎	A ₂₍₂₈₀₎	ABS (A ₁ /A ₂)	[ADN µg µL ⁻¹]
1	681-04	0.014	0.018	0.767	0.035
2	681-03	0.040	0.037	1.088	0.100
3	681-02	0.162	0.109	1.485	0.405
4	681-01	0.042	0.025	1.702	0.105
5	680-02	0.175	0.126	1.393	0.437
6	659-02	0.174	0.038	1.260	0.435
7	660-01	0.093	0.047	1.979	0.232
8	661-04	0.134	0.078	1.727	0.335
9	661-03	0.080	0.038	2.079	0.200
10	661-01	0.092	0.066	1.394	0.230
11	670-06	0.026	0.009	2.863	0.065
12	670-05	0.048	0.008	6.117	0.120
13	670-03	0.038	0.004	9.501	0.095
14	670-01	0.080	0.055	1.455	0.200
15	674-01	0.082	0.042	1.960	0.205

¹Determinada en un (HACH) DRU4000 U Spectrophotometer *

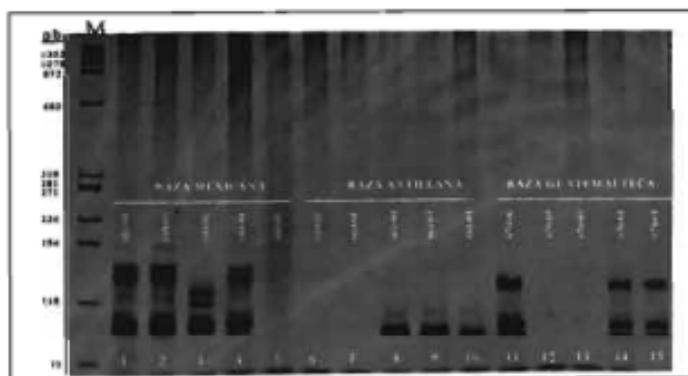
4.3. Prueba de la viabilidad del ADN

Con el ADN obtenido con el método de Clarke *et al.*, (1989) modificado, se llevó a cabo una prueba de amplificación de las muestras de ADN procedentes de las 15 colectas de aguacate criollo. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las establecidas de manera previa en el laboratorio indicando los componentes para un volumen total de reacción de 20 μL se emplearon los siguientes: ddH₂O 12.8 μL ; amortiguador Taq (1X) 2 μL ; MgCl₂ (1.5 mM) 0.6 μL ; mezcla de dNTPs a 2.5 mM c/u.) 0.8 μL ; enzima Taq ADN polimerasa (1 U μL^{-1}) 0.2 μL ; iniciador AVAG-05 a (0.15 mM) 0.6 μL ; ADN 3.0 μL . En cada tubo de reacción se agregó 20 μL de aceite mineral ultra puro Sigma por muestra para evitar la evaporación. El programa de amplificación fue desarrollado en un termociclador MJ Research, modelo PTC-225™. Las características del programa de amplificación se indican en la Figura 2. Los productos de amplificación se presentan en la Figura 8, en ella se observan algunas diferencias en los patrones de bandas de las muestras de ADN de colectas de aguacate, se observa que incluso existen diferencias dentro de las colectas de cada raza, como es el caso de las razas Mexicana y Antillana. De la misma manera algunas de las muestras de ADN de las colectas 5, 6, 7, 12 y 13 sólo presentaron una sola banda, esta banda fue similar (\approx 62 pb) de 62 pares de bases y estuvo presente en las 15 colectas de aguacate, por lo tanto se puede asegurar que en todos los casos si ocurrió el proceso de amplificación y que la ausencia de bandas adicionales puede deberse a problemas de homología más que de amplificación. Estos resultados confirman la utilidad del ADN obtenido con el procedimiento

indicado y que puede recomendarse para que sea utilizado en trabajos en el cultivo del aguacate en donde se requiera de ADN de alta pureza y en cantidades medias.

4.4. Nivel de complejidad de los protocolos probados

Un criterio de evaluación en los protocolos probados, es el nivel de complejidad de cada uno de ellos. Los materiales utilizados, así como reactivos e infraestructura, son una limitante para llevar a cabo la extracción de ADN. Para el método de Saghai-Marooft *et al.*, (1984), modificado por Hoisington *et al.*, (1994) se requiere del liofilizador para secar el tejido foliar de aguacate, para obtener el polvo molido que se usará en el proceso de extracción. Este equipo es muy costoso y por lo tanto representa una fuerte limitante en pequeños laboratorios. Para el protocolo de Clarke *et al.*, (1989) modificado, en contraste con el método anterior, no hace uso del liofilizador ya que el tejido vegetal es utilizado directamente, sin liofilización previa, adicionando solamente nitrógeno líquido y moliendo en mortero.



4.5. Resolución en geles de Agarosa

En la obtención de perfiles genéticos en los geles de agarosa al 4%, se observa una resolución deficiente y un bajo número de bandas, como se muestra en la Figura 9.

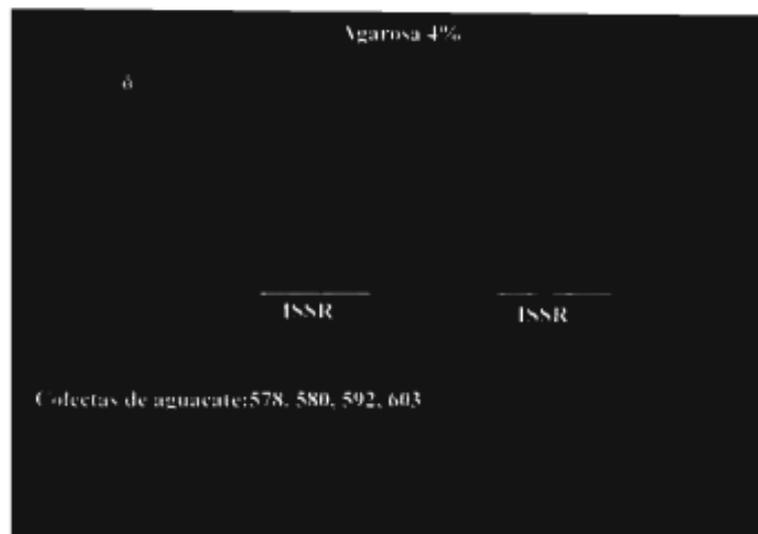


Figura 9. Patrón de bandas obtenidas en gel de agarosa al 4 %, con cinco secuencias ISSRs y ADN de cuatro colectas de aguacate de la raza mexicana.

4.6. Resolución en geles de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida, muestran una mejor resolución y un mayor número de bandas observándose mejor el perfil genético, con lo que se puede inferir

que estos detectan un mayor nivel de polimorfismo, como se observa en la Figura 10.

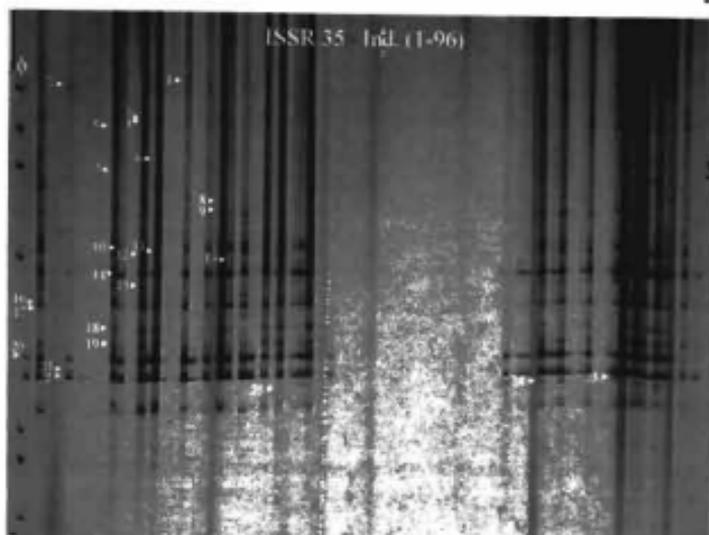


Figura 10. Patrón de bandas obtenidas con poliacrilamida, un iniciador y ADN de 96 colectas de aguacate de la raza mexicana.

4.7. Amplificación del ADN para las colectas de aguacate de la raza mexicana

Una vez comprobada la viabilidad del método de extracción de ADN por el método de aislamiento de Clarke *et al.*, (1989) modificado, en el laboratorio de biotecnología del INIFAP-Uruapan, se procedió a su amplificación, obteniéndose una excelente resolución, misma que permitió distinguir con facilidad la presencia de las bandas polimórficas. Como lo muestra el iniciador (AG)₆C, en la Figura 11.

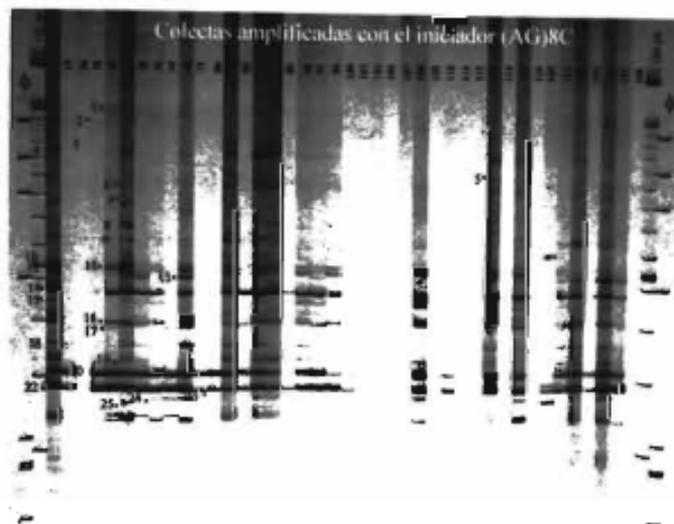


Figura 11. Perfil genético de colectas de aguacate de la raza mexicana obtenido mediante el iniciador $(AG)_8C$

4.8. Nivel de polimorfismo

Con los siete iniciadores del tipo ISSRs utilizados en 231 accesiones pertenecientes a 77 colectas de aguacate de la raza mexicana se detectó un total de 154 *loci*. En todos los casos los iniciadores detectaron polimorfismos en las colectas analizadas, el número de bandas detectado fue desde 17 hasta 25. En la Figura 11, se observa el perfil genético obtenido con el iniciador $(AG)_8C$. En relación con el contenido de información de polimorfismo (PIC) detectado por cada una de las secuencias probadas, los resultados indicaron que el PIC fluctuó de 82 hasta 95 %. Un iniciador detector de polimorfismo fue considerado aquél que detectó al menos una banda diferente entre los genotipos analizados, es decir las bandas polimórficas

fueron las que estuvieron ausentes en al menos uno de los genotipos evaluados; de tal forma que, aunque una banda estuviera presente en la mayoría de los materiales si falta en uno, es considerada polimórfica. En el Cuadro 14 se presentan los resultados completos sobre el polimorfismo detectado por cada uno de las secuencias ISSRs utilizadas en el presente trabajo.

Cuadro 14. Nivel de polimorfismo (PIC), obtenido con siete microsátélites del tipo ISSRs en 231 materiales de 77 colectas de aguacate (*Persea americana* Mill.) raza mexicana.

Nº	Iniciador	Total de bandas	Bandas polimórficas	PIC
1	HVH(CA) ₇ T	19	19	0.928893
2	(CT) ₉ RC	17	17	0.934349
3	(AG) ₉ G	22	22	0.942850
4	(CA) ₉ A	22	22	0.948197
5	(GA) ₉ C	25	25	0.953975
6	(AG) ₉ C	25	25	0.953927
7	(AG) ₈ T	24	24	0.822833

Y R ancla residuos de purina, Y para pirimidina, B para cualquiera menos adenina, D para cualquiera menos citosina, H para cualquiera menos timina, C citosina y G guanina.

Los iniciadores que mayor número de bandas (25) polimórficas generaron fueron el (AG)₉C con un porcentaje de polimorfismo de 95.39 %. Resultados similares fueron obtenidos con el iniciador (GA)₉C. En contraste, el iniciador (AG)₈T fue el que menor contenido de información de polimorfismo aportó con un total de 82.28 %. En general el PIC promedio (92.64 %) detectado con este tipo de secuencias es considerado alto por lo cual indica la viabilidad de las ISSRs para estudios de diversidad genética en aguacate.

En la actualidad existe una gran variedad de metodologías que pueden ser utilizadas para hacer análisis sobre la diversidad genética entre genotipos estrechamente relacionados. Las técnicas (Welsh, 1990; Williams *et al.*, 1990; Caetano-Anollés *et al.*, 1991) basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han convertido en las preferidas entre los investigadores. En el caso de las ISSRs, ésta es una técnica de amplificación que, como queda demostrado en este trabajo, detecta un alto número de polimorfismo entre individuos, permitiendo diferenciarlos fácilmente (Zietkiewics *et al.*, 1994), aún cuando estén estrechamente emparentados. Esta técnica involucra la amplificación del ADN utilizando un solo iniciador; compuesto de una secuencia microsatélite como la (CA)_n anclada en los extremos 3' ó 5' mediante dos a cuatro nucleótidos arbitrarios y frecuentemente degenerados. Estas secuencias de repetidos y nucleótidos anclados son seleccionados aleatoriamente, de tal manera que pueden revelar un número mucho más grande de fragmentos por iniciador, en comparación con otro tipo de marcadores. Los resultados de polimorfismo obtenidos en este trabajo concuerdan (Salimath *et al.*, 1995; Wolff *et al.*, 1995; Guillén *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2007; Fang y Roose, 1997) con los reportados en estudios hechos en otras especies con este tipo de secuencias.

Wang *et al.*, (1994), mencionan que en plantas las frecuencias microsatélites más comunes son los dinucleótidos (AT/AT)_n, seguido de las secuencias (GT/TG)_n, en caso del genoma de aguacate raza Mexicana las frecuencias microsatélites más comunes fueron las de los dinucleótidos (AG/AC)_n, en base al número de iniciadores que amplificaron con estas secuencias y al número de bandas generadas con estos;

seguidos de los dinucleótidos (CT/RC)_n, sin embargo, estos generaron menos bandas por iniciador, estos resultados concuerdan con los reportados en vid por Thomas y Scout (1993), quienes reportan los dinucleótidos microsatélite (CA/GT)_n, como más abundantes en el genoma de esta especie.

Con respecto al número de bandas obtenido por iniciador en este trabajo, resultó muy similar a lo obtenido por otros autores como Fang y Roose (1999) en cítricos o como Prevost y Wilkinson (1999) en papa.

4.9. Determinación de relaciones de parentesco

Derivado del análisis de la matriz de ceros y unos generada a partir de los datos moleculares de las bandas de ISSRs, se obtuvo una matriz de distancias genéticas, las distancias se encuentran entre valores de 0 y 1, valores cercanos a 0 significa que son materiales muy emparentados genéticamente, mientras que valores cercanos a 1.0 se refiere a materiales poco emparentados. De la matriz de distancias genéticas se derivó el dendograma de encadenamiento completo (Figura 12), logrado con este tipo de marcadores y en el cual se agruparon los diferentes materiales de aguacate de la raza mexicana (Cuadro 9). Con base a las distancias genéticas determinadas entre estos, empleándose para tal efecto el método de agrupamiento secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento de anidamientos.

En este dendograma se observa la formación de dos grandes grupos. En el grupo I se ubican once subgrupos. I_a, se formó con las colectas 237, XTC01, 308,

435, 525, 725, 551,744 y 503. I_b, 321, 327, y 337. I_c, estuvo asociado al anterior con la colecta 667 y lo formaron la 583, 687 y 690. Este subgrupo se asocio por medio de la 720 al subgrupo I_d, el cual se formó con la 648 y 681. Esta se asocio con la 666, y 314 al siguiente subgrupo I_e, donde se ubicaron 315, 308, 519, 509, 514, y 525. En el subgrupo I_e, se encontraron la 326 y 336. En I_f, se agruparon, 632, 633 y XTR02 y en I_h, 506, 72, y 680. El I_i, se asocio al anterior con la colecta 543, y lo formaron 247, 370, 635, 588, 677, 679, y 516. En el I_j, 305 y 331. Finalmente en el subgrupo I_k, se ubicaron las colectas 538 y 670.

En el subgrupo I_a, las colectas con mayor similitud genética fueron la 237 de Atlixco, Puebla, con la XTC01 de Uruapan, Michoacán.

Del grupo I, de diferentes subgrupos, presentaron el mismo número de bandas polimórficas entre ellas las colectas 551 de Ocotlán, Oaxaca, y 724 de la Mixtequilla, Alvarado, Veracruz, 321 de Xalacapán, Zacapoaxtla, Puebla, 327 de San Sebastián, Teziutlán, Puebla, 508 de Tecomatlán, Tenancingo, Edo. de México, 519 de Tlalama, Ozumba de Zarate, Puebla.

Así mismo las colectas 648 de Tetela del Volcán y 681 de Uruapan, Michoacán, 687 y 690 de la localidad del el Diez de Tuxtla Chico, Veracruz, 506 Valle de Bravo Edo. de México, y 728 de Cunduacán, Tabasco, presentaron el mismo número de bandas polimórficas y menor similitud con las anteriores.

El análisis determinó una asociación más clara de colectas; esta se observó en el grupo II que incluyó tres subgrupos, (II_a, se formó con las colectas 667, 320, 642, 332, 334, 652, 356, 341, 535, 649, 534, 371, 678, y 532. El subgrupo II_b, 322, 542, 546, 362, 511, 520, 640, 643, 646, 645, 647, 644 y 650. El subgrupo II_c con la 533 y 740).

En el subgrupo II_a, presentaron el mismo número de bandas polimórficas las siguientes colectas, 332 de Jalancingo, Veracruz, 334 de Altotongo, Veracruz, 356 de Aguascalientes, 541 Xalostepic, Tepexi de Rodríguez, Puebla, 535 de Atlixco, Puebla, y 649 de Teposcolula, Oaxaca.

Las colectas 362 de Calvillo, Aguascalientes, 511 de Tenancingo Edo. de México, 520 de Ozumba de Zarate Edo. de México, y 640 de Zitácuaro, Michoacán, presentan el mismo número de bandas, entre ellas y menor similitud genética con las anteriores.

Al final con la menor similitud genética (las más distantes de todas) se ubicaron las colectas 532 de Atlixco, Puebla, y 369 de la Cañada, Chilchota, Michoacán.

El alto nivel de polimorfismo detectado con los microsatélites del tipo ISSRs indica el alto grado de variación genética existente en las colectas del aguacate *Persea americana*, raza mexicana, analizadas en el presente trabajo de investigación. Lo anterior se puede explicar dado el interés que se tiene por la especie, generando una importante movilización de este cultivo para su establecimiento en las diferentes

regiones del país, en donde las diversas condiciones agroclimáticas han favorecido la variación genética entre la misma especie, así como las características botánicas y morfológicas que hacen del aguacate una especie heterocigótica y de polinización abierta, esto último es factor fundamental de inducción de variación genética.

Los resultados obtenidos indicaron la amplia diversidad genética que existe en el banco de germoplasma de aguacate. La utilización de los microsatélites del tipo ISSRs para detectar variación, incluso en individuos estrechamente emparentados, fué corroborada en este trabajo y coincide con lo reportado por (Nybor, 1991; Clegg *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2007; Schnell *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; Librada *et al.*, 2007; Viruel *et al.*, 2007), quienes destacan que las ISSRs son una poderosa herramienta para la caracterización y detección de altos niveles de polimorfismo y pueden aplicarse exitosamente para discriminar entre genotipos individuales en un amplio rango de especies animales y vegetales

Otras investigaciones similares coinciden con los resultados obtenidos. Las ISSR, se han propuesto como una nueva fuente de marcadores moleculares los cuales superan las limitaciones técnicas de los RFLPs y RAPDs (Ratnaparkhe *et al.*, 1998). Esta tecnología provee un sistema fácil, confiable y altamente informativo para tomar huellas de ADN (Prevost y Wilkinson, 1999). Al respecto, diversos autores han comparado los ISSRs con otras técnicas moleculares. Fang *et al.*, (1997), caracterizando accesiones de naranjo trifoliado, reportan que mediante las isoenzimas y los RFLPs se detectó poco polimorfismo entre las diferentes

accesiones; mientras que, con los ISSRs se generó un mayor número de bandas, considerando a estos más informativos. Nagaoka y Okijara (1997), evaluando diferentes marcadores moleculares para detectar polimorfismo en trigos menciona que los iniciadores ISSRs producen mayor información que los RAPDs y RFLPs. En estudios de diversidad en arroz, con diferentes marcadores moleculares Parson *et al.*, (1997), reportaron un mayor polimorfismo generado a partir de unos cuantos iniciadores ISSRs en comparación con RAPDs e isoenzimas. Similar a lo reportado por Esselman *et al.*, (1999), quienes obtuvieron mejores resultados con SSRs. Danin *et al.*, (1998), mencionan haber obtenido similares resultados que con AFLPs; también Lanham y Brennam (1999), reportan mejores niveles de polimorfismo que con AFLPs en la caracterización de grosellero.

Dadas sus características de generar altos niveles de polimorfismo, altamente informativos, fácil manejo, reproducibilidad y bajo costo en relación con otros marcadores moleculares, se consideran como marcadores ideales para el manejo de gran cantidad de accesiones, para su caracterización, identificación, o elaboración de mapas de ligamiento (Kantely *et al.*, 1995; Tsumura *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Nagaoka y Okijara, 1997; Prevost y Wilkinson, 1999).

Los resultados indican que no es necesario discriminar colectas ya que no existen duplicados en el banco de germoplasma del CEFAP-Uruapan, por lo que estos deberán mantenerse para posteriores estudios de mejoramiento genético.

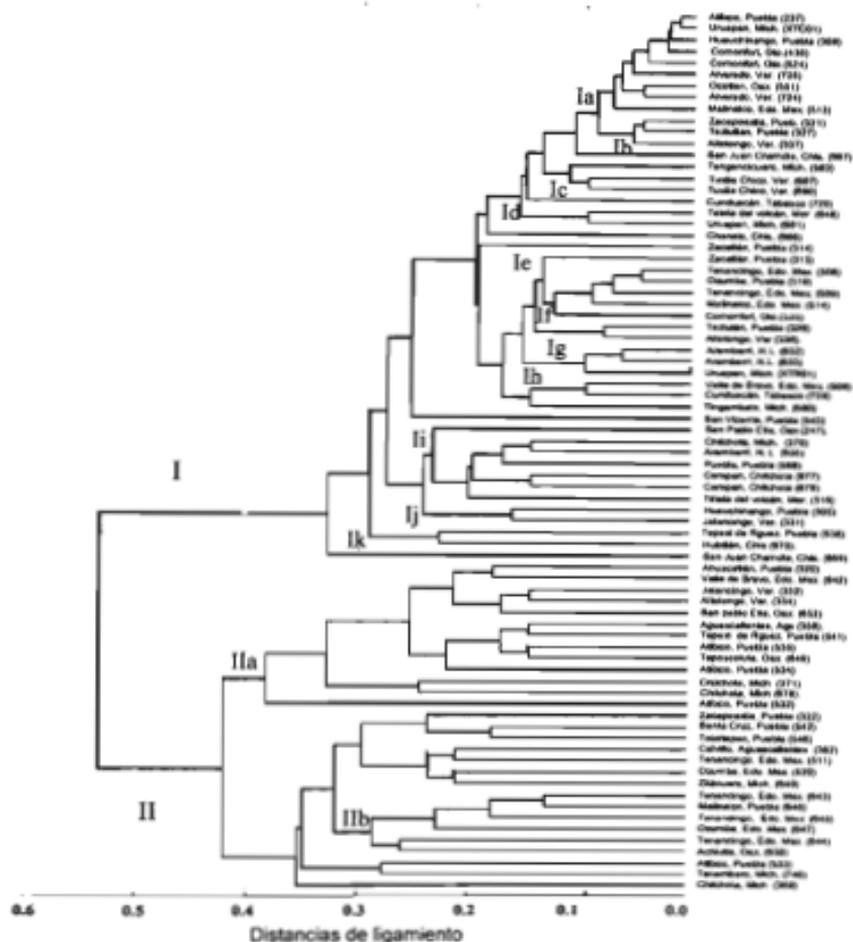


Figura 12. Dendrograma de encadenamiento completo de 77 colectas de aguacate (*Persea americana* Mill.) de la raza mexicana obtenido mediante siete secuencias internas de repetición corta (ISSR).

V. CONCLUSIONES

Con base a los objetivos e hipótesis planteados en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

1. El ADN genómico de aguacate no es susceptible de ser aislado con cualquier procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, particularmente por los altos niveles de metabolitos secundarios (taninos y fenoles).
2. El protocolo descrito por Clarke *et al.*, (1989), modificado por Guillén *et al.*, (2003) resultó ser un método viable para ser utilizado en aguacate.
3. Los marcadores genéticos ISSRs fueron capaces de detectar altos porcentajes de polimorfismo, desde 82.28 % a 95.39 %.
4. En el banco de germoplasma de aguacate de la raza mexicana del CEFAP Uruapan, existe una gran diversidad genética y el análisis mediante ISSRs no detectó colectas de duplicados.
5. Se detectaron dos grandes grupos, con predominancia de colectas de los estados de Puebla, estado de México y Michoacán.

VI. LITERATURA CITADA

- Akkaya, M. A., A. Bhagwat, and P. B. Cregan.** 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:131-139.
- Albani, M. C., and M. J. Wilkinson.** 1998. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant. Breed.* 117:537-575.
- Ben Ya'acov, A., G. Buffer., A. F. Barrientos-Priego., T. E. de la Cruz Torres, and L. I. López.** 1992. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I. General description of the international project and its findings. *Proc. of Second World Avocado Congress.1992.* pp. 535-541.
- Ben Ya'acov, A., L. I. López., T. E. de la Cruz, and A. F. Barrientos-Priego.** 1992a. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. II. Findings from the central part of México. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992.* pp. 543-544.
- Ben Ya'acov, A., E. Michelson., M. Zilberstaine., Y. Barkan., I. Sela.** 1992b. Selection of clonal avocado rootstocks in Israel for high productivity under different soil conditions. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992.* pp. 521-526.
- Bergh, B., and N. Ellstrand.** 1986. Taxonomy of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* Vol. 70:135-145
- Bergh, B. O.** 1992. The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook.* Vol. 76:61-75.
- Blair, M. W., O. Panaud., S. R. McCouch.** 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.): *Theor. Appl. Genet.* 98:5, 780-792.
- Borojevic S.** 1990. Principles and methods of plant breeding. *Developments in Crop Science* 17. Elsevier Sci. Publ. B. V. pp. 368.
- Bowman, K. D., and R. W. Scora.** 1992. The necessity of avocado germplasm resources. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992.* pp. 531-534.
- Bretting, P. K., and M. P. Widrechner.** 1995. Genetic Markets and horticultural germplasm management. *HortScience* 30(7): 1349-1355.

- Caetano-Anollés, G., B. J. Bassam and P. M. Grshoff.** 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Caetano-Anollés, G.** 1994. MAAP, a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Mol. Biol.* 25:1011-1026.
- Castillo, T. R. O.** 1996. La biotecnología en la conservación y usos de la agrobiodiversidad INIAP. 6: 5-17.
- Chen, Y. G., E. Hausner., D. Kenaschuk., P. Procurmier., Dribnenki, and G. Penner.** 1998. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. *Plant Cell Reports* (18) (1-2): 44-48.
- Clarke, B. C., L. B. Moran and R. Appels.** 1989. DNA analysis in wheat breeding *Genome* 32:334-339.
- Clegg M. T., Kobayshi and J. Zhong Lin.** 1999. The use molecular markers in the management and improvement of avocado (*Persea Americana* Mill.). *Revista Chapingo serie Horticultura.* 5:227-231.
- Condit, R., S. P. Hubell.** 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66-71.
- Danin, P. Y., G. Tzuri, N. Reis, and N. Katzir.**1998. Application of intr-SSR markers in melon (*Cucumis melo* L.). *Report Cucurbit Genetics Cooperative* 21,25-28.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks.** 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Durham, R. E., P. C. Liow, F. G. Smmitter Jr., and G. A. Moore.** 1992. Linkage of restriction length polymorphisms and isozymes in citrus. *Theor Appl. Genet.* 84: 39-48.
- Erlich, H. A., N. Arnheim.** 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* 26:479-506.
- Esselman, E. J., L. Jianquiang, D. J. Crawford, J. L. Windus, and A. D. Wolfe.** 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Inesperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecology* 8:3, 443-451.
- Falkenhagen, E. R.** 1985. Isozyme studies in provenance research of forest trees. *Theor. Appl. Genet.* 69:335-347.

- Fang, D. Q. and M. L. Roose.** 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408-417.
- Fang, D. Q., M. L. Roose., R. R. Kruger, and C. T. Federici.** 1997. Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLP's, and inter simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 97:211-219.
- Fang, D. Q., R. R. Kruger, and M. L. Roose.** 1998. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Sci. Hort. Sci.* 123:4, 612-617.
- Fang, D. Q. and M. L. Roose.** 1999. Inheritance of inter simple sequence repeat markers in Citrus. *J. Hered.* 90:1, 247-249.
- Fuentes J. L.** 2005. Avances in avocado mutation breeding programs in Cuba: Memorias de Resúmenes II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate 2005 pp. 11.
- Gama, C. L., and A. P. Gómez.**1992. An Ethnoecological approach for the study of *Persea*: A Case Study in the Maya Area. Proc. of second World Avocado Congress 1992. pp 11-17.
- Guillén-Andrade, H.,** 2000. Tecnología de marcadores moleculares y su aplicación al fitomejoramiento. *Fitosanidad, Biotecnología e Inocuidad Alimentaria.* UACH. p. 1-5.
- Guillén-Andrade, H.,** 2001. Genómica y fitomejoramiento. En: Memorias del I^{er} Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Uruapan, Mich., 15-20 de octubre 2001. 258-262.
- Guillén-Andrade H., G. G. Álvarez., I. F. Vidales., E. P. Ángel., M. V. Tapia.** 2003. Aislamiento de ADN genómico de Aguacate (*Persea americana* Mill.) 296 En: Almaguer V. G., T. Colinas L., A. Flores M., R. Mora A., E. Vidal L., H. González R., C. Ayala S., J. M. Mejía M., (eds). Memoria de resúmenes del X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas. IX Congreso Nacional y II Internacional de la Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental. 20 al 24 de octubre del 2003. Chapingo, Méx., México. Vol 10.
- Guillén-Andrade H, Lara-Chávez, B.N., Gutiérrez-Contreras M., Ortiz Catón, M., y Ángel-Palomares, E.** 2007. Cartografía agroecológica del cultivo del aguacate en Michoacán, Morevallado editores de Morelia, Michoacán. pp. 140.
- Gupta, M., Y. S. Chyi, J. Romero-Severson and J. L. Owen.** 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers or simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.

- Hamann, A. D.**, Zink, and W. Nagl. 1995. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. *Genome* 38:507-515.
- Hawkes, J. G.** 1991. Centros de diversidad genética vegetal en Latinoamérica. *Diversity- America Latina* Vol. 7 Nos 1 & 2:7-9.
- Henry, R. J.** 1998. Practical applications of molecular markers to tropical and subtropical species. *Acta Hort.* 461:107-111.
- Hoisington D. A.** 1994. Working linkage maps. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 63: 141-151.
- Huanosto, M. R.** 2000. Características de tres especies de aguacate (*Persea americana*, *Persea tolimenensis* y *Persea schiedeana*), Tesis de Licenciatura. Morelia, Mich., pp. 56.
- Kantely, R. V.**, X. Zhang., J. L. Bennetzen., B. Z. Zerh. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* pp. 365-373.
- Karp, A.** and K. J. Edwards. 1995. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Repor of an IPGRI workshop 9-11 october 1995, Rome Italy, pp. 11-22.
- Karp, A.**, S. Kresovich., K. V. Bhat., W. G. Ayad and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools. In: *plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Bulletin 2. p. 47.
- Keil, M.**, and A. R. Griffin. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.* 89: 442-450.
- Klass, M.** 1998. Applications and impact of molecular markers on evolutionary and diversity studies in the genus *Allium*. *Plant Breed.* 117:297-308.
- Kobayashi, M.**, J. Z. Lin., J. Davis., J. L. Francis., and M. T. Clegg. 2000. Quantitative analysis of avocado out crossing and yield in California using RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 86:135-149.
- Kojima, T.**, T. Nagacka., K. Noda, and Y. Ogihara. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkors wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 96:37-45.
- Kopp, L. E.** 1966. A taxonomic review of the genus *Persea* in the Western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). *Mem. N.Y. Bot. Gard.* 14:1-120.

- Kuhns, L. J., and T. A. Fretz.** 1978. Distinguishing rose cultivars by polyacrilamide gel electrophoresis. I. Extraction and storage of protein and active enzymes from rose leaves. *J. Mol. Biol.* 80: 575-599.
- Lanhan, P. G., and R. M. Brennan.** 1999. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. *J. Hort. Sci. Biotechnology* 74:3, 361-366.
- Lanaud, C., and V. lebot.** 1995. Molecular techniques for increased use of genetic resources. In: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop 9-11 October 1995 Rome, Italy.* pp. 92-97.
- Lavi, U., E. Lahav., A. Genizi., C. Degani., S. Gazit. and J. Hillel.** 1991. Quantitative genetic analysis of traits in avocado cultivars. *Plant Breeding*, 106:149-160.
- Librada Alcaraz, M. and J.I. Hormaza.** 2007. Molecular characterization and analysis of genetic diversity in 75 avocado accessions using SSRs. En *Memoria del VI Congreso Mundial del Aguacate. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Viña del Mar, Chile. 12 al 16 de noviembre de 2007.* p. 54.
- Mallikarjuna, K. A., F. Zee, and R. M. Marshardt.** 1994. Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica* 79:87-99.
- Mejía, de L. L.** 1992. Estudios con isoenzimas como marcadores genéticos en plantas. *Biotecnología. Vol X, Nº 1-2:*59-65. México.
- Moore, A.G. and R. E. Durham.** 1992. Molecular markers. In: *Biotechnology of perennial fruit crops.* Ed. by F.A. Hammerschlay. CAB International UK. 1992. pp. 105-139.
- Moore N. J., y J. Janick.** 1993. Métodos genotécnicos en frutales. Edit. AGT. Editor, 18:395-411.
- Moreno, S., Y. Gogorcena., y J. M. Ortiz.** 1997. Progreso en la caracterización y mejora de la vid (*Vitis vinifera* L.) mediante marcadores moleculares. *ITEA* 93(3):135-155.
- Moreno, S., J. P. Martín. and J. M. Ortiz.** 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101:117-125.
- Morgante, M., and A. M. Olivieri.** 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3(1):175-182.
- Mullis, K. B.** 1990. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci. Amer.* 262: 43-46.

- Murray, M. G., and W. F. Thompson.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Rev.* 8:4321-4325.
- Nagaoka, T., and Y. Ogiwara.** 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94(5): 597-602.
- Nybon, H. and H. K. Hall.** 1991. Minisatellite DNA "fingerprints" can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53:107-114.
- Parson, B. J., H. J. Newbury, M. T. Jackson, and B. V. Ford-Lloyd.** 1997. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Mol. Bred.* 3(2):115-125.
- Prevost, A., and M. J. Wilkinson.** 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Py, C.** 1970. *La piña tropical*. Editorial Blume, Madrid. 568 p.
- Rafalsky, J. A., and S. V. Tingey.** 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD's microsatellites and machines. *TIG.* 9: 275-279.
- Ramírez, I. M., J. L. Fuentes, N. N. Rodríguez, J. R. Cueto and W. Rodhe.** 2002. DNA polymorphic in Cuban varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) analysis. *Cultivos Tropicales* 23(3):85-88.
- Rawson, J. Y. F., K. Thomas., and M. T. Clegg.** 1982. Purification of total cellular DNA from a single plant. *Biochemical Genetics* 20: 209-219.
- Rodríguez, N. N., J. L., O. Coto., V. R. Fuentes., I. M. Ramírez., D. Becker., I. Rodríguez., C. González., S. Xiqués., M. I. Román., B. Velázquez., W. Rhode., and N. Jiménez.** 2007. Comparative study of polymorphism level, discrimination capacity and informativeness of AFLP, ISTR, SSR and Isoenzymes markers and agro-morphological traits in avocado. En memoria del VI Congreso Mundial del Aguacate. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Viña del Mar, Chile. 12 al 16 de noviembre de 2007. p. 76.
- Rothuizen, J., J. Wolfswinkel, J. A. Lenstra, and R. R. Frants.** 1994. The incidence of mini and microsatellite repetitive DNA in the canine genome. *Theor. Appl. Genet.* 89: 403-406.
- Ratnaparkhe, M. B., M. Tekeoglu and F. J. Muehlbauer.** 1998. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as useful for finding markers associate with disease resistance genes clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515-519.

- Salki, R. K., U. B. Gyllesten, and H. A. Erlich.** 1988. The polymerase chain reaction. In: *Genome Analysis, a practical approach*. Ed. By K. E. Davies. IRL Press. pp 141-151.
- Saghai-Maroof, M. A., K. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard.** 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *P.N.A.S.* 81: 8010-8014.
- Salimath, S. S., A. C. Oliveira., I. D. Godwin., and J. L. Bennetzen.** 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genomes* 38: 757-776.
- Sánchez, P. J. L.** 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5: 7-18.
- Sánchez, P. J. L., F. J. A. Vidales., R. J. J. Alcanzar., y F. I. Vidales.** 2000. Programa Nacional de Investigación en Aguacate. INIFAP. pp. 120.
- Schieber, E. and G. A. Zentmyer.** 1992. Archeology of the Avocado in Latin America. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992*, pp. 49.
- Schroeder, C. A.** 1990. Useful fruits of avocado relatives. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* Vol. 74: 243-245.
- Senior, M. L., and M. Heun.** 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36:884-889.
- Sharon, P., B. Cregan., S. Mhameed., M. Kusharska., J. Hillet., E. Lahav, and U. Lavi.** 1997. An integrated genetic map avocado. *Theor. Appl. Genet.* 95:911-921.
- Schnell, R. J., J. S. Brown., C. T. Olan., T. Ayala-Silva., D. N. Kuhn., and J. C. Motamayor.** 2007. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. En memoria del VI Congreso Mundial del Aguacate. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Viña del Mar, Chile. 12 al 16 de noviembre de 2007. p. 48.
- Smith, J. S. C., E. C. L. Chin, H. Shu., O. S. Smith., S. J. Wall., M. L. Senior., S. E. Mitchell., S. Krosovich., and J. Ziegler.** 1997. An evaluation of the utility of SRR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLP's and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163-173.
- Storey, W. B., B. O. Bergh., R. G. Platt and M. Miller.** 1986. Observations on a second generation progeny of a Mexican for West Indian cross. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 68:161-165.

- Tamarino, G. R. and S. Tingey.** 1996. Simple sequence repeats for germoplasm analysis mapping in maize. *Genome* 39: 277-287.
- Tamarino, G. R., Tarchini, S. Ferrario., and M. Lee., M. E. Pe.** 1997. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*, *Theor. Appl. Genet.* 95: 66-72.
- Tanksley, S. D., A. H. Young., M. W. Paleson, Boniezbball.**1989. RFLP mapping in plant breeding; new tools for an old science, *Biotechnology* 7: 251-265.
- Tanksley, S. D.** 1993. Mapping Polygene *Ann. Rev. Genet.* 27: 205-233.
- Thomas, M. R., and N. S. Scott.** 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.
- Tsumura, Y., K. Ohba, and S. H. Strauss.** 1996. Diversity and inheritance on inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga manziessii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92(1):40-45.
- Villalobos, V. M. and F. Engelmann.** 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 11:376-382.
- Viruel, M. A., E. Gross., and A. Barceló-Muñoz.** 2007. Development of a linkage map with SSR and AFLP markers in avocado. En memoria del VI Congreso Mundial del Aguacate. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Viña del Mar, Chile. 12 al 16 de noviembre de 2007. p. 52.
- Vos, P., R. Hogers., M. Bleeker., M. Reijans., T. V. de Lee., M. Hornes., A. Frijters, J. Pot., J. Peleman., M. Kuiper, and M. Zabeau.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23 (21): 4407-4414.
- Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhong, and S. D. Tanksley.** 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.
- Weising, K., H. Ramser., D. Kaemmer., G. Kahl, and J. T. Epiplen.** 1991. Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. pp. 312-329.
- Weising, K., H. Nybon., K. Wolff and W. Meyer.** 1995. DNA Fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, London.
- Welsh, J. and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.

- Westman, A. L. and S. Kresovich, 1998.** The potential for cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas. *Theor. Appl. Genet.* 96: 272-281.
- White, T. J. 1996.** The future of PCR technology diversification of technologies and applications. *Tibtech* 14:478-483.
- Williams, L.O. 1977.** The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Econ. Bot.* 31:315-320.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik., K. J. Livak., J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* 18. 6531-6535.
- Wolff, K., E. Zietkiewicz, and G. Hofstra. 1995.** Identification of *Chrysanthemum* cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.*, 91:439-447.
- Wolfe, A. D., Q. Y. Xiang, and S. R. Kephart. 1998.** Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon roseus* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecology* 7: 9, 1107-1125.
- Wu, K., R. L. Jones., Danneberger and P. A. Scolnik. 1994.** Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucl. Acids. Res.* 22: 3257-3258.
- Wu, R. S. and S. D. Tanksley. 1993.** Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235.
- Yamamoto, M., T. Tomita., M. Onjo., K. Ishihata., T., Kubo., and S. Tominaga. 2007.** Genetic diversity of white sapote (*Casimiroa edulis* la Llave & Lex.) demonstrated by intersimple sequence repeat analysis. *Hort. Science* 42(6): 1329-1331.
- Yang, W. P., A. C. de Oliveira., I. Godwin., K. Schertz., and J. L. Bennetzen. 1996.** Comparison of DNA markers technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36(6): 1669-1676.
- Zhao, X. and G. Rochert. 1993.** Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.) *Plant. Mol. Biol.* 21:614-617.
- Zentmyer, G. A. 1991.** The genus *Persea*. *Calif. Avocado Soc. Yearbook.* 75:119-123.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchors polymerase chain reaction amplification *Genomics* 20: 176-183.

VII. APÉNDICE

CF	CG	CH	CI	CJ	CK	CL	CM	CN	CO	CP	CQ	CR	CS	CT	CU	CV	CW	CX	CY	CZ	DA	DB	DC	DD	DE	DF	DG	DH	DI	DJ	DK	DL	DM	DN	DO	DP	DQ	DR	DS	DT	DU	DV	DW	DX	DY	DZ	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	EH	EI	EJ	EK	EL	EM	EN	EO	EP	EQ	ER	ES	ET	EU	EV	EW	EX	EY	EZ	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH	FI	FJ	FK	FL	FM	FN	FO	FP	FQ	FR	FS	FT	FU	FV	FW	FX	FY	FZ	GA	GB	GC	GD	GE	GF	GG	GH	GI	GJ	GK	GL	GM	GN	GO	GP	GQ	GR	GS	GT	GU	GV	GW	GX	GY	GZ	HA	HB	HC	HD	HE	HF	HG	HH	HI	HJ	HK	HL	HM	HN	HO	HP	HQ	HR	HS	HT	HU	HV	HW	HX	HY	HZ	IA	IB	IC	ID	IE	IF	IG	IH	II	IJ	IK	IL	IM	IN	IO	IP	IQ	IR	IS	IT	IU	IV	IW	IX	IY	IZ	JA	JB	JC	JD	JE	JF	JG	JH	JI	IJ	JK	KL	KM	KN	KO	KP	KQ	KR	KS	KT	KU	KV	KW	KX	KY	KZ	LA	LB	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI	LJ	LK	LL	LM	LN	LO	LP	LQ	LR	LS	LT	LU	LV	LW	LX	LY	LZ	MA	MB	MC	MD	ME	MF	MG	MH	MI	MJ	MK	ML	MM	MN	MO	MP	MQ	MR	MS	MT	MU	MV	MW	MX	MY	MZ	NA	NB	NC	ND	NE	NF	NG	NH	NI	NJ	NK	NL	NM	NN	NO	NP	NQ	NR	NS	NT	NU	NV	NW	NX	NY	NZ	OA	OB	OC	OD	OE	OF	OG	OH	OI	OJ	OK	OL	OM	ON	OO	OP	OQ	OR	OS	OT	OU	OV	OW	OX	OY	OZ	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG	PH	PI	PJ	PK	PL	PM	PN	PO	PP	PQ	PR	PS	PT	PU	PV	PW	PX	PY	PZ	QA	QB	QC	QD	QE	QF	QG	QH	QI	QJ	QK	QL	QM	QN	QO	QP	QQ	QR	QS	QT	QU	QV	QW	QX	QY	QZ	RA	RB	RC	RD	RE	RF	RG	RH	RI	RJ	RK	RL	RM	RN	RO	RP	RQ	RR	RS	RT	RU	RV	RW	RX	RY	RZ	SA	SB	SC	SD	SE	SF	SG	SH	SI	SJ	SK	SL	SM	SN	SO	SP	SQ	SR	SS	ST	SU	SV	SW	SX	SY	SZ	TA	TB	TC	TD	TE	TF	TG	TH	TI	TJ	TK	TL	TM	TN	TO	TP	TQ	TR	TS	TT	TU	TV	TW	TX	TY	TZ	UA	UB	UC	UD	UE	UF	UG	UH	UI	UJ	UK	UL	UM	UN	UO	UP	UQ	UR	US	UT	UU	UV	UW	UX	UY	UZ	VA	VB	VC	VD	VE	VF	VG	VH	VI	VJ	VK	VL	VM	VN	VO	VP	VQ	VR	VS	VT	VU	VV	VW	VX	VY	VZ	WA	WB	WC	WD	WE	WF	WG	WH	WI	WJ	WK	WL	WM	WN	WO	WP	WQ	WR	WS	WT	WU	WV	WW	WX	WY	WZ	XA	XB	XC	XD	XE	XF	XG	XH	XI	XJ	XK	XL	XM	XN	XO	XP	XQ	XR	XS	XT	XU	XV	XW	XX	XY	XZ	YA	YB	YC	YD	YE	YF	YG	YH	YI	YJ	YK	YL	YM	YN	YO	YP	YQ	YR	YS	YT	YU	YV	YW	YX	YY	YZ	ZA	ZB	ZC	ZD	ZE	ZF	ZG	ZH	ZI	ZJ	ZK	ZL	ZM	ZN	ZO	ZP	ZQ	ZR	ZS	ZT	ZU	ZV	ZW	ZX	ZY	ZZ
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

