



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones
Químico – Biológicas

Maestría en Ciencias en
Biología experimental

TESIS

**Determinación de relaciones genéticas entre individuos de Aguacate Criollo
Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) mediante microsatélites**

Para obtener el grado de:
Maestro en ciencias

Presenta:

Biol. Luis María Suárez Rodríguez

Directores de Tesis:
Dr. Rodolfo López Gómez
Dr. Rafael Salgado Garciglia

Morelia Michoacán, Abril de 2011

IIQB

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FISIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS A CARGO DEL D.C. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ Y RAFAEL SALGADO GARCIGLIA.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño a mis papás:

Rosalba Rodríguez Tovar y Amado Suárez El Cid.

Con cariño y respeto para mis profesores, compañeros y personal del IIQB, en particular al D.C. Rafael Salgado Garciglia y D.C. Rodolfo López Gómez.

A Tí que siempre me guías y me llevas de la mano.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas en especial a la directora Dra. Rosa Elva Norma Del Río Torres por el apoyo recibido para realizar esta tesis en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, y llevar a buen término este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca para cursar los estudios de maestría.

Al Campo Experimental del INIFAP, Uruapan, en especial al Dr. Ignacio Vidales por las facilidades otorgadas.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato por las facilidades otorgadas para realizar parte de este trabajo en especial al Departamento de Ingeniería Genética y el Laboratorio de Genética Molecular.

A mi director de tesis, D.C. Rafael Salgado Garciglia mi gratitud por todas sus enseñanzas no solo en el ámbito profesional, sino también en el ámbito humano, con los cuales aprendí a ser una mejor persona, por su liderazgo y paciencia MUCHAS GRACIAS.

A mi director de Tesis, D.C. Rodolfo López Gómez por su apoyo incondicional en este proyecto, sus valiosos consejos y observaciones en el ámbito profesional, pero más aun en el personal, gracias por brindarme su confianza, por compartir sus conocimientos, experiencias, su paciencia y su amistad.

A la D.C. June K. Simpson W., por haber aceptado ser parte de mi comité evaluador y aun mas por dejar que formara parte de su equipo de trabajo, las facilidades otorgadas, sus conocimientos y observaciones las cuales hicieron posible la realización de la presente tesis.

Al D.C. Mauro M. Martínez Pacheco por aceptar ser parte de mi comité evaluador, así como por su guía, observaciones, tiempo y apoyo brindado.

Al D.C. Carlos R. Sosa Aguirre por su apoyo en la revisión de este proyecto y que con sus conversaciones y observaciones, permitió afianzar conceptos.

A la Biol. Alejandra Hernández García por su apoyo, conocimientos y sobre todo por hacer del laboratorio, un lugar en el que se puede conversar, además de trabajar.

A la Biol. Lorena Carreto Montoya por apoyarme y darme ánimos en todo momento, por sus valiosos consejos y su amistad.

A la M.C. Elda Castro Mercado, que aun sin ser parte de este trabajo me brindo su conocimiento y su amistad.

A la M.C. Emigdia Alfaro Laguna, por su GRAN apoyo y conocimientos brindados sin los cuales este trabajo no hubiera llegado a buen término.

A la M.C. Katia del Carmen Gil Vega por su gran calidad y calidez humana sin menospreciar su gran conocimiento profesional, gracias por hacerme sentir parte del grupo de trabajo.

A la Q. Beatriz Jiménez Moraila, y a todo su MAGNIFICO equipo de trabajo, gracias por todo el apoyo que recibí en algunos o muchos aspectos de mi trabajo y aun mas por esas palabras de afecto.

A la M.C. Martha Patricia Chávez Moctezuma por su ayuda, observaciones y conocimientos brindados.

A todos aquellos profesores de la UMSNH y del IIQB que aun sin ser mis asesores me brindaron sus conocimientos, observaciones y su amistad.

A todos los trabajadores, profesores e investigadores del CINVESTAV que también me brindaron apoyo, ayuda y aliento en los días difíciles.

A todos y cada una de las personas que laboran en el IIQB: biblioteca, técnicos, secretarias, intendencia, a todos ellos gracias por todo el apoyo que recibí y aun mas por sus palabras de ánimo.

A mis compañeros de los Laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Fisiología Molecular de Plantas y Biotecnología Vegetal: Gerardo, Diana, Manuel, Jerónimo, Yadira, D.C. Marco Cortes, D.C. Cesar Rodríguez, Elmar, Berna, Claudia, Rafa, Moy, Jazmín, Ricardo, y Star M.C. Julio.

A mis amigos: Araceli, Liz, Lucia, Deyanira, Esperanza, Libny, Mauricio, Edgar, Alfredo, Sra. Vicky, Sra. Isabel, por brindarme una cálida sonrisa, su amistad incondicional y un “Buen día” en todo momento.

A todas y cada una de las que no menciono pero que por tantos años han sido parte de las etapas de mi vida toda mi gratitud.

A toda mi familia que con su entusiasmo, consejos, sonrisas o regaños.

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

	PÁGINA
I. ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
II. ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
III. ABSTRACT	<i>iv</i>
IV. RESUMEN	<i>v</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Diversidad Genética	4
2.1.1 Diversidad genética de plantas cultivadas	4
2.1.2 Híbridos agronómicos	5
2.2 Sistemática y Diversidad Genética	7
2.2.1 Árboles filogenéticos	11
2.2.2 Marcadores moleculares	13
2.3 Marcadores Microsatélites (SSR)	17
2.3.1 Clasificación de SSR's	22
2.3.2 Aplicación de marcadores SSR's	23
2.4 Modelos para inferir la distancia filogenética de poblaciones	24
2.4.1 Modelo de cambio evolutivo en los sitios de restricción	26
2.5 AGUACATE	27
2.5.1 Orígenes de aguacate	28
2.5.2 Biología del aguacate	28
2.5.3 Variedades silvestres de aguacate	29
2.5.4 Polinización	30
2.6 Persea americana Mill. var. drymifolia	34
2.6.1 Problemática	35
2.7 Descriptores tradicionales del aguacate.	36
2.7.1 Marcadores moleculares en aguacate	37
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVO GENERAL	41
5. OBJETIVOS PARTICULARES	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 Obtención del material genético	42
6.1.1 Material biológico	42
6.1.2 Aislamiento del material genético	45

6.1.2.1	Extracción ADN de hojas	45
6.1.2.2	Extracción de ADN de raíz	46
6.1.2.3	Extracción de ADN de muestras Herborizadas	46
6.1.2.4	Determinación de la concentración de ADN	47
6.2.	Caracterización Genética	47
6.2.1.	Oligonucleótidos	47
6.2.2.	Condiciones de Amplificación.	48
6.2.2.1.	Mezcla de Reacción.	48
6.2.2.2.	Condiciones de Amplificación	48
6.2.3.	Resolución preliminar de amplificadores	51
6.2.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	51
6.2.4.1	Montaje en el Sistema LI-COR® Global IR2	51
6.2.4.2.	Electroforesis de geles de poliacrilamida	52
6.2.4.3.	Preparación de las muestras y carga	53
6.2.4.4.	Procesamiento y análisis de la imagen	54
6.2.4.5.	Exportar los resultados	56
6.3.	Estimación de distancias genéticas.	56
6.3.1.	Construcción de matrices binarias	56
6.3.2.	Construcción de árboles filogenéticos	58
6.3.3.	Visualización del árbol filogenético	59
7.	RESULTADOS	61
7.1.	Extracción del material genético.	61
7.1.1.	Cuantificación del ADN	64
7.1.2.	Prueba de la viabilidad del ADN	64
7.1.3.	Resolución preliminar de los amplificadores	64
7.2.	Caracterización genética	66
7.2.1.	Resolución en geles de Poliacrilamida	66
7.3.	Estimación de distancias genéticas	67
7.3.1.	Análisis de Datos	67
7.3.2.	Tabla de distancias	68
7.3.3.	Arbol filogenético	68
8.	DISCUSIÓN	72
9.	CONCLUSIÓN	85
10.	LITERATURA CITADA	86

I. ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ejemplos del uso de marcadores del tipo microsatélites en la descripción taxonómica moderna.	24
Cuadro 2. Comparación entre las tres variedades silvestres de <i>Persea americana</i> Mill. (Modificado de Bergh y Lahav, 1996).	31
Cuadro 3. Individuos en estudio. De cada individuo fue colectado tejido de hoja y raíz; No. Control: clave asignada para este trabajo.	44
Cuadro 4. Fórmula para calcular la concentración de ADN.	47
Cuadro 5. Lista de Marcadores SSRs de Aguacate probados.	49
Cuadro 6. Condiciones del programa de amplificación de marcadores SSRs en Aguacate.	48
Cuadro 7. Combinaciones de carga en cada uno de los geles de poliacrilamida corridos	54
Cuadro 8. Características de las corridas y datos obtenidas del sistema LI-COR IR ² .	67
Cuadro 9. Distancias filogenéticas obtenidas de la matriz binomial de los corrimientos en el sistema LI-COR IR ² .	70

II. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Base Genética y detección de polimorfismos de microsatélite. Los paneles A y B ilustran genotipos homocigotos (alelos iguales) y heterocigotos (alelos diferentes) para una región genómica que comprende un microsatélite de elementos (CA)/(GT). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR son mostrados con un cuadro blanco, y las flechas indican la dirección de replicación en la reacción de PCR. El panel C ilustra como ejemplo de la detección de fragmentos de ADN amplificados, un gel de electroforesis con diferentes genomas homocigotos (banda única) y heterocigotos (dos bandas) en individuos diploides, como lo es <i>Vitis vinifera</i> L. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).	18
Figura 2. Diferencias entre las flores de individuos de Aguacate, a) flor femenina b) flor estaminada o masculina, c) diagrama floral 1: Sepalo (exterior) Petalo (interior) o tépalos, 2: estambre medio, 3: estambre cercano 4: estambre glandular, 5: Pistilo, d) Tirsas de Aguacate (Whiley et al., 2002).	32
Figura 3. Tipos de flores en los cultivares de aguacate y sus características en apertura dependiendo su tipo.	32
Figura 4. Ciclos de apertura en flores de aguacate	33
Figura 5. Características del Material Biológico aguacate criollo Mexicano, Hojas (A) y raíces (B), muestreadas para obtención de ADN.	43
Figura 6. Esquema general para una reacción de amplificación con marcas fluorescente. (A, B) Las cajas rayadas indican los oligos microsatélite específicos, (C) la caja ondulada la secuencia universal (M13), y la estrella la marca fluorescente. (D) En los primeros ciclos de la amplificación, el oligo sentido con la cola universal se incorpora en los productos de amplificación. (E) Estos productos son entonces el blanco para el oligo de la cola universal etiquetada, que se incorpora durante los ciclos subsecuentes en una temperatura más baja del alineamiento de 56°C. (F) el producto etiquetado final se puede analizar en un sistema de detección con laser.	50
Figura 7. Componentes y forma de ensamblado para el sistema de gel de 25cm de LI-COR Global IR ²	53
Figura 8. Gel representativo de una de las extracciones de material genético procedente de hojas congeladas de aguacate criollo mexicano carriles: 1)	

1Kb DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2) Buffer QIAGEN®; 3) PADb1; 4) PADv1; 5) PADh1. 61

Figura 9. Gel representativo de una de las extracciones de material genético procedente de raíces congeladas de aguacate criollo mexicano carriles: 1) 1Kb DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2) Buffer QIAGEN®; 3) PADb1; 4) PADv1; 5) PADh1; 6) HASS; 7) PADv02; 8) PADb3. 62

Figura 10. Gel representativo de una de las extracciones de material genético procedente de muestras secas herborizadas de aguacate criollo mexicano carriles: 1) 1Kb DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2) Buffer de resuspensión TE 1X estéril; 3) PAA01; 4) PAA02; 5) PAA03; 6) PAG01; 7) PAG02; 8) PAG03. 63

Figura 11. Gel de agarosa TAE 2% para el marcador de aguacate AguaFW17 con tamaño de amplificadas de 70 a 110pb carriles: 1) DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2 – 9) ADN proveniente de muestras de aguacate obtenido con el protocolo de QIAGEN®; 10 – 14) ADN proveniente de muestras de aguacate obtenido con el protocolo modificado de Lin *et al.*, 2001 y columnas Fujifilm®; 15 – 20) ADN proveniente de muestras secas de aguacate. 65

Figura 12. Perfil genético en geles de poliacrilamida 6X de aguacate con el oligo Agua6FW8. 66

Figura 13. Árbol filogenético consenso obtenido con el índice de Nei y Li 1979 con 1,000 de bootstrap con las frecuencias de 17 loci microsatélites para 50 genotipos de aguacate. Las líneas punteadas separan las tres variedades botánicas silvestres Guatemalteco (*P. americana* var. *guatemalensis*; línea interrumpida Azul), Mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*; línea interrumpida Roja) y Antillano (*P. americana* var. *americana*; línea continua Amarilla). 71

Figura 14. Patrón de bandeo de los individuos estudiados rojo de los tres corrimiento efectuados la banda siempre se presento; naranja de los tres dos ocasiones se presento la banda; amarillo ausencia de amplificación de estos loci en las tres corridas. 81

Figura 15. Diagrama de Venn de los juegos de marcadores SSRs utilizados en el presente trabajo. Circulo Rojo corresponde al numero de marcadores compartidos y específicos para los individuos de Aguacate Antillano; Azul: Guatemalteco y Amarillo: Mexicano. Los puntos de intersección entre los círculos informan los marcadores SSR's que comparten entre si. 83

III. ABSTRACT

In Avocado three wild varieties: *P. americana* var. *guatemalensis*; *P. americana* var. *americana*; and *P. americana* var. *drymifolia* have been distinguished. *P. americana* presents a very particular phenomenon undergoing open pollination, and therefore presenting the limitless possibilities and advantages of high genetic variability, the combination between these varieties have produced modern cultivars that are so complex and inadequately characterized for the mixture of the three wild varieties, that it is necessary to protect elite materials from outcrossing with natural populations. In this work profit 50 different avocado genotypes with 17 SSR's markers (Simple Sequence Repeats), Three big groups were identified, *Persea americana* var. *guatemalensis*, *Persea americana* var. *americana* and *Persea americana* var. *drymifolia*. The level of polymorphism detected, identified hibridization degrees in cultivates and wild varieties. Taxonomically classified like *Persea americana* var. *drymifolia*, nevertheless, some avocados presents nondetectable hibridization by morphologic characters, also, were detected specific markers for each wild varieties of avocado, one for *Persea americana* var. *americana*, one for *Persea americana* var. *guatemalensis* and two for *Persea americana* var. *drymifolia*. This SSR's markers can be used for genetic identification of Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*).

IV. RESUMEN

El aguacate presenta tres variedades silvestres: *P. americana* var. *guatemalensis*; *P. americana* var. *americana*; y *P. americana* var. *drymifolia*. Esta especie presenta un fenómeno muy particular ya que es una especie con polinización abierta, y por tanto presenta posibilidades casi ilimitadas para su aprovechamiento, La combinación entre estas variedades han resultado en los cultivares modernos que son tan complejos y regularmente caracterizados inadecuadamente dada su mezcla, que es necesario resguardar materiales elite de las poblaciones naturales. En el presente trabajo se logro diferenciar 50 genotipos de aguacate con 17 marcadores del tipo SSR (Simple Sequence Repeats), Tres grandes grupos fueron identificados, *Persea americana* var *guatemalensis*, *Persea americana* var *americana* y *Persea americana* var *drymifolia*. El nivel de polimorfismo detectado, permitió identificar grados de hibridación entre cultivares y variedades silvestres. La taxonomía clásica ubicó a algunos de estos individuos dentro del grupo de *Persea americana* var *drymifolia*, sin embargo, algunos presentan un grado de hibridación no detectable por caracteres morfológicos, asimismo, fueron detectados marcadores específicos para cada una de las variedades silvestres de aguacate, uno para *Persea americana* var *americana*, uno para *Persea americana* var *guatemalensis* y dos para *Persea americana* var *drymifolia*. Los microsatélites estudiados pueden ser utilizados como un grupo de marcadores genéticos útiles para la identificación de Aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var *drymifolia*).

1 INTRODUCCIÓN

La progresiva alteración del medio ambiente, acelera la pérdida de recursos naturales y de biodiversidad, amenazando la existencia de sus múltiples especies y ecosistemas sobre el planeta. Esto hace necesaria la generación de nuevos conocimientos encaminados principalmente a evitar la pérdida de germoplasma y preservar 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 por sus características de adaptación, resistencia y por los agricultores, por su productividad. Sin la disponibilidad de estos recursos para los centros de investigación agrícola la mejora de variedades no sería posible (Borojevic, 1990).

Las plantas cultivadas poseen una variedad de características que las distinguen, en general, de las especies silvestres. Dichas plantas evolucionan también por medio de la selección artificial y, en pocos casos, poseen características novedosas o extremas en comparación con sus progenitores. El origen múltiple de algunos cultivares y las frecuentes hibridaciones con sus parientes silvestres, se traducen en patrones de diversidad complejos, lo que dificulta la taxonomía de muchos cultivos (Spooner y Lara-Cabrera, 2001). Los intentos por utilizar las descripciones taxonómicas ordinarias, a modo de guía, para la elección de materiales silvestres emparentados como parte de programas de mejoramiento genético, han observado, a pesar de que distintos botánicos han trabajado con las mismas plantas agrícolas, descripciones taxonómicas sumamente contradictorias, sobre todo en el caso de cultivos como papa, maíz, sorgo y trigo. Ha sido tanta la frustración de los botánicos, que ha dado por resultado la “clasificación de acervos genéticos”, en la que las plantas cultivadas y sus parientes silvestres se encuentran clasificadas, exclusivamente, por su

capacidad de intercambio genético. A pesar de que las discrepancias destacaron muy claramente problemas taxonómicos en las plantas agrícolas y su parentela silvestre, aún persisten muchas discrepancias entre las descripciones taxonómicas de los cultivares (Harlan y De Wet, 1971; Spooner y Van der Bergh, 1992).

La técnica de marcadores moleculares es un apoyo para esclarecer la compleja historia evolutiva de los cultivares y a definir sus patrones de diversidad. Se ha recurrido a los marcadores para resolver muchas interrogantes, por ejemplo, determinación de especies, relaciones entre especies, biogeografía, confirmación de hibridaciones e introgresiones naturales y artificiales, evolución de la nodulación, concordancia de distintos conjuntos de datos, determinación de marcadores diagnósticos de registros y especies particulares, discriminación entre herencia autoploiploide y herencia aloploiploide, comprobación de los efectos de la diversidad de los marcadores moleculares sobre la heterosis, diseño y mantenimiento de bancos genéticos, evolución de la domesticación y evolución del genoma (Spooner y Lara-Cabrera, 2001).

Los estudios actuales con marcadores moleculares han tenido por objeto investigar las causas y la solución lógica de las discrepancias de la taxonomía clásica. La cual solo se solucionará mediante estudios continuos y cada vez más refinados sobre los parentescos, que ahora son posibles gracias a la abundancia de información molecular y de otros tipos, y abordando también el problema a partir de la teoría filogenética y de una correcta interpretación de lo que constituye una especie (Azofeifa-Delgado, 2006).

Sin embargo, el enfoque de estudios en ADN no significa que otros datos más tradicionales, igualmente utilizados para caracterizar la biodiversidad, tengan menor valor. Por el contrario, los datos morfológicos, de cruzamiento, ecológicos y de otros tipos “tradicionales”, seguirán proporcionando información indispensable para la caracterización de los recursos genéticos.

Uno de los principales problemas que afectan a las poblaciones de aguacate, son los inevitables apareamientos entre individuos emparentados, debido a los tamaños pequeños de las poblaciones silvestres, traduciéndose en un incremento de la homocigosidad y la inevitable disminución y/o extinción de las poblaciones.

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). Pero esto también representa varios problemas prácticos y restricciones mayores en la clasificación botánica para la producción de aguacate, y además la fijación de caracteres no deseables como susceptibilidad a enfermedades, salinidad, bajas producciones de fruto, calidad, precocidad a madurez, etc., hacen necesario una correcta clasificación de materiales de aguacate.

La falta de información confiable sobre los recursos genéticos del aguacate en nuestro país limita los esfuerzos enfocados a su mejoramiento genético (Gama y Gómez, 1992; Ben Ya'acov, 1995).

Es por esta razón que es necesaria la obtención de materiales de Aguacate que presenten su carga génica natural, pues Michoacán depende en un 99 % del cultivo del aguacate. Es por eso que en este estudio se intenta acrecentar el acervo de caracteres específicos para la caracterización molecular de cultivares como el de aguacate criollo mexicano, por medio de los marcadores moleculares microsatélites.

2 ANTECEDENTES

2.1 Diversidad Genética

La diversidad o variabilidad genética se puede definir como “la habilidad genética para variar”, y por ende, la capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así, que la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000). Esta variabilidad puede ser medida a través de una gran diversidad de parámetros estadísticos que cuantifican la variabilidad genética y resumen la información a términos más manejables. Cada uno de ellos aprecia diferentes aspectos de la variabilidad y su utilidad práctica estará en función del propósito del estudio.

2.1.1 *Diversidad genética de plantas cultivadas*

Las plantas cultivadas evolucionan mediante los efectos, drásticamente distintos, de la selección artificial, en comparación con la selección natural, lo que puede tener un profundo efecto en su morfología y por consiguiente, en su clasificación. A menudo se les distingue de sus parientes silvestres por diferencias morfológicas o fisiológicas artificialmente seleccionadas, novedosas y extremas, relacionadas con la dispersión de semillas, la estructura de la inflorescencia, el tamaño de la semilla y el gigantismo, lo que puede restarle claridad al parentesco con sus progenitores. Algunos caracteres que reducen la adecuación en los hábitats naturales (falta de latencia de la semilla o rompimiento de la semilla), confieren una ventaja selectiva en los hábitats cultivados, distintos de aquellos que no son favorables para el cultivo. Es muy común que las plantas agrícolas y sus parientes silvestres estén estrechamente emparentados. Este parentesco, aparentemente cercano, a veces depende más de conceptos taxonómicos que de diferencias reales entre las especies. Con esto se pretende decir que las especies cultivadas son “sobredescritas” (se reconocen demasiadas especies) con más frecuencia que en los estudios tradicionales (Spooner y Lara-Cabrera, 2001).

Muchas plantas cultivadas divergieron recientemente de sus parientes silvestres y en no pocos casos forman una multitud de híbridos con ellos. Las plantas cultivadas pueden haber surgido muchas veces de una misma especie o de especies distintas. A menudo forman acervos génicos reticulares graduales con sus parientes silvestres, de modo que no siempre es fácil distinguirlos entre las especies (Harlan y De Wet, 1971).

La evolución de las plantas cultivadas, a partir de sus parientes silvestres, significó un conjunto de síndromes de adaptación relacionados con caracteres morfológicos y fisiológicos que varían de un cultivo a otro. Por ejemplo, la domesticación de los cereales abarcó características como el desarrollo determinado de las inflorescencias, la floración insensible a la duración del día, la reducción de la articulación de la inflorescencia madura (resistencia a la rotura), el incremento porcentual de la producción de semillas y el aumento del tamaño y peso de las semillas (Harlan, 1992).

Según la teoría neodarwiniana de la evolución, la adaptación es controlada por un gran número de genes, cada uno con un pequeño efecto (Fisher, 1959). Según estudios acerca de la estructura del genoma, esas características dependen al parecer de relativamente pocos *loci* de caracteres cuantitativos (QTL's), pero con efectos relativamente grandes (Doebley y Stec, 1993), esto ha cambiado el conocimiento acerca del modo y ritmo de la evolución de los cultivos, y sugieren que la evolución puede ser rápida, gracias a los ambientes cambiantes o a la selección artificial de las plantas agrícolas.

2.1.2 *Híbridos agronómicos*

Recientemente se ha observado que los parentescos basados en ADN se relacionan con la geografía, sin embargo no todos son así, esto ha servido para tratar de ubicarlos en un sitio específico ayudándose de la Biogeografía, disciplina

científica que se puede definir como aquella que intenta fundamentar y conocer los patrones espaciales de la biodiversidad (Brown y Lomolino, 1998).

La idea sobre el surgimiento de nuevas especies por hibridación natural, ha empezado a ser considerada seriamente (Anderson, 1949). Se piensa que la hibridación es una fuerza evolutiva mayor en las categorías donde los organismos poseen genomas diploide y poliploide (Rieseberg, 1995). Es posible que los principales datos utilizados para inferir la hibridación hayan sido los rasgos morfológicos aditivos. No obstante, demuestran que las probabilidades de que los híbridos exhiban estados intermedios de un carácter no son mayores que las de los progenitores y, además, que aquellos expresan una variedad de caracteres transgresivos o novedosos (Riesebergh y Ellstrand, 1993).

Asimismo, ha sido cuestionado, que los híbridos son siempre menos aptos que sus progenitores y exhiben coherencia de caracteres (las características paternas siguen asociadas) (Rieseberg, 1995). Los cultivares de muchas plantas agrícolas tienen grandes semejanzas morfológicas, y quizá se derivaron de sus progenitores mediante mutaciones somáticas únicamente. La denominada “dactiloscopia del ADN” es un intento por descubrir descriptores particulares de cada especie. Ciertos cultivares tienen enorme importancia económica y constituyen la columna vertebral de ciertas industrias de orden regional (Vignani *et al.*, 1996; Lamboy y Alpa, 1998).

El flujo génico entre los cultivos y las malezas se considera un fenómeno común en la naturaleza, así como una fuente inagotable de variaciones útiles entre las plantas criollas (no hibridizadas) (Van Raamsdonk y Van der Maesen, 1996). Para esto, es importante definir los conceptos de 1) Autopoliploidía: Multiplicación del juego cromosómico de una misma especie, y 2) Aloploidía: Multiplicación de los juegos cromosómicos de especies distintas. Algunos expertos utilizan este concepto para referirse, asimismo, a las distintas bases genéticas de cada especie. Es fundamental conocer las constituciones genómicas y los patrones

hereditarios al diseñar cruza encaminadas a la mejora genética. Los datos genéticos codominantes, permiten distinguir claramente entre alo y autoploidía mediante las clases de progeie observadas entre las cruza caracterizadas genéticamente (Warnke *et al.*, 1998).

La heterosis, o vigor híbrido, se refería originalmente a la superioridad selectiva de los heterocigotos en cuanto a los caracteres, ininterrumpidamente variables, de tamaño, rendimiento y vigor. Ese concepto fue expandido para incluir ventajas adaptativas, selectivas y reproductoras (Dobzhansky, 1950). Aunque aún se desconocen las bases biológicas de la heterosis, ésta es importante para los expertos en mejoramiento genético, pues comúnmente se supone que la cruza de los progenitores distintos, más no la de semejantes, promueve el éxito genético. Buena parte de la caracterización genética de las plantas agrícolas, tiene por objetivo práctico el descubrimiento de líneas genéticamente diversas para las cruza experimentales (Mumm y Dudley, 1994; Abo-elwafa *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995; Dubreuil *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Menkir *et al.*, 1997).

2.2 Sistemática y Diversidad Genética

La elección de los métodos analíticos adecuados para investigar los límites entre especies está sujeta a un ininterrumpido debate aún por resolverse. Las especies se definen de distintas maneras mediante criterios morfológicos, biológicos y cladísticos. Las especies morfológicas han sido definidas con base en criterios fenéticos intuitivos o computarizados (Sokal y Crovello, 1970). Las especies biológicas (Mayr, 1969) dependen de su capacidad real o potencial de cruzamiento e incluso se han aplicado a las especies los conceptos cladísticos (Hennig, 1966).

Los cladistas investigan el parentesco entre progenitor y derivado con base en el grado en que éstos comparten un caracter derivado, determinado a partir del grado de proximidad de los taxones emparentados (grupos derivados). Puesto que

la capacidad de cruzamiento puede ser un caracter primitivo compartido, los cladistas consideran que este caracter puede ocasionar errores al evaluar el parentesco. Por ejemplo, dos especies estrechamente emparentadas pudieron haber divergido a causa de un mecanismo de aislamiento que les impidió seguir cruzándose, en tanto que otras especies del mismo grupo, aunque más lejanamente emparentadas, quizá conserven la capacidad de cruzarse. En tales casos los conceptos: biológico y cladístico de las especies ofrecen delimitaciones muy distintas entre especies. El intento de aplicar los criterios cladísticos a la definición de especies, ha suscitado muchas críticas en cuanto a las limitaciones teóricas y prácticas del método. Uno de los mayores problemas es que los métodos cladísticos buscan patrones de divergencia, pero las especies constan de poblaciones que potencialmente pueden cruzarse (reticulares) (Maddison, 1995).

Teóricamente, los descriptores taxonómicos útiles para definir especies y taxones subespecíficos, pueden dar resultados cladísticos diferentes, según los grados potenciales de entrecruzamiento y relaciones de ligamiento (Maddison, 1995).

Debido a ello, se ha recomendado que, para la búsqueda de grados de concordancia, los estudios se basen en el uso de múltiples caracteres útiles para los estudios en categorías inferiores (Baum y Donoghue, 1995). Se piensa que una de las aplicaciones más fructíferas son los caracteres de ADN, los cuales ayudarían a encontrar concordancias taxonómicas, definir especies y reducir las “Incongruencias y la falta de acuerdo entre los taxónomos” (Harlan y De Wet, 1971).

El ADN ofrece muchas ventajas que lo hacen particularmente atractivo para los estudios sobre diversidad y parentescos. Esas ventajas son: 1) ausencia de efectos ambientales y pleiotrópicos. El material genético no exhibe plasticidad fenotípica, en tanto que los caracteres morfológicos y bioquímicos varían en muchos casos con el ambiente; 2) se dispone de mayor número de caracteres de

ADN independientes que de datos morfológicos o bioquímicos; 3) es más fácil delimitar los caracteres del ADN como estados definidos en forma de alelos o pares de bases, en tanto que algunos datos morfológicos, bioquímicos y de cruzamiento se comportan como caracteres continuamente variables y, por lo tanto, se prestan menos a los métodos analíticos estrictos; 4) los caracteres del ADN tiene mucho mayores probabilidades de generar características homólogas; y 5) la mayoría de los caracteres del ADN son selectivamente neutrales (Crawford, 1990).

A lo largo del proceso evolutivo todo par de especies descendientes de un ancestro común acumulan cambios en las moléculas de ADN que son, aproximadamente, proporcionales al tiempo transcurrido desde su divergencia. El estudio de estos cambios entre pares de secuencias contemporáneas es la base de una nueva metodología para la reconstrucción de procesos filogenéticos, disciplina conocida como sistemática molecular (Caujape-Castells y Jansen, 2003).

En cualquier población de individuos contemporáneos de cualquier especie se producen de forma constante nuevas mutaciones, material básico para la evolución que queda igualmente plasmado como cambios en las moléculas de ADN de los distintos individuos. El estudio de las relaciones entre distintas poblaciones de una especie, los patrones de intercambio genético entre ellas, la difusión de aquellas variantes especialmente favorables bajo circunstancias ambientales particulares, etc., estudios que habitualmente corresponden al ámbito de la genética de poblaciones, también pueden basarse en la comparación de los patrones de variación entre moléculas de ADN al nivel o niveles (individual, poblacional, comunidad, etc.) adecuados. De esta forma, la relación entre la genética de poblaciones y la teoría de la evolución se amplía desde la fundamentación teórica y formal que representa la primera para la segunda, hasta compartir una misma metodología experimental sobre la que contrastar y basar sus avances (Caujape-Castells y Jansen, 2003). Una excelente introducción a las

distintas ramas de la biología, tanto académicas como aplicadas, que utilizan estas técnicas de estudio de la variación genética a nivel molecular (Avice, 1994).

Para analizar estos cambios en las secuencias de ADN, los investigadores disponen de diversas técnicas experimentales, de complejidad y costo crecientes aproximadamente a medida que aumenta la calidad de la información que proporcionan, así, la secuenciación, es decir, la determinación de la secuencia de nucleótidos de parte de la molécula de ADN, proporciona el mayor grado de información posible, pero a costa de un mayor esfuerzo metodológico y económico y de una reducción muy drástica en la proporción de genoma estudiado. Con el fin de reducir los costos, así como para aumentar la fracción del genoma analizado aún a costa de perder parte de la información, se disponen de técnicas alternativas, basadas muchas de ellas en la digestión con enzimas de restricción. Otras técnicas de análisis de la variación en las secuencias de ADN que son en algunos aspectos asimilables a las anteriores utilizan secuencias más o menos largas de oligonucleótidos para amplificar fragmentos de la molécula original mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La separación de estos fragmentos permite, de nuevo, la comparación entre distintas moléculas de ADN (Hadrys *et al.*, 1992).

Aunado a esto, se utiliza la sistemática, rama de la biología que trata de detectar, describir y explicar la diversidad biológica (Moritz y Hillis, 1996). La sistemática es la disciplina científica de la diversidad, es decir, la organización del conjunto total del conocimiento sobre los organismos. Incluye la información filogenética, taxonómica, ecológica o paleontológica. Es una disciplina de síntesis, de abstracción de conceptos, de enunciado de teorías explicativas de los fenómenos observados (De Haro y Melic, 1998). Sin embargo, ésta no actúa sola, la cladística da una aproximación a la sistemática ya que emplea métodos empíricos para descubrir los taxones naturales y establecer las relaciones genealógicas de importancia evolutiva (Appels y Dvorak, 1982).

Muchos de los problemas fenotípicos antes mencionados se pueden eliminar mediante la identificación directa del genotipo con una prueba de diagnóstico basada en el ADN de los individuos problema. Por esta razón, los caracteres genéticos están siendo integrados en varios sistemas de plantas y se espera que jueguen un papel importante en el mejoramiento y conservación de plantas (Tingey y Del Tufo, 1993).

Los tratados tradicionales para llevar a cabo los estudios cladísticos se basan en estudios que pueden ser morfológicos, anatómicos, de comportamiento, fisiológicos, bioquímicos y recientemente moleculares. Tradicionalmente los recursos genéticos han sido caracterizados por una combinación de caracteres morfológicos y agronómicos (Orozco – Castillo *et al.*, 1994). No obstante, uno de los problemas limitantes de estos caracteres de ADN, es la identificación de individuos estrechamente relacionados (Wetsman y Kresovich, 1998).

Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son la estructura genética de poblaciones (como variación geográfica, heterocigosidad), delimitación de especies (incluyendo híbridos) e inferencia filogenética (Baverstock y Moritz, 1996).

2.2.1 Árboles filogenéticos

La sistemática presenta sus resultados en forma de gráficos que representan las relaciones filogenéticas entre los diferentes taxones tal como son entendidas por un investigador particular. Un árbol evolutivo, fue el nombre acuñado por Ax en 1987 como oposición a cladograma, también se le llama árbol filogenético o cladograma temporalizado. Es una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de un taxón. En este sentido cualquier árbol que indique relaciones filogenéticas puede ser considerado un árbol filogenético, pero su uso se reserva a la Sistemática Filogenética (Christoffersen, 1995). Los árboles filogenéticos reconstruyen la evolución ancestral y pueden proporcionar evidencia de la presión

evolutiva pasada en los genes y sobre los codones individuales. Además de rastrear la ascendencia de los eventos evolutivos, la filogenética molecular podría ser usada para predecir la evolución futura. La habilidad de verificar hipótesis adaptables que usan la filogenética tiene amplias implicaciones para la designación de vacunas, biología genómica y estructural (Bush, 2001).

La filogenética sistemática, o cladística, produce tales árboles, o cladogramas, por medio de la construcción de grupos monofiléticos exclusivamente basados en características basales (Hibbett y Vilgalys, 1991).

En cuanto a la concordancia de los datos, la sistemática ha progresado por medio de una gama de avances conceptuales y de procedimiento, como los datos de cruas experimentales, los datos químicos e isoenzimáticos secundarios y los datos moleculares. El uso de caracteres genéticos independientes para los mismos taxones ha dado resultados filogenéticos discordantes, cuestionando así la utilidad de cualquier juego individual de caracteres o descriptores. Aunque la discordancia de datos puede ocasionar problemas cuando se traducen de manera estricta, los resultados moleculares en hipótesis acerca de la evolución y los tratamientos taxonómicos, también tiene la potencialidad de mostrar posibles problemas con los marcadores individuales o los fenómenos evolutivos (Wendel y Doyle, 1998).

Otra comparación de la concordancia tiene que ver con los datos del pedigrí (co-ancestralidad). Existen problemas potenciales en esas comparaciones, que están basadas en registros incompletos o incorrectos sobre el pedigrí, en suponer una contribución paterna equivalente al genoma del cultivar y la selección neutral de las generaciones subsecuentes, y en diferentes métodos para encontrar estimadores de pedigrí y compararlos con las estadísticas de identidad genética (Graner *et al.*, 1994; Mumm y Dudley, 1994; O'Donoghue *et al.*, 1994; Ahner *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1996; Doldi *et al.*, 1997; Huff, 1997; Paz y Villeux, 1997; Prabhu *et al.*, 1997).

2.2.2 Marcadores moleculares

En los años recientes, la genética molecular ha provisto de un gran número de nuevas y poderosas metodologías con las cuales se construyen relaciones filogenéticas, descartando algunos de las limitaciones de los caracteres de la cladística tradicional. Los marcadores moleculares, caracteres de ADN o descriptores genéticos, se han convertido en una poderosa técnica para la caracterización de plantas (Mailer *et al.*, 1994).

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (SIDTA, 1999).

Un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico) (Valadez y Kahl, 2000).

El uso de marcadores moleculares para resolver problemas taxonómicos en plantas se inició en la década de los setenta del siglo pasado con la electroforesis de enzimas (Gottlieb, 1971), y hacia los ochenta, las técnicas de manipulación y análisis habían avanzado lo suficiente como para poder estudiar la variación de ADN y ARN (Moritz y Hillis, 1996).

La popularidad de estos métodos se basa en que cualquier caracter utilizado para un análisis sistemático debe reflejar cambios genéticos. La eficacia sistemática del caracter utilizado será mayor si no es el resultado de la influencia

del medio sobre el fenotipo, por lo que el uso directo del material genético debe aportar los caracteres más fundamentales para una clasificación (Crawford, 1990), con la ventaja adicional de que el número de datos que se pueden obtener está limitado sólo por el tamaño del genoma (Lafontaine y Tollervey, 2001). Estos datos, debido en parte al gran número de caracteres involucrados, se analizan por métodos de distancia, parsimonia o máxima similitud con los que se obtiene una filogenia (Swofford *et al.*, 1996).

Para la incorporación de nuevos tipos de datos, se ha recurrido particularmente a caracteres moleculares, los cuales han sido necesarios en los casos en los que los taxones donde los caracteres morfológicos, por sí solos, no han resuelto los problemas taxonómicos. Estos datos nuevos pueden provenir de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, incluyéndose reacciones inmunológicas, isoenzimas, las secuencias de proteínas, la hibridación de ADN, y el efecto de las enzimas de restricción en los llamados “RFLP’s” (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y mapas génicos, los “RAPDs” (polimorfismo del ADN amplificado al azar), el “fingerprinting” (huella digital) del ADN y las secuencias de genes particulares (Buth, 1984; Patterson y Guthrie, 1987; Soltis *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1991; Doyle, 1993; Hillis *et al.*, 1996).

Tres importantes componentes han venido a ser más eficiente la genética de poblaciones: 1) Técnicas eficientes para examinar los segmentos informativos del ADN; 2) Estadísticas para analizar datos del ADN; y 3) La disponibilidad de paquetes computacionales de fácil uso, con lo cual se puede dar respuesta a las preguntas biológicas más eficientemente (Sunnucks, 2000).

El desarrollo de la genética evolutiva, es una novedad científica en la cual se asume que los cambios en el desarrollo del control de genes, es el aspecto principal de los cambios evolucionarios en la morfología y comprendiendo la filogenia del desarrollo del control de genes se podrá comprender la forma de la evolución de plantas y animales (Theissen *et al.*, 2000).

En los últimos años, el uso de caracteres moleculares en estudios taxonómicos ha aumentado considerablemente y los caracteres más comúnmente utilizados provienen de las enzimas de restricción y la secuenciación de genes o regiones particulares de ADN (Wals, 2000; Kumar y Filipski, 2001).

Las secuencias potencialmente presentan ventajas sobre otros caracteres moleculares. Entre los procedimientos de secuenciación destaca la aplicación generalizada de los métodos enzimáticos y la tendencia hacia el uso de marcadores no radiactivos así como la secuenciación automatizada. La diversidad de genes más comúnmente utilizados en sistemática son los del ARN ribosomal (nuclear, mitocondrial y de cloroplasto) y el *rbcL* de cloroplasto. En adición a éstos, se están investigando otros genes como las globinas y la alcohol deshidrogenasa del genoma nuclear, el citocromo b y los ARNs de transferencia del genoma de mitocondria, y el “matK” y el “rpo” del genoma de cloroplasto, entre los distintos tipos de caracteres moleculares las secuencias génicas son los más recomendables en la mayoría de los casos (Charlesworth *et al.*, 2001).

Algunas de las razones para usar secuencias génicas en estudios sistemáticos son: 1) Representan una fuente abundante de caracteres (potencialmente cada nucleótido de la secuencia); 2) Tienen diferentes propiedades estructurales y funcionales; y 3) Presentan diferentes tasas evolutivas. Estas tres propiedades se han podido observar tanto en plantas como en animales (Ritland y Clegg, 1987; Soltis *et al.*, 1990; Giannasi *et al.*, 1992).

Un método óptimo de análisis de ADN es aquel que muestra un alto índice de polimorfismo, exhibe una herencia co-dominante, y permite una fácil interpretación de los datos generados. Los marcadores moleculares son herramientas que permiten probar la validez taxonómica de las especies, y sirven como marcadores de diagnóstico particulares para cada especie (Sharma *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1997).

Los marcadores moleculares constituyen nuevas y poderosas herramientas para reinvestigar las hipótesis de hibridación. Una manera de utilizarlos, es buscar en los híbridos capacidad de adición de marcadores específicos para cada progenitor. La utilidad de este método depende del descubrimiento de marcadores únicos de cada especie; sin embargo, esto puede ser difícil porque muchos híbridos se forman entre taxones estrechamente emparentados y que no han divergido lo suficiente para formar marcadores específicos (Azofeifa-Degado, 2006).

Los marcadores moleculares de ADN son muy útiles para confirmar a los híbridos sexuales artificiales, así como la de los híbridos de fusión somática. Los marcadores moleculares son particularmente útiles cuando se cuestiona la hibridación por razones morfológicas o cuando se requiere la depuración temprana de grandes poblaciones supuestamente híbridas (Parani *et al.*, 1997; Thieme *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998).

Los marcadores moleculares han logrado avances rápidos en la clasificación de plantas y animales, debido a su adecuación para abordar diferentes problemas que la clasificación tradicional presenta, gracias a las metodologías utilizadas para producirlos y el diseño estadístico relativo a la elección de taxones y técnicas analíticas los colocan como una gran alternativa. La elección de los marcadores para los estudios filogenéticos o sobre la diversidad, depende de muchos factores. Entre otros, de la diversidad genética entre los registros, debido al extenso polimorfismo y a la escasa concordancia.

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998). Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico

(RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO), entre los más importantes (Patterson, 1987; Soltis *et al.*, 1990; Rallo *et al.*, 2002).

Dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas (Karp *et al.*, 1997): Categoría 1, métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs); Categoría 2, técnicas que utilizan iniciadores (“primer”) arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO; Categoría 3, PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR, Inter secuencias simples repetidas (ISSR). Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la amplificación por PCR.

2.3 Marcadores Microsatélites (SSR)

En buena medida, los requisitos antes mencionados son cumplidos por las secuencias de microsatélites de plantas o SSR's (*Simple Sequence Repeats*) (Rafalsky y Tingey, 1993), estudiadas mediante PCR, marcadores descubiertos y descritos por primera vez como nuevos marcadores de ADN en 1989 por los genetistas de humanos (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989).

Los SSR's son secuencias de entre dos y cinco nucleótidos que se repiten entre 5 y 10 veces (por ejemplo (GA)₁₀, (CAC)₅, etc.), series que a su vez se repiten muchas veces en el genoma entero (Jeffreys *et al.*, 1985; Tautz, 1989). Una de las ventajas de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados, por la mayoría de autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994), ya que son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de

los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y altamente confiables, repetitivos y automatizables, tal y como se puede apreciar en la Figura 1.

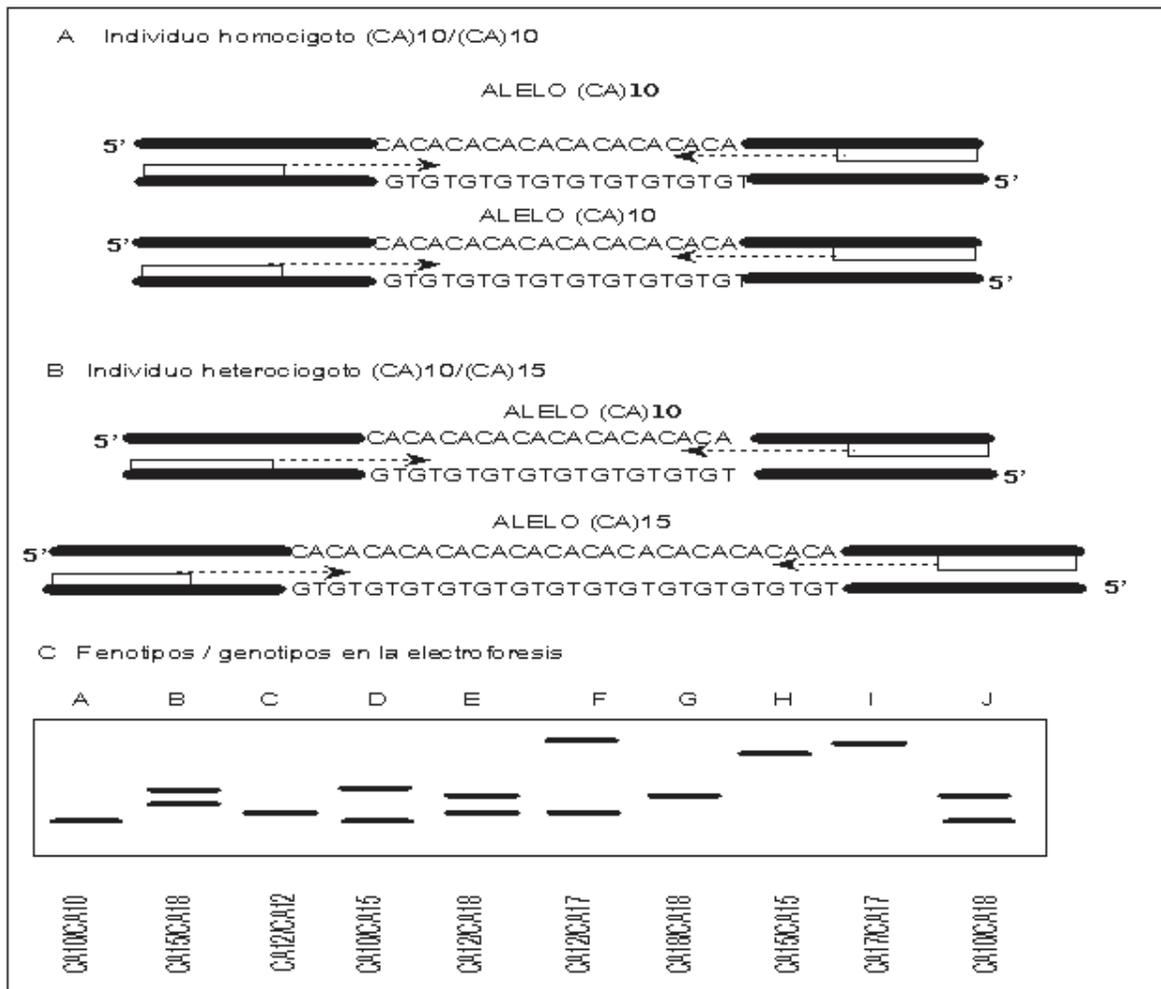


Figura 1. Base Genética y detección de polimorfismos de microsatélite. Los paneles A y B ilustran genotipos homocigotos (alelos iguales) y heterocigotos (alelos diferentes) para una región genómica que comprende un microsatélite de elementos (CA)/(GT). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR son mostrados con un cuadro blanco, y las flechas indican la dirección de replicación en la reacción de PCR. El panel C ilustra como ejemplo de la detección de fragmentos de ADN amplificados, un gel de electroforesis con diferentes genomas homocigotos (banda única) y heterocigotos (dos bandas) en individuos diploides, como lo es *Vitis vinifera L.* (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Este tipo de marcadores se encuentran dispersos a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, y son *loci* altamente mutables (Lagercrantz *et al.*, 1993). Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Hearne *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

En plantas, el uso de marcadores SSR's fue primeramente demostrado en 1992, pero aún no se aplicaba a una escala comparable a la de los humanos u otros mamíferos (Akkaya *et al.*, 1992). Los estudios preliminares de marcadores SSR's en frutos desarrollaron 2 marcadores SSR's y encontraron el nivel de polimorfismo entre especies relacionadas al género *Citrus* (Kijas *et al.*, 1995).

Las repeticiones más frecuentes en las plantas son (AA)_n y (AT)_n (Akkaya *et al.*, 1992; Lagercrantz *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). Estas repeticiones están concentradas en secciones grandes del ADN que no codifican para genes conocidos y que se han llamado macrosatélites (Phillips *et al.*, 1995). Se ha encontrado que las secuencias (GA)_n y (GT)_n y sus complementos (CT)_n y (CA)_n se presentan con más frecuencia y están aleatoriamente espaciadas en el genoma de maíz (Wu y Tanksley, 1993).

Los SSR's representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos (Tautz, 1989; Beckmann y Soller, 1990; Morgante y Olivieri, 1993; Phillips *et al.*, 1995). El desarrollo de marcadores SSRs es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo.

Se ha mencionado que aunque los microsatélites permiten analizar sólo un *locus* por experimento son bastante informativos ya que dejan diferenciar las variantes alélicas de los *loci* analizados y por lo tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, son menos numerosos que otros marcadores dominantes (Cervera *et al.*, 2002). Estos marcadores son ideales para el estudio de ligamiento genético en plantas y el mapeo físico, los estudios poblacionales y la identificación de variedades (SIDTA, 1999).

La tecnología para el análisis de microsatélites es similar a la utilizada para otros análisis (RAPD), con la adición de una evaluación y secuenciación previa para determinar los iniciadores. La detección del polimorfismo SSR se realiza mediante un PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.*, 2004).

Una técnica derivada de la anterior se conoce como “PCR iniciada con microsatélites anclados (AMPPCR)” la cual emplea iniciadores con “anclas” en sus extremos 3’ o 5’. Esta clase de iniciadores consiste de una, dos o tres bases adicionales al microsatélite, por ejemplo; C(CT)₈, CA(CT)₈, CAC(CT)₈ o (CT)₈C, (CT)₈CA y (CT)₈CAC, y sirven para seleccionar aquellas islas de microsatélites en el genoma que están flanqueados con el complemento de bases específicas, por ejemplo; T(TA)₈, GT(GA)₈, GTG(GA)₈ o (GA)₈G, (GA)₈GT y (GA)₈GTG, por lo que se incrementa su especificidad (Valadez y Kahl, 2000). Generalmente esta técnica es más eficiente que las técnicas SSR o RAPDs, ya que ha demostrado detectar más variabilidad genética (Salimath *et al.*, 1995).

El principal inconveniente de la metodología de los SSR's es la identificación de los oligonucleótidos o “primers”, diseñados a partir de secuencias conservadas que rodean a éstos; se han propuesto metodologías alternativas que

no requieren de la clonación de estas secuencias (Yuille *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1992; Thomas y Scott, 1993), pero parecen no ser tan eficientes como los SSR's basados en las propias secuencias aleatorias. Las regiones de secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente a través de PCR a partir de un par de oligonucleótidos específicos (de 20 a 30 bases) complementarias a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Los segmentos amplificados a partir de estos sitios, casi invariablemente presentan un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos. De tal forma, cada "isla" microsatélite, independientemente del elemento repetido (CA, TG, AGT, etc.) constituye un *locus* genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo *locus*.

Estos alelos se heredarían de manera codominante, es decir, que en cada locus un individuo podría presentar uno o más alelos, dependiendo del número de juegos de cromosomas que posea. Por ejemplo, los organismos diploides, es decir, que poseen dos juegos completos de cromosomas y por lo tanto para un locus microsatélite se puede presentar un alelo (si ambos progenitores transmitieron alelos de la misma secuencia y tamaño) o dos alelos (si cada progenitor heredó un alelo de tamaño diferente). En los genomas, particularmente de eucariotas, se cuenta con un amplio número de secuencias repetidas relativamente abundantes. En el genoma de plantas, por ejemplo, ha sido reportado que éstos ocurren aproximadamente cada 6Kb (Cardle *et al.*, 2000).

Las repeticiones de nucleótidos simples han sido utilizadas en el análisis genético de poblaciones en los genomas de cloroplastos (Powell *et al.*, 1995). Fácilmente ensayados con PCR y altamente polimórficos, estas estructuras pueden ser utilizadas como marcadores de mapeo genético (Morgante y Olivieri, 1993) y en poblaciones genéticas (Powell *et al.*, 1995). Se han propuesto programas recomendando el análisis mínimo de 50 individuos no emparentados y un mínimo de 25 microsatélites para realizar estos estudios (Barker *et al.*, 1993).

El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos. Para elegir el tipo de marcador a utilizar, éste debe presentar, además de las características anteriormente descritas, herencia estable, baja tasa de mutación, elevada reproductividad y precisión, no presencia de alelos “nulos”, información del genotipo transferiblemente rápida, que no requiera grandes cantidades de ADN, y que presenten una segregación independiente con los otros marcadores al ser combinados en la prueba (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001).

Con lo anterior puede concluirse que con un buen número de *loci* investigados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una muy buena aproximación de la filogenia. Probablemente este es el campo en el cual han sido más extensamente utilizados, mientras que su otro gran campo de acción ha sido para la construcción de mapas genéticos (proyecto del genoma humano y diferentes proyectos de mapas en eucariotes) (Takezaki y Nei, 1996).

Se piensa que la mayoría de los marcadores moleculares utilizados en las categorías taxonómicas inferiores son selectivamente neutrales, es decir, se supone que las variantes alélicas no le confieren ninguna ventaja competitiva al organismo. Es precisamente, esta propiedad la que los hace útiles para estudio de la diversidad y filogenia. No obstante, algunos marcadores han aumentado al parecer su frecuencia génica de manera no aleatoria, lo que indica ligamiento a regiones del genoma posiblemente influidas por la selección (Saghai Maroof *et al.*, 1995).

2.3.1 Clasificación de SSR's

Los SSR's se clasifican de acuerdo al número de nucleótidos que posea el motivo de repetición como: mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido. La

clasificación también incluye el patrón de orden de los motivos (Chambers y MacAvoy, 2000):

- 1) **Puro o perfecto:** Un solo motivo repetido n veces en serie. ej: $(AC)_9$
- 2) **Puro interrumpido:** Un solo motivo repetido n veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. ej: $(CA)_2AA(CA)_{12}$
- 3) **Compuestos:** Dos o más motivos repetidos en serie. ej: $(GT)_2(TG)_{10}$
- 4) **Compuestos interrumpidos:** Al menos uno de sus motivos presenta nucleótidos intercalados. ej: $(CT)_4(GT)_2CTAT(GT)_{15}$
- 5) **Complejos:** Combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón de orden definido.
ej: $(ACC)_8+TG+(GA)_{12}+(TTA)_5+GC+(TTA)_4$

2.3.2 Aplicación de marcadores SSR's

Las principales aplicaciones son las siguientes: 1) Identificación individual, sexo y paternidad; 2) Parentesco y filogenia intraespecífica; 3) Especiación, hibridación, introgresión; 4) Filogenia de especies, macroevolución; 5) Aplicaciones en biología de la conservación: en dos aspectos fundamentales: i) entender los cambios genéticos que afectan a la supervivencia de especies amenazadas y ii) proporcionar información genética utilizable para la mejor gestión de las especies amenazadas (O'Brien, 1994).

Cuadro 1. Ejemplos del uso de marcadores del tipo microsatélites en la descripción taxonómica moderna.

Autor	Especie	Objetivo
Paransis <i>et al.</i> , 1999	<i>Carica papaya</i>	Identificación del sexo de plántulas.
Staub <i>et al.</i> , 2000	<i>Cucumis melo</i> L.	Análisis de diversidad genética.
Decker – Walters <i>et al.</i> , 2002	<i>Cucumis melo</i> L.	Origen y afinidad de los materiales silvestres en Norte América.
Archak <i>et al.</i> , 2003	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Comparar marcadores en banco de germoplasma.
Krueger y Roose, 2003	<i>Citrus</i> spp.	Caracterización de embriones cigóticos y nucelares.
Billotte <i>et al.</i> , 2005	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	Desarrollo de mapa de ligamiento.
Ge <i>et al.</i> , 2005	<i>Musa</i> spp.	Análisis de la estructura poblacional.
Saxena <i>et al.</i> , 2005	<i>Carica papaya</i>	Medición de la diversidad genética de 10 cultivares comerciales.
Viruel <i>et al.</i> , 2005	<i>Mangifera indica</i> L.	Identificación de genotipos de mango

2.4 Modelos para inferir la distancia filogenética de poblaciones

Recientemente el campo de la biología molecular ha abarcado la bioinformática, la evolución y la filogenética que es el estudio de las relaciones evolutivas entre varios grupos de organismos (Collins *et al.*, 2003).

Si el objetivo es comparar la diferenciación existente entre poblaciones, se estima entonces la divergencia evolutiva entre ellas, sobre la base de sus frecuencias génicas. Para ello, resulta más indicado el uso de los índices de distancia genética que permiten establecer comparaciones y determinar sus relaciones filogenéticas y los análisis de la estructura de la población, mediante el uso de estadísticos (Wright, 1965; Nei, 1987; Weir y Cockerham, 1984); análisis que permiten determinar el déficit o exceso de heterocigotos en la población. Son muchos los ejemplos de estudios de variabilidad y distancias genéticas entre poblaciones cercanas. En eucariontes se han usado tanto para programas de

conservación, en especies en peligro de extinción (Ali *et al.*, 1999; Aranguren-Méndez *et al.*, 2001), como para el estudio del origen geográfico de diversas poblaciones (Bowcock *et al.*, 1994).

Las medidas de distancias genéticas entre poblaciones proveen información importante acerca de las relaciones genéticas existentes entre razas y/o líneas, ayudando a seleccionar y priorizar aquellas a ser conservadas. Existen actualmente diversas distancias genéticas que pueden ser utilizadas para este fin. Sin embargo, se han realizado análisis de simulación para ver cuál de ellas se ajustan mejor a los estudios con microsatélites (Takezaki y Nei, 1996; Nagamine y Higuchi, 2001). Los resultados indicaron que las mejores distancias, utilizando microsatélites, resultaron ser la distancia “DA” de Nei (Nei *et al.*, 1983) y la distancia de cuerda (DC, Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), ambas con el algoritmo neighbour-joining (NJ) como método de reconstrucción filogenética, y cuando el principal interés fuera la correcta asignación de la topología. Mientras que, la distancia estándar de Nei (DS, Nei, 1972) y la distancia de Goldstein (Goldstein *et al.*, 1995), serían de elección cuando el principal interés fuera la estimación de los tiempos evolutivos. Esto es debido al patrón de mutación que presentan los microsatélites.

Diferentes autores (Bjørnstad y Røed, 2001; Eding y Meuwissen, 2001) han reportado el cálculo de las estimaciones de parentesco entre y dentro de poblaciones a partir de marcadores genéticos, mostrando una alta correlación entre las asignaciones de parentesco a través de pedigrí y las asignadas por el método de los alelos compartidos.

De los diversos estimadores propuestos para datos obtenidos mediante análisis de los fragmentos de restricción, por comparación solo del tamaño de los mismos y no de los sitios donde se producen los cortes, el más frecuentemente empleado es el desarrollado por Nei y Li (1979). Nei y Miller (1990) propusieron un método de remuestreo mediante “Bootstrap” para obtener una estimación de la

varianza de ese estimador, mientras otros, han propuesto el uso de un estimador analítico (Elena *et al.*, 1996).

2.4.1 Modelo de cambio evolutivo en los sitios de restricción

Nei y Li (1979) desarrollaron un método para estimar el número, de sustituciones nucleotídicas por sitio entre dos secuencias de ADN cuando los datos de que se dispone son los fragmentos de restricción. Para ello se basaron en el modelo de cambio evolutivo de los sitios de restricción. Sea el número de sitios de restricción en la molécula (o porción de ella) de ADN considerada en un instante, Se supone:

1. Que el contenido esperado de G+C permanece constante.
2. Que la sustitución de nucleótidos se produce de forma aleatoria con una tasa de sustitución por unidad de tiempo (año o generación) (Poisson, 1838)

A medida que transcurre la evolución, algunos de los sitios de restricción originales desaparecerán mientras que aparecerán otros nuevos. la probabilidad de que un sitio original permanezca inalterado al cabo de un tiempo viene dada por la esperanza de cambio por unidad de tiempo.

Para obtener la esperanza pensemos que la enzima de restricción considerada reconoce una secuencia de nucleótidos (habitualmente 4 o 6). La probabilidad de que esta secuencia haya acumulado uno o más cambios en el tiempo será la probabilidad de que la nueva secuencia generada sea un sitio de restricción. El valor de este está relacionado con la distribución de frecuencias en el equilibrio de los cuatro nucleótidos en la molécula de DNA correspondiente y en la proporción con que aparecen los mismos en la secuencia blanco de la enzima de restricción.

Considerando que la divergencia entre los linajes evolutivos o poblacionales asume que sus ADN's se derivan de una secuencia ancestral común a partir de un instante 0. Dada la baja probabilidad de que se produzcan *de novo* y de forma independiente dos nuevos sitios de restricción idénticos en los presentes y en la secuencia ancestral común. Se considerara ahora la relación entre los fragmentos de restricción compartidos entre las dos especies. Para que un fragmento de ADN se conserve a lo largo de varias generaciones se precisan dos condiciones:

1. Los dos sitios flanqueantes al fragmento deben permanecer inalterados.
2. No deben aparecer ningún nuevo sitio de restricción en su interior.

El resultado de esto se representara con el total de fragmentos de restricción observados en las secuencias problema, y se representara también el número de tales fragmentos que son compartidos por ambas secuencias.

Para realizar inferencias sobre la igualdad o no de dos estimaciones, es necesario disponer de un control donde se conozca el patrón a comparar.

2.5 Aguacate

El aguacate (*Persea americana* Miller) pertenece a la familia Lauraceae, una de las familias de plantas vasculares más antiguas en nuestro planeta. Comprende poco más de 50 géneros y unas 2,200 especies. De esta familia se deriva el género *Persea*, el cual tiene dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne*. El aguacate se clasifica dentro del género *Persea*, en el cual solo se reconocen tres especies: *P. americana* Miller, *P. schiedeana* Nees y *P. parvifolia* Williams. Casi todos los miembros reconocidos de *Persea* se localizan 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 género *Persea*. Esa área general coincide en gran parte con el denominado centro de origen VII, que incluye a México, Centroamérica y el Caribe (Sánchez-Pérez, 2001; Bello-González, 2006).

2.5.1 Orígenes de aguacate

Desde ese centro de origen el aguacate se dispersó al sureste de los Estados Unidos, hacia las Antillas, todo Centroamérica y gran parte de Sudamérica: Colombia, Venezuela, las Guayanas, Brasil, Ecuador, El Perú, Bolivia y Chile. Se tienen evidencias científicas de que los antiguos pobladores de México consumían este fruto desde hace diez mil años. Sin embargo, no se sabe cuando se inició la selección consciente del aguacate primitivo en busca de mejor calidad del fruto para su propagación, se calcula que esta especie se sometió a cultivo hace unos seis mil años y que las primeras selecciones efectuadas por los agricultores se pudieron haber iniciado hace dos mil años hacia el año 900 A.C. (Sánchez-Pérez, 2001).

El origen de las formas actuales del aguacate es incierto debido a su estrecha conexión con representantes en civilizaciones muy antiguas del área de México, Guatemala y Honduras. En estudios realizados en la región maya de México y Centroamérica para adentrarse en los aspectos etnobotánicos relacionados con aguacate, se ha concluido que la domesticación 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.

2.5.2 Biología del aguacate

El taxón *Persea americana* lo describió Lineo en su *Species Plantarum* (1753) como *Laurus persea* L. *Clusius* (1610) siendo el primero en utilizar el término *Persea*, tomado de la mitología griega. La descripción de *Persea* se ha

aplicado a la variedad americana publicada por Miller en 1754. En 1759 la referencia se realiza con descripción e ilustración de Plumier (1703). Nees (1836) publicó una revisión general de la familia en el libro *Systema Laurinarum* reconociendo dos subgéneros en *Persea* viz. *Genesiopersea* y *Eriodaphne*. Meissner (1864) reconoció los géneros propuestos por Nees y establece dos secciones iguales. La *Lauraceae americana* fue descrita por Mez (1889) quien dividió *Persea* en dos subgéneros basados en el número de lóculos en las anteras.

Variados nombres fueron propuestos para el género *Persea* tales como *Borbonia* (Boehmer, 1760), *Farnesia* (Heister, 1763), *Menestrata* (Velloso, 1827) y *Tamala* (Rafinesque, 1838), todos para las especies norteamericanas.

Los botánicos describen el fruto del aguacate como monocarpelar con una semilla (Cumming y Shröder, 1942). En el fruto se pueden distinguir: exocarpio, mesocarpio y endocarpio, que en su conjunto constituyen el pericarpio (Biale y Young, 1971). El género *Persea* presenta una carga genómica diploide ($2n = 2x = 24$) (Whiley *et al.*, 2002), y un tamaño de genoma de 883 Mpb (Arumuganatham y Earle, 1991).

2.5.3 Variedades silvestres de aguacate

El aguacate presenta tres variedades silvestres: *P. americana* var. *guatemalensis* o aguacate criollo guatemalteco; *P. americana* var. *americana* o aguacate criollo antillano; y *P. americana* var. *drymifolia* o aguacate criollo mexicano. De estas tres variedades silvestres es posible obtener Cultivares con mejoras de carácter agronómico ya que dependiendo de la carga génica de uno u otra variedad las características de los cultivares cambiarán, es por eso que se han obtenido cultivares de alto valor agronómico como el aguacate cultivar Hass donde su carga génica es: 98% Mexicano y 2% Guatemalteco (Chen *et al.*, 2008), así como éste han surgido infinidad de nuevos cultivares (Cuadro 2).

Las diferencias entre estas tres variedades silvestres saltan a la vista tanto por características organolépticas como fisiológicas.

2.5.4 Polinización

El conocimiento de la biología floral es esencial para la generación de la progenie, autopolinización o entrecruzamiento. La floración del aguacate ha sido reportada y ampliamente estudiada (Degani y Gazit, 1984; Bergh, 1986; Davenport, 1986).

La flor del aguacate es protoginosea (Figura 2) lo que significa que sus pistilos son receptivos antes de liberar el polen. La flor abre dos veces por varias horas cada vez y en cada apertura está separada por al menos un periodo de una noche de separación. La flor es pistilarmente funcional (femenina) durante la primera apertura y estaminada (masculina, liberación del polen) durante la segunda apertura. Bajo temperaturas cálidas o templadas, los cultivares de aguacate caen dentro de una o de los dos grupos (Lahav y Gazit, 1994).

Grupo A: la primera (femenina) lleva a cabo su apertura por la mañana y termina en el atardecer, posteriormente la segunda (Masculina) comienza en la tarde y termina al siguiente día.

Grupo B: Al contrario del anterior la femenina ocurre en la tarde y la masculina abre en la mañana (Figura 3).

Cuadro 2. Comparación entre las tres variedades silvestres de *Persea americana* Mill. (Modificado de Bergh y Lahav, 1996).

Característica		Variedad		
		<i>drymifolia</i>	<i>guatemalensis</i>	<i>americana</i>
Árbol				
General	Región nativa	Sierra Mexicana	Sierra Guatemalteca	Zonas bajas tropicales
	Adaptación climática	Subtropical	Subtropical	Tropical
	Tolerancia a frío	Alta	Intermedia	Baja
	Tolerancia a Salinidad	Baja	Intermedia	Alta
	Tolerancia a metal	Intermedia	Baja	Alta
	Amortiguamiento	Baja	Alta	Baja
Forma	Internodos	Muy Largos	Largos	Cortos
	Ramas de lenticelas	Pronunciados	Ausentes	Ausentes
	Aspereza de la corteza	Baja	Baja	Alta
Hoja	Pubescencia de brotes	Alta	Baja	Baja
	Tamaño	Pequeña	Larga	Muy Larga
	Color	Verde	Verde	Verde pálido
	Rubor de color	Verde	Rojizo	Verde Amarillo
	Aroma anisado	Presente	Ausente	Ausente
	Consistencia cerosa	Alta	Baja	Baja
Fruto				
Flor	Temporada	Temprana	Tardía	Intermedia-temprana
	Botón a madurez	5 -7 meses	10-18 meses	6-8 meses
	Persistencia del perianto	Mayor	Menor	Menor
Brote	Longitud	Corto	Largo	Corto
	Grosor	Mediana	Gruesa	Delgada
	Forma	Cilíndrica	Cónica	Cabeza de clavo
Fruto	Tamaño	Pequeño a mediano	Pequeño a Grande	Mediano a Muy grande
	Forma	Mayormente elongado	Mayormente redondeado	Variable
Cascara	Color	Usualmente purpura	Negra o verde	Verde pálido /Marrón
	Superficie	Capa cerosa	Rugosa Variable	brillante
	Grosor	Muy delgada	Gruesa	Mediana
	Células piedra	Ausentes	Presentes	Leve
	Flexibilidad	Membranosa	Tiesa	Coráceo
	Desprendimiento	No	Variable	Si
Semilla	Rango semilla/fruto	Grande	Pequeño	Grande
	Endocarpo	Delgado	Delgado	Grueso
	Desprendimiento de la cavidad	Si	No	Si
Pulpa	Superficie	Lisa	Lisa	Rugosa
	Sabor	Anisado, picante	Agradable	Dulce, suave
	Contenido de aceite	Alto	Alto	Bajo
	Fibra	Común	Poco común	Intermedio
Almacenamiento a bajas temperaturas		Mayor	Mayor	Menor

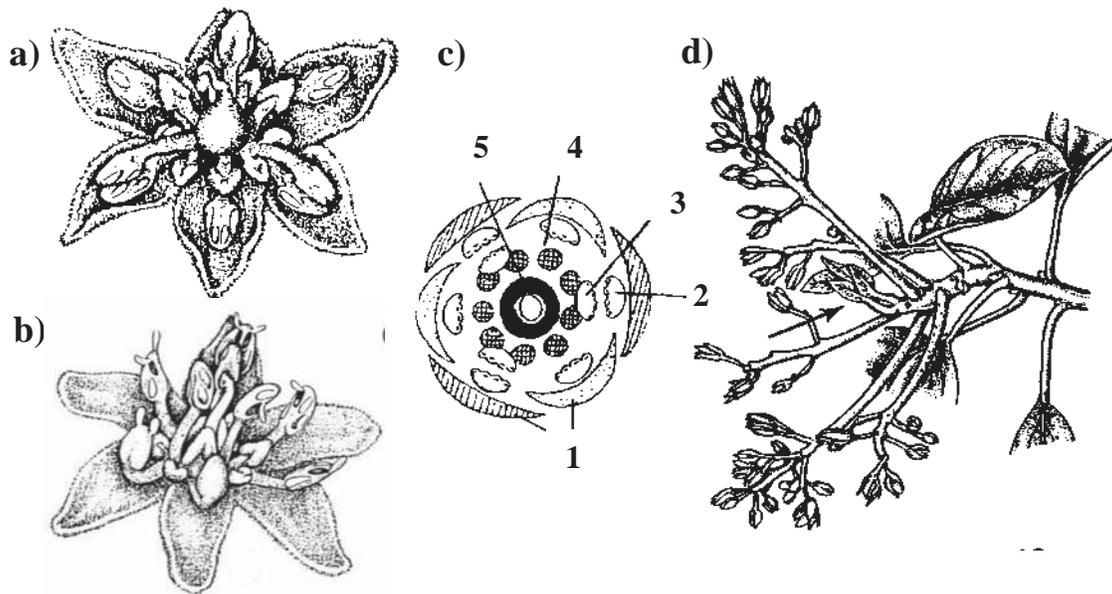


Figura 2. Diferencias entre las flores de individuos de Aguacate, a) flor femenina b) flor estaminada o masculina, c) diagrama floral 1: Sepalo (exterior) Petalo (interior) o tépalos, 2: estambre medio, 3: estambre cercano 4: estambre glandular, 5: Pistilo, d) Tirsas de Aguacate (Whiley *et al.*, 2002).

		Mañana	Tarde
Tipo de flor	A	♀ ↑	♂ ↓
	B	♂ ↓	♀ ↑

Figura 3. Tipos de flores en los cultivares de aguacate y sus características en apertura dependiendo su tipo.

Estos grupos son importantes y recíprocos, este sistema es importante para llevar a cabo la polinización cruzada. Cuando las temperaturas ambientales comienzan a hacerse más frías la apertura y cierre de las flores se da de manera retrasada. Adicionalmente más de una noche se encuentra inmersa entre el cierre y apertura de uno u otro estadio de la flor (masculina o femenina) (Degani y Gazit 1984) (Figura 4).

		Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
Tipo de flor	A	♀			♂
	B		♀	♂	

Figura 4. Ciclos de apertura en flores de aguacate

El tiempo de floración varía con cultivares y clima. Con temperaturas bajas, la temporada de floración es más larga. Los cultivares guatemaltecos usualmente tardan más que en los otros dos cultivares. Cada árbol florece continuamente por cerca de dos meses, y es raro que el más adelantado termine antes de que comience el más retrasado.

Las flores se agrupan en cimas terminales o tirsas (figura 2) de docenas de cientos de flores cada una (Scora *et al.* 2002). Por lo tanto un solo árbol puede tener millones de flores durante un solo periodo de floración y solo producir de 100 a 200 frutos maduros. Este bajo rango de frutos hace impracticable la polinización asistida (manual) de los árboles.

2.6 *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*

Sinonimia: *Persea drymifolia* Schlecht. and Cham. (Schlechtendahl, 1831), *Persea gratissima* var. β *oblonga* Meissn. (Meissner, 1864); *Persea gratissima* var. *drymifolia* (Schlecht and Cham.) (Mez, 1889); *Persea gratissima* var. *melanocarpa*. Phil. (Philippi, 1895).

Árboles de 15 m de alto, rebrotes con moderadas pubescencias pálidas, rojizas flexibles confiriendo una apariencia aracnoide. Hojas verde oscuro, aromáticas anisadas o a corteza, las laminas de las hojas de 5 a 20 cm de longitud, 3 a 12cm de ancho elíptico, ápices agudos, raramente acuminados, bases agudas o acuminadas, superficie adaxial glauca, superficie abaxial de escasa a moderadamente pubescente con pelos flexibles, glaucos o con gránulos ceríferos, de 6 a 9 pares de venas divergentes a 35 a 55°, moderadamente a prominentemente impresas en la superficie abaxial; peciolo de 1 a 4cm de longitud. Inflorescencias en tirsas subterminales, múltiples, con brácteas subtendidas ferruginosas, pubescentes en ambas superficies con pelos flexibles, pedicelos de 5mm de longitud con pubescencias flexibles. Flores regulares, estambres de 2 a 3mm de longitud, anteras cuadriloculares; estaminodia sagitata; gineceo pubescente. Frutos de 3 a 6 por bráctea terminal, de 4 a 12cm de longitud, ovoides o ampliamente piriformes, exocarpo delgado, verde oscuro, marrón, púrpura o negro, olor anisado; semilla larga ovalada, superficie lisa embebida en una cavidad (Van der Werff y Lorea, 1997).

2.6.1 Problemática

La conservación de razas y/o poblaciones ha tomado un gran auge, debido principalmente a la concientización del hombre en la necesidad de preservar los recursos genéticos.

Para ello una de las primeras etapas de un programa de conservación de especies, consiste en la evaluación de su variabilidad genética y la distribución de

ésta entre sus poblaciones, así como la posible detección de alelos raros que nos indiquen la presencia de variantes genéticas únicas (González-Candelas y Montolio, 2000).

Uno de los principales problemas que afectan a las poblaciones minoritarias, son los inevitables apareamientos entre individuos emparentados, que se traduce genéticamente en un incremento de la consanguinidad (homocigosis) con la consiguiente depresión consanguínea; una reducción de los valores medios fenotípicos de los caracteres productivos y reproductivos, y por último, y como consecuencia de esos problemas reproductivos, la inevitable disminución y/o extinción de la población.

En el área de origen del aguacate con sus tres variedades silvestres, se ha dado a través de miles de años un proceso que ha generado una diversidad genética (Ben Ya'acov *et al.*, 1992a); decenas de miles de árboles silvestres provenientes de semilla existen actualmente bajo condiciones ecológicas muy variadas. La selección natural principalmente, y la selección del hombre durante miles de años, han producido tipos adaptados a diferentes regiones (Ben Ya'acov, *et al.*, 1992a; 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 falta de información confiable sobre los recursos genéticos del aguacate en nuestro país limita los esfuerzos enfocados a su mejoramiento genético (Ben Ya'acov, *et al.*, 1992a; Gama y Gómez, 1992).

En el sistema común de propagación del aguacate no se garantiza la pureza genética del portainjerto, solamente se puede garantizar la pureza del injerto por su naturaleza somática, esto es debido a que el aguacate (*Persea americana* Mill.) posee una polinización cruzada altamente heterocigótica, lo que dificulta la obtención de una planta con características deseables (Castro *et al.*, 1995).

2.7 Descriptores tradicionales del aguacate

Los rasgos morfológicos han sido los clasificadores más antiguos y ampliamente usados, y estos pueden ser óptimos para ciertas aplicaciones en el manejo de germoplasma. Su primera ventaja versus otros descriptores son: la simplicidad y rapidez, bajo costo, y que pueden clasificar un individuo de herbario o con tejido muerto.

Tradicionalmente las variedades de *P. americana* Mill., han sido catalogadas, descritas u ordenadas gracias a caracteres morfológicos tales como longitud, anchura y forma de hojas; tamaño, color y forma de frutos; ausencia o presencia de aroma, entre algunos más, sin embargo, todos estos descriptores, presentan amplios rangos de divergencia entre lo permitido dentro de una variedad y la siguiente (Whiley *et al.*, 2002).

Estos descriptores aunque simples han formado parte de la clasificación actual de materiales de *P. americana* Mill., aunque dado el grado de tolerancia entre uno y otro, no son infalibles y por tanto no son detectables pequeñas características de alguna otra variedad dada genotípicamente hacia el fenotipo del individuo, por lo que puede estar incurriendo en errores en la elección de materiales a resguardo en bancos de gemoplasma, aminorando el grado de materiales representativos silvestres puros o sin grado de hibridación, con otra variedades o cultivares, logrando así un inefectivo rescate de biodiversidad.

Aun mas, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, por ejemplo la presencia o ausencia de espinas en algunas plantas (Azofeifa-Delgado, 2006).

Dado que los marcadores moleculares no sufren de estos estados de alteración o posible indetección por factores abióticos, son factibles de ser utilizados y evaluar el estado que guardan materiales de *P. americana* Mill., y lograr su correcta clasificación.

2.7.1 Marcadores moleculares en aguacate

En apenas pocos años cuatro tipos principales de marcadores han sido utilizados en aguacate (Degani *et al.*, 1990; Lavi *et al.*, 1994b) utilizando principalmente isoenzimas para estudiar el nivel de cruza entre cultivares como el “Fuerte”. Por otro lado se han utilizado dos RFLPs para estudiar las interrelaciones entre especies y cultivares de *Persea* (Furnier *et al.*, 1990), y en general para identificación de cultivares y variedades al mismo tiempo (Lavi *et al.*, 1991) así como para la detección de unión entre locus que afectan el color del ectocarpo y bandas para la inferencia de huella genética de ADN (Mhameed *et al.*, 1995). Al igual, se han realizado comparaciones de tres técnicas de marcadores moleculares ISSRs, RAPDs y RFLPs para la identificación de genotipos en aguacate de la variedad “Bacon”, “Fuerte” y “Zutano” (Clegg *et al.*, 1999).

La utilización de marcadores del tipo RAPDs y SSRs para la construcción del mapa genético de cultivares de aguacate “Pinkerton” y “Ettinger” donde se encontró que los motivos más frecuentemente encontrados en estos cultivares son los del tipo $(A/T)_n$ y $(TC/AG)_n$ los cuales, ocurren cada 22Kb y 13Kb respectivamente, esto se obtuvo a partir de 113 de 172 clonas secuenciadas y de estas 92 posibles marcadores específicos de aguacate fueron analizados para detectar el nivel de polimorfismo de estos en los cultivares en estudio y llegar a un

total de 12 grupos de enlace y 34 marcadores (25 SSRs, 3 RAPD y 6 DFN: DNA fingerprint) (Sharon *et al.*, 1997).

Los DFP y SSRs han sido utilizados para estimar el nivel de heterocigocidad en el genoma del aguacate (Mhameed *et al.*, 1996), y detectar las relaciones genéticas en el género *Persea* (Mhameed *et al.*, 1997).

Se ha calculado la probabilidad de que dos cultivares no relacionados o variedades presenten un mismo patrón de bandeo. La nula relación entre variedades naturales de aguacate se ha aceptado por el patrón de bandas del ADN representando cada variedad (Lavi *et al.*, 1994).

Hasta el 2005 alrededor de 6183 secuencias se han analizado y 100 se han seleccionado como marcadores basados en el tamaño, localización y tipo de SSRs, de los cuales 96 solo son marcadores SSRs informativos (Lavi *et al.*, 1994; Sharon *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 2004), en donde algunos no amplifican en todas las variedades de aguacate (Ashword *et al.*, 2004). Por ejemplo, 14 de 35 SSRs fueron convenientemente analizados para huella génica en la divergencia de materiales de aguacate (Schnell *et al.*, 2003). Para incrementar el número de marcadores SSRs útiles, un pequeño grupo de ESTs de *Persea americana* fueron generados como parte del proyecto del genoma floral, donde se buscó el identificar marcadores SSRs específicamente para variedad de *Persea americana* var. *americana* o aguacate criollo antillano donde el interés o el principal esfuerzo era el proveer información acerca de la mejora de la tolerancia del aguacate antillano al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* (Alberts *et al.*, 2005).

El desarrollo de 100 adicionales SSRs a la base de datos hasta entonces existente en el 2006 proveyería una mejor cobertura del genoma del aguacate para estudios de asociación y acoplamiento en el mapeo, y así divisar el futuro programa de selección asistida por marcadores en aguacate (Borrone *et al.*, 2007).

Se ha empleado la resecuenciación de datos acoplado a análisis estadísticos para tratar de revelar la historia genealógica de la domesticación del aguacate e identificar el origen de híbridos y de varios cultivares y así estimar las fuentes geográficas que contribuyeron a los genomas de los cultivares modernos (Chen *et al.*, 2008b; Chen *et al.*, 2008).

Se ha recurrido a esta técnica también para genotipificar y caracterizar accesiones de aguacate bajo resguardo en bancos de germoplasma españoles, utilizando 16 marcadores SSRs, el índice de similaridad de Nei y Li y UPGMA (Método no ponderado de grupos pares con medias aritméticas; por sus siglas en inglés) donde se ha obtenido grados altos de información como el nivel de heterocigocidad, grado de hibridación y situación real de los materiales, lo que ha permitido un buen manejo y resguardo de los materiales de interés (Alcaraz y Hormanza, 2007).

La utilización de 14 marcadores SSRs en 224 accesiones en Florida y California, han mostrado un panorama real del resguardo de materiales considerados como una u otra variedad botánica, ya que muchas veces han estado incorrectamente etiquetadas o descritas, incluso híbridadas entre una y otra variedad que puede llegar hasta el 7% del total de materiales (Schnell *et al.*, 2003).

Para diferenciar 35 cultivares de aguacate y dos variedades, fueron utilizados 25 marcadores SSRs. Utilizando la comparación de técnicas de RFLPs y SSRs para determinar las relaciones filogenéticas que guardan los materiales, ya que muchas veces las características botánicas son difíciles de determinar e igualmente difícil obtener la información del pedigrí, y determinar el complejo estatus de hibridación que presentan los materiales, ya que muchas veces estos entrecruzamientos han sido muy antiguos (Ashworth y Clegg, 2003).

3 HIPÓTESIS

Los individuos de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) presentan variaciones únicas en su secuencia del ADN útiles para estimar la diversidad genética entre ellos.

4 OBJETIVO GENERAL

Estimar la diversidad genética de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) mediante microsatélites.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer el método de extracción de ADN en hojas y raíces de individuos de aguacate criollo mexicano.
2. Caracterizar genéticamente individuos de aguacate criollo mexicano mediante SSR's.
3. Estimar la distancia genética de los individuos de aguacate criollo Mexicano.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención del material genético

6.1.1 Material biológico

Para determinar el material a utilizar, se consideraron algunos puntos:

- a) Obtener materiales previamente caracterizados como aguacate criollo mexicano, preferiblemente resguardados en un Banco de Germoplasma.
- b) Muestrear individuos provenientes de viveros comerciales de la zona aguacatera de Michoacán.
- c) Obtención de materiales plenamente identificados como Aguacates criollos Guatemaltecos y Antillanos.

Los Aguacates criollos mexicanos fueron los utilizados para la determinación de la variabilidad genética, identificación y determinación de su estado dentro de la clasificación del banco de germoplasma.

Se realizaron colectas de Marzo a Agosto del 2008, en el Banco de Germoplasma INIFAP (Instituto de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias), ubicado en Uruapan, Michoacán, México (19°23'N; 102°04'W).

El banco cuenta con 648 individuos de aguacate (accesiones), creado a partir de semillas y esquejes de las tres variedades de aguacate criollo (Mexicano, Guatemalteco y Antillano) y otras especies de *Persea* como *P. schiedeana*, recolectados de diferentes Estados de la República Mexicana (Sánchez-Pérez, 1999). Estos materiales fueron caracterizados morfológicamente, cada árbol cuenta con una clave, el cual indica su lugar de procedencia y su origen vegetal.

Para este trabajo se utilizaron hojas jóvenes de aguacate criollo mexicano, preferentemente de rebrotes de color rojizo a color verde brillante, textura suave y visiblemente sanas, al igual que raíces de estos mismos individuos donde el material seleccionado, fue raíces jóvenes de color blanco amarillento, suaves y no lignificadas (Figura 5). Las muestras se limpiaron con agua destilada y se colocaron en bolsas plásticas herméticas, se etiquetaron e inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido para su transporte, y posterior almacenaje en ultracongelación (-80°C), hasta su utilización.



Figura 5. Características del Material Biológico aguacate criollo Mexicano, Hojas (A) y raíces (B), muestreadas para obtención de ADN.

Se obtuvieron muestras también en un vivero de propagación de aguacate Hass, en la ciudad de Uruapan, Michoacán. Colectándose hojas y raíces con las mismas características antes descritas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Individuos en estudio. De cada individuo fue colectado tejido de hoja y raíz; No. Control: clave asignada para este trabajo.

Muestras	Localidad	Variedad	No. Control
007-02, 015-03, 019-02, 020-02, 020-03, 021-04, 037-01, 065-03	Uruapan, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb5, PADb6, PADb7, PADb8, PADb9, PADb12, PADb14, PADb17
001-01	Sn. Angel Zurumucapio Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb1
001-02, 006-01	Querendaro, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb2, PADb3
006-02	Sta. Clara del Tule, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb4
020-04, 020-05	Rincón de Barranquilla, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb10, PADb11
033-01, 063-02	San Pedro Bocaneo, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb13, PADb15
064-08	Patamban, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb16
086-04	Zitácuaro, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb18
139-01, 143-02	Tingambato, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb20, PADb21
095-01	San Juan de la Vega, Gto.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb19
311-01	Sta. Ma. Pipioltepec, Edo. Mex.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb22
501-01	San Miguel, Pue.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb23
531-02	Jalacingo, Ver.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADb24
P1, P2 P3, P4	Perivan, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADh1, PADh2, PADh3, PADh4
PJ	Santiago Tangamandapio, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADh5
CI-01, CI-02, CI-03, CI-04, CI-05, CI-06, CI-07, CI-08, CI-09, CI-10, CI-11, CI-12	Uruapan, Mich.	<i>Persea americana</i> var <i>drymifolia</i>	PADv1, PADv2, PADv3, PADv4, PADv5, PADv6, PADv7, PADv8, PADv9, PADv10, PADv11, PADv12
PT3	Riverside, CA.	<i>Persea americana</i> Mill.	PAHC1
GTI	Ziracuaretiro, Mich.	<i>Persea americana</i> Mill.	PAHC2
HASS	Uruapan Mich.	<i>Persea americana</i> Mill. cv. Hass	PAHC3
389-03A	El Carmen, Camp.	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	PAA1
404-01A	Bakachan, Camp.	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	PAA2
617-01A	Oxkutzcab, Yuc.	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	PAA3
402-04G	Sacatepec, Guatemala	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	PAG1
591-04G, 593-01G	Sololá, Guatemala.	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	PAG2, PAG3

Como controles externos, se obtuvieron hojas secas de individuos de aguacate Guatemalteco y Antillano así como a un individuo del cultivar Hass procedente de una huerta de Tingambato, Michoacán.

6.1.2 Aislamiento del material genético

Los tejidos de aguacate al igual que otras especies de plantas, presentan metabolitos secundarios como taninos y fenoles que dificultan la obtención del material genético inhibiendo la acción de enzimas utilizadas en los ensayos. Generalmente el ADN obtenido es de baja pureza e inmanejable en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y dado que aguacate es un individuo en estudios moleculares recientemente propuesto, las técnicas disponibles específicas para esta planta aun están por establecerse.

Por lo tanto en este trabajo se realizó una prueba de diferentes protocolos de aislamiento de ADN genómico: Clarke *et al.*, 1989; Doyle y Doyle 1990; López-Gómez y Gómez-Lim 1992; QuiaQuick Kit Maxi QIAGEN®; DNA Quick Gene Mini 80 Fujifilm®; Deshmukh *et al.*, 2007; Dnyaneshwar *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2001; Porebski *et al.*, 1997. Todos ellos han sido utilizados con éxito en diferentes especies vegetales.

6.1.2.1 Extracción ADN de hojas

Para la extracción de ADN proveniente de hojas frescas de aguacate se empleó el kit comercial QIAquick Kit de QIAGEN® con su protocolo Maxi, el fundamento de este kit es la utilización de un buffer de lisis celular, un buffer de lavado que retira metabolitos secundarios, proteínas y polisacáridos, seguido de un buffer de precipitación de ADN. Este método además se complementa con el sistema de dos columnas, la columna QIAshredder Maxi Spin atrapa restos de componentes de los pasos anteriores y la columna DNeasy Maxi Spin la cual en un primer paso captura la molécula de ADN, para realizar una limpieza más

profunda con la ayuda del buffer de lavado y posteriormente recuperado en un estado puro, obteniéndose material genético de alto peso molecular consistente con las características de ADN genómico y con una buena calidad en cuanto a cantidad y limpieza.

6.1.2.2 *Extracción de ADN de raíz*

La metodología utilizada para la obtención de este material genético surge de la adecuación de metodologías reportadas previamente en organismos de características similares, como el alto contenido de metabolitos secundarios y polisacáridos contenidos en este tejido, y para hacer eficiente la obtención de material genético se utilizó el buffer de lisis celular modificado de Lin *et al.*, 2001 y el kit del sistema QuickGene Mini 80 de Fujifilm® el cual consiste en un buffer de lisis celular, uno de lavado y uno de resuspensión y almacenaje, donde el buffer de lisis fue sustituido por el modificado de Lin *et al.*, 2001, obteniéndose material genético de alto peso molecular y buena calidad y cantidad.

6.1.2.3 *Extracción de ADN de muestras Herborizadas*

Debido a que la manera en que más fácilmente puede ser intercambiado material biológico, que no conlleve problemas para su transporte, debido a que se tenga que presentar periodos de cuarentena, descontaminación o incluso pérdida del material, en el caso de hojas de plantas, es por medio del transporte de material biológico seco o herborizado, así que a este respecto se contó con la donación de material previamente identificado como *Persea americana* var. *americana* y *Persea americana* var. *guatemalensis*, el cual se transportó en bolsas herméticas con gel de sílice, en la cual se encontraban inmersas las hojas de los materiales.

El resultado fue la obtención de un sistema de tres soluciones: una de lavado que permitió rehidratar y quitar metabolitos secundarios tales como savia y componentes fenólicos que interfirieran con la lisis, una de extracción la cual hizo

la función de solución de lisis como el de los protocolos donde se utilizó material fresco y una de almacenaje que permitió almacenar el material hasta su uso para evitar su degradación.

6.1.2.4 Determinación de la concentración de ADN

Se realizaron lecturas de absorbencia de las extracciones de material genético en un espectrofotómetro BioPhotometer, Eppendorf (Hamburg, Germany) a una longitud de onda de 260 y 280nm para calcular la calidad y cantidad respectivamente. Para calcular la concentración de ADN ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de las muestras, éstas se diluyeron en un tubo Eppendorf (995 μL de agua destilada estéril y 5 μL de ADN obtenido), se realizaron las lecturas en espectrofotómetro. La cantidad de ADN contenido en la muestra se determinó con la fórmula mostrada en el cuadro 4 (Sambrook *et al.*, 1989).

Cuadro 4. Fórmula para calcular la concentración de ADN.

$$\text{ADN}_{(\mu\text{L}/\text{mL})} = \frac{(\text{DO}_{260})(\text{FD})(50\mu\text{L}/\text{mL})}{1000}$$

Donde:
DO = Densidad óptica
FD= Factor de dilución
50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ = Factor de corrección (Constante para ADN)

6.2 Caracterización Genética

6.2.1 Oligonucleótidos

Para detectar las diferencias a nivel genético entre genotipos de aguacate se utilizaron secuencias tipo SSRs obtenidas usando una base de datos de ESTs de aguacate (Plant genome Network <http://pgn.cornell.edu/>) y los microsatelites fueron identificados usando la base de datos de microsatelites de algodón (Microsatellite

data base SSR Server (Clemson University Genomics Institute http://www.mainlab.clemson.edu/cgi-bin/cmd/cmd_ssr) (Borrone *et al.*, 2007). El número y características de las secuencias SSRs se presentan en el cuadro 5.

6.2.2 Condiciones de Amplificación

6.2.2.1 Mezcla de Reacción

Para llevar a cabo la amplificación de los marcadores SSRs en aguacate, se utilizaron oligos Sentido con marca infrarroja IDR-700 e IRD-800 (Eurofins MWG Operon, Alababa USA) y oligos Antisentido sin marca (Sigma-Aldrich®). La reacciones se realizaron en un termociclador 2720 (Applied Biosystems®). Cada reacción contenía 0.1µM de primer sentido y 0.1µM de primer antisentido, 200µM de dNTPs, 1x de buffer para PCR con 1.5mM MgCl₂, 1U de Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen® Cat. No. 10966-020) y 20ng de DNA en un volumen total de 10µL.

6.2.2.2 Condiciones de Amplificación

Para la amplificación, el programa estuvo compuesto como a continuación se describe:

Cuadro 6. Condiciones del programa de amplificación de marcadores SSRs en Aguacate.

94°C	2 min		Desnaturalización inicial
94°C	20 seg	}	5 ciclos
60°C	45 seg		
72°C	1 min		
94°C	20 seg	}	35 ciclos
56°C	45 seg		
72°C	1 min		
72°C	10 min		Extensión Final

Cuadro 5. Lista de Marcadores SSRs de Aguacate probados.

No.	Nombre del Oligo	Secuencia de oligos		Tipo de repetido
		Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')	
1	Agua1FW7	GGAGCGAGAAAGAGCAGCCGA	CTGCCACGCCCATCTGCTTAC	(GAG) ₇ (AG) ₈ TTG(GA) ₂ AG
2	Agua2FW8	CTGGTCCCAAAATTGAAGA	AGCACAACTGACATGAAACA	TC(TA) ₂ CA(CT) ₁₂
3	Agua3FW7	TCACTGCTCTCTTCTTGCCC	ATCTATTGCCCTCTTGACTCACT	(TC) ₂ GCA(TC) ₁₄ (TG) ₂ N ₆ (CAAA) ₂
4	Agua4FW8	TCTCTTCATCAACTCGACTGC	AACGGTATCCAAACGCTAAT	CC(TTCT) ₂ (TTA) ₂ CAA(CT) ₁₆ TT(CT) ₂
5	Agua5FW7	GGTTTTCCAAATTCCTCTATCCCC	TTGATGCCTGCTTCCGTGTG	(CT) ₁₄
6	Agua6FW8	GCAAGGCATTACGATGTCA	CTCTAGTGGACAAAATCGACAA	(CT) ₁₆
7	Agua7FW7	GCCAAGCTCGACAAGATATGA	TCTTCCACAACCCAGCAAATG	(TAGATA) ₂ (GAA) ₂ TTTC(CT) ₁₂
8	Agua8FW8	TGTTTCGCTCTTAACCTCCAT	CGCAAAAAGCACACCTCTG	T(CTT) ₂ CCATATC(CT) ₁₄
9	Agua9FW7	GGGCTTCAATTCAATCCCAATCC	TCTTCAGCACGCCACGAGTCT	(C) ₂ (GA) ₇
10	Agua10FW8	GCAGAAGCCACCTCAGAAC	CAAAACAACAGATGAGCCGA	(CT) ₁₄ A(TG) ₃ (CG) ₂
11	Agua11FW7	CGACGAAAACAGCAAGAGGAG	TCAATCAACCACAAAAGGACTATG	(TC) ₂₂
12	Agua12FW8	CACAGACAGATATTCTCTCTCTC	GTGGCTAATACCATTCCTTGA	(CT) ₁₁ (CCCT) ₂ (CT) ₂ CCCT(ACA) ₂
13	Agua13FW7	ATCAACCCCATCATCTCTTC	CGCCATCACAAAATCTAACAC	(CTT) ₃ TC(CT) ₂ N ₂ (GA) ₉ C(AG) ₂ CAG
14	Agua14FW8	CGCAGTCTTCAATGATACCA	CCCCCCTTCACTTCCAA	(AT) ₄ N ₄ (AC) ₃ TA(AC) ₂ (CT) ₂ (TG) ₂ (AGA) ₂ AA(TG) ₂ TAT(TC) ₈
15	Agua15FW7	TTCCAGCTACTACTCTCCAGT	AAGGAGGTGAGCCCGAATG	(TA) ₂ (CTT) ₂ TTG(CT) ₇ CCN _{3,1} (AG) ₂ N ₆ (GAA) ₁₄ GAT
16	Agua16FW8	ACCTTTCAATCTCTTCCCAAC	CCGCTCCAATCCAACCA	(AG) ₈ G(GA) ₅
17	Agua17FW7	TGCCAGATGACAGTTTTTCC	ACAGCACATAAGTTCAACTCAGA	(TC) ₂₀ TG(CG) ₃

El fundamento del doble grupo de temperaturas cíclicas se explica con el esquema general del procedimiento básico para el etiquetado de la marca de oligos en una reacción, el cual consta de tres piezas fundamentales: Un oligo con secuencia específica Sentido y una cola universal en su extremo 5' tradicionalmente usado el M13 (Figura 6A), un oligo de secuencia específica antisentido (Figura 6B), y El oligo de la cola universal etiquetada fluorescentemente (Figura 6C).

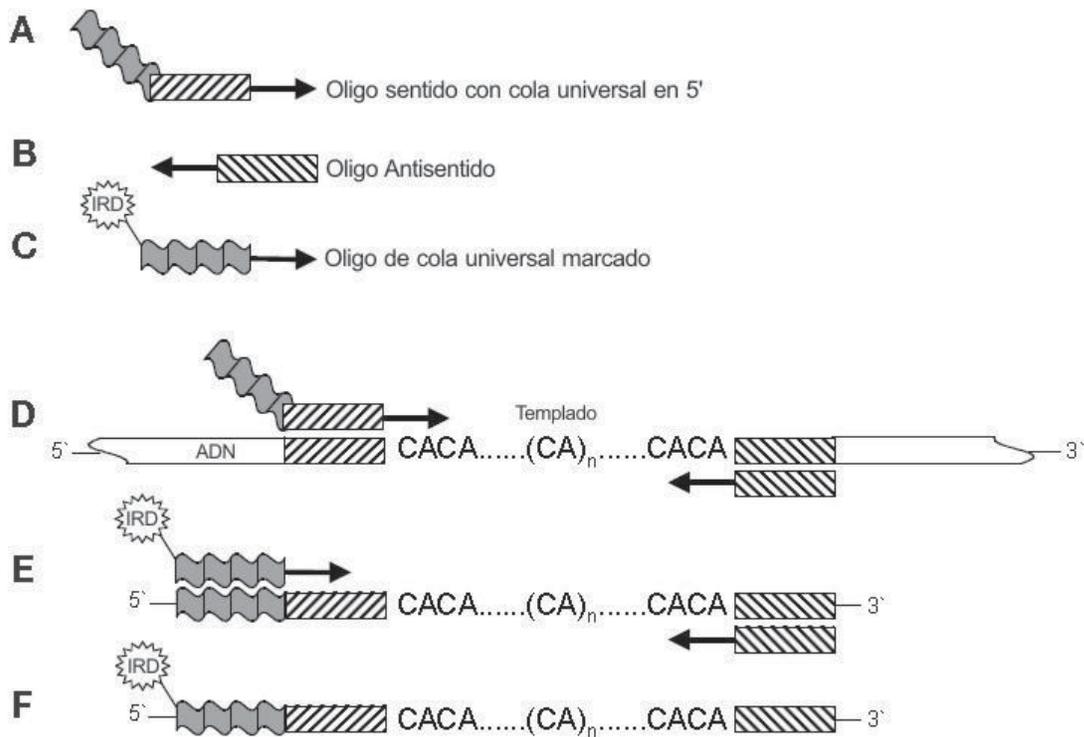


Figura 6. Esquema general para una reacción de amplificación con marcas fluorescente. (A, B) Las cajas rayadas indican los oligos microsatélite específicos, (C) la caja ondulada la secuencia universal (M13), y la estrella la marca fluorescente. (D) En los primeros ciclos de la amplificación, el oligo sentido con la cola universal se incorpora en los productos de amplificación. (E) Estos productos son entonces el blanco para el oligo de la cola universal etiquetada, que se incorpora durante los ciclos subsiguientes en una temperatura más baja del alineamiento de 56°C. (F) el producto etiquetado final se puede analizar en un sistema de detección con laser.

La cantidad del oligo sentido debe ser menor que del oligo antisentido. Las condiciones de amplificación se eligen de tal manera que durante los primeros ciclos, del oligo sentido con su secuencia universal se incorpora en los amplificados (Figura 6D). Más adelante, cuando se consume el oligo sentido, la temperatura de alineamiento se reduce para facilitar el reconocimiento de la cola universal marcada (Figura 6E). Así, el oligo marcado “asume el control” como el oligo sentido e incorpora la marca fluorescente en el producto de PCR (Figura 6F). (Schuelke, 2000).

6.2.3 Resolución preliminar de amplificados

Para realizar la visualización preliminar de los productos de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa TAE al 2%, teñido con bromuro de etidio. El gel se corrió en una cámara horizontal (Easy Cast™ Owl separation systems Modelo B2, Owl Scientific, Inc. MA USA) con buffer TAE 1X a 90 volts durante 60min y se visualizó en una fuente de luz UV (transiluminador), se realizó registro fotográfico de cada una de las corridas.

6.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

6.2.4.1 Montaje en el Sistema LI-COR® Global IR2

Se utilizó un sistema de electroforesis vertical (LI-COR® Global IR²) de placas de 25 cm y geles de poliacrilamida al 6.5% para el análisis. Como primer paso se limpiaron las placas de vidrio varias veces con agua destilada estéril e isopropanol absoluto. Posterior a la limpieza meticulosa de las placas se colocaron los espaciadores de 0.25mm de grosor y se ajustaron ambas placas con los brazos sujetadores y colocar la base para que la poliacrilamida no se fugara. Los geles al 6.5% parecen dar una mejor resolución de bandas de incluso 1pb al igual que usar espaciadores y peines de 0.25mm. Los espaciadores y los peines de 0.25mm parecen producir bandas más definidas. Y el tiempo de polimerización es

bajo (50min). Una vez montado se vació la poliacrilamida entre las dos placas ayudado por una jeringa cuidando no formar burbujas, 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 este se giró para formar el número requerido de pozos. (Figura 7).

6.2.4.2 *Electroforesis de geles de poliacrilamida*

Primeramente se limpió con toallas de papel toda la superficie del secuenciador LI-COR así como el detector infrarrojo. Se colocó el tanque de buffer inferior en la base del secuenciador se sumergió en él, las placas con el gel, se monto el empaque y el tanque superior. Se llenaron los tanques superior e inferior hasta la línea de llenado (~500 mL) con buffer TBE 1X. Se colocó la tapa se insertaron los conectores, se cerró la puerta del secuenciador y se encendió el equipo. (Figura 7).

Para la programación de las condiciones de corrida se utilizó el paquete de herramientas del secuenciador (Base ImagIR) para dos longitudes de onda 700 y 800nm. Se creó una nueva entrada y directorio, haciendo click en el botón *Data Collection*, después haciendo click en *File/New* y seleccionando la carpeta de destino y haciendo click en *Create directory* y create a new directory para hacer el proyecto del gel y finalmente click en *OK*. Se Selecciono IRD700 e IRD800 se ingreso los nombres de las imágenes que serian obtenidas (Aguacate 1 - 9) en uno de los dos canales y se presiono *OK*. Se selecciono *Configuration* y se creó un archivo Nuevo de configuración con las condiciones de electroforesis 1500V, 30mA, 40W y 45°C. Se realizó un enfoque de fondo y ruido para el escáner haciendo click en *Options/Auto focus* en el control del *Scanner* y se seleccionó *Auto* una vez hecho se dio click en *Done* para proceder. Para iniciar el secuenciador se da click en *High voltage status ON* y *Scan status ON* en la ventana de control del *Scanner* y se presiona *ENTER*. Si todo marcha bien las luces de los indicadores en la base se encenderán. Es necesaria un precorrida del gel de 25 a 40min para eliminar cualquier precipitado o exceso de urea antes de la

carga de las muestras. Durante la precorrida se maximizó la ventana de imagen para revisar líneas blancas o negras que representaran impurezas en el gel para revisar líneas blancas o negras que representaran impurezas en el gel cambiaran de posición con forme el tiempo de corrida pasaba. Si eran observadas líneas fijas, se detuvo el secuenciador y se abrió la puerta, se desmonto el gel y le limpio el escáner, se cerró la puerta y se continuó la precorrida.

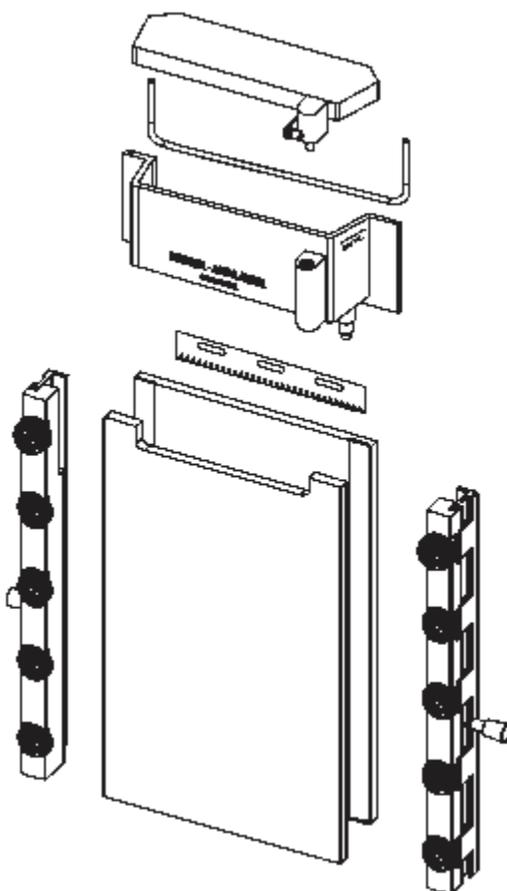


Figura 7. Componentes y forma de ensamblado para el sistema de gel de 25cm de LI-COR Global IR².

6.2.4.3 Preparación de las muestras y carga.

Para la preparación de las muestras a cargar, fue a partir de los tubos iniciales de amplificación (de volumen fina de reacción de 10 μ L) se realizaron diluciones 1:100 con agua desionizada estéril, de esta dilución se tomaron 1.5 μ L

de productos de oligo marcados IRD-700 y 1.5 μ L de IRD-800 y se colocaron en un tubo Eppendorf de 200 μ L realizando 9 mezclas de 2 oligos cada uno para los respectivos canales del escáner 700 y 800nm (Cuadro 7).

Cuadro 7. Combinaciones de carga en cada uno de los geles de poliacrilamida corridos.

No. corrida	Oligo a 700nm	Oligo a 800nm
1	Agua1FW7	Agua2FW8
2	Agua3FW7	Agua4FW8
3	Agua5FW7	Agua6FW8
4	Agua7FW7	Agua8FW8
5	Agua9FW7	Agua10FW8
6	Agua11FW7	Agua12FW8
7	Agua13FW7	Agua14FW8
8	Agua15FW7	Agua16FW8
9	Agua17FW7	

6.2.4.4 *Procesamiento y análisis de la imagen*

En contraste con la detección convencional por autoradiografías, la distancia entre bandas y número de tamaño de pb fijo, es mayor el error o menor la precisión que en imágenes digitales obtenidas por secuenciadores automáticos. Esto debido a que la relación entre tamaño de fragmento y rango de migración es lineal, y las bandas son detectadas a su paso por un punto fijo., mientras que las bandas superiores o mas grandes se separan mejor, las más pequeñas son borrosas o están más juntas, lo cual dificulta su análisis correcto. Esto se resuelve con estos sistemas que producen imágenes que pueden ser rápidamente observadas e impresas en software de manipulación de imagen como SAGA GT, este software permite utilizar las imágenes de 16-bit y realizar en ella las anotaciones que se requieran.

Para iniciar el sistema de lectura se abrió el software SAGA GT 3.2 (LICOR biosciences) y en la ventana del Editor de geles, se escoge el proyecto y la imagen a analizar, en el caso de existir dos longitudes de onda se escoge también la longitud de onda a mostrar. Dentro de los menús existe una opción que puede desplegar la imagen en blanco las bandas y negro el fondo o invertirlo, al igual que subir o bajar contraste y brillo para hacernos más fácil la lectura.

Una vez cargada la imagen y elegido la forma de visualización se procede a colocar las marcas de la escalera del marcador de tamaño molecular (50-700 IR size standard Ladder Cat. No. 4200-60 LICOR Biosciences) con el comando *calíbrate* si este comando no lo calibra por si solo se puede usar el comando *edit* y calibrarlos manualmente ubicando nodos en donde se encuentre la presencia de la banda haciendo posible esto alinear el gel aunque la corrida no haya sido al mismo nivel. Posterior a esto se procede a la localización de líneas verticales que contendrán la información de los carriles y nombre o número de las muestras a analizar, el software coloca automáticamente el número de muestras que se colocó desde el principio y si es necesario editar las líneas es posible hacerlo para colocarlas justo en el centro del carril para su posterior lectura. Es necesario también alinear el gel de manera horizontal, aquí por medio del comando *Desmile* que nos permite cambiar la curva de corrimiento y ajustar el gel de manera lineal para poder tener los tamaños correctos de los productos a leer, aquí es recomendable poner de 3 a 4 líneas *Desmile* para hacer una lectura más efectiva.

Una vez terminada esta fase se procede a realizar el *Scoring* o lectura de las bandas polimórficas; aquí de manera automática el software proporciona aquellas bandas que para él están presentes u ausentes, sin embargo, dados los parámetros de *default* del programa existen bandas que no toma como presentes teniéndose que realizar una lectura semi-automatizada. Las lecturas arrojadas por el software es para la presencia de banda un signo + y para ausencia de banda del mismo tamaño un signo – cuando el software no es capaz de discriminar (banda muy tenue) nos colocara un símbolo de interrogación (?). Una vez

concluida esta parte se dará click en el botón *Re-Anal* y la imagen será completada en la ventana del editor de proyectos y aparecerá la leyenda GENOTYPED que indicara que la imagen ha sido completada en su procesamiento.

6.2.4.5 *Exportar los resultados*

Una vez terminado el procesado de la imagen en el Editor de imágenes, se puede proceder a generar reportes en una variedad de formatos. Primero se tiene que elegir el gel y seleccionar el comando *Reports*. Una ventana es desplegada para seleccionar el formato del reporte (PAUP, Ntsys), el cual es visualizado de manera provisional, una vez en esa ventana es posible indicar si se desea guardar como archivo de texto o imprimirlo, para su posterior análisis.

6.3 **Estimacion de distancias genéticas.**

6.3.1 *Construcción de matrices binarias*

Los datos generados por el secuenciador en formato Ntsys fueron procesados con fines de que los modelos matemáticos puedan aplicarse, para tal motivo se construyeron matrices binarias (ceros y unos) para procesar los datos de genotipificación. El procedimiento fue el siguiente:

Se utilizó la paquetería comercial Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft corporation), en donde se importa el archivo Ntsys, opción *Abrir* escoger en la pestaña de tipo de archivo *todos los archivos* y se elije el archivo, al empezar a abrir éste, se abre el asistente para importar texto aquí es importante elegir la opción de que los datos son delimitados, y dar click en *siguiente* una nueva ventana es desplegada con el nombre separadores y aquí se elije Tabulación y espacio, y se da click en siguiente una vez terminado de colocar los separadores se da click en finalizar, una vez desplegada la hoja del libro se guardara con el

comando guardar como y escoger el tipo de archivo de libro de Excel *.xlsx, una vez guardado nuestro archivo mediante el comando reemplazar, se reemplazan los símbolos + por números 1, los símbolos – por números 0, cuando se realiza una lectura automatizada y nos genera matrices con símbolos de interrogación estos son substituidos por 999 o simplemente se dejan vacios, una vez editado el reporte este se guarda nuevamente (comando guardar).

Fue necesario construir una matriz que contenga todos los datos para la construcción de los arboles filogenéticos, dentro del mismo archivo es necesario abrir una nueva hoja en el libro, aquí se deja vacío el primer renglón o columna A aquí se colocaran los tamaños de las bandas que se están analizando, si la columna está libre, o no es colocada la información el programa asignará automáticamente identificadores a los fragmentos, el segundo paso es, en la primera fila (a partir de B1) de la hoja de cálculo se colocaran los nombres de los taxones usados en el análisis (individuos problema) los nombres de los individuos o la clave de preferencia no debe contener más de 10 dígitos, los nombres pueden llevar números y letras, pero sin espacios entre ellos, porque sino el software lo tomará como que se trata de otro individuo. Es necesario también colocar el nombre del método, ej. el nombre del taxón, la endonucleasa o de la enzima de restricción que se está analizando, esta se debe poner en la primera celda de la segunda fila (A”: esta es llamada separador), una vez concluido el armado general de la tabla se procede a colocar los datos de, la presencia o la ausencia de los fragmentos particulares de DNA obtenidos por la amplificación de PCR está para cada caso cifrada por 1, 0 o 999, hasta aquí se han colocado solo las lecturas de un par de longitudes de onda para un oligo, es necesario hacer los primeros pasos para cada uno de los reporte e ir completando la matriz de análisis con los datos de los diferentes geles leídos y estos datos se van incorporando hacia debajo de la primera entrada. Dado que para estos estudios son más de 2 combinaciones (más de un reporte que genera el secuenciador), lo ideal es que los individuos se corran en todos los geles en el mismo orden, para que solo sea cuestión de pegar los datos de los siguientes geles debajo de los otros, es muy importante ya que los

datos es necesario que correspondan al individuo que está marcado arriba y que los individuos que se eliminen por demasiados datos perdidos se eliminen completos para que esto no exista error en los datos y después se puedan tener malos resultados, ya una vez terminado la importación y construcción de la matriz con todos los datos, se guarda el archivo como libro de cálculo de Excel, una vez respaldado se selecciona toda la matriz y copia en el portapapeles.

6.3.2 Construcción de árboles filogenéticos

Para los análisis es necesario usar el programa informático FreeTree® (Pavlicek *et al.*, 1999, Charles University, Czech republic). Al abrir el programa en la opción *File* se selecciona *open analyses* y abre la ventana para buscar donde está el documento o se puede seleccionar la opción *new analyses* y ahí nos colocara una tabla muy similar a la hoja de cálculo de Excel y pegamos nuestros datos previamente copiados en el portapapeles, en la parte superior de esta nueva tabla se desplegaran varias opciones en pestañas, el primero es el de *data input*, en donde están contenidos nuestros datos del secuenciador, en la segunda pestaña se lee *Distance/ similarity matriz*, aquí es posible seleccionar entre varias opciones que contienen los diferente modelos matemáticos para la construcción de arboles filogenéticos que son los coeficientes que se pueden elegir (J: Jaccard, DICE: Nei y Li, SM: Simple Matching, etc.) Aquí se utilizo el índice reportado por Nei y Li para determinar la distancia genética, también es posible seleccionar los intervalos de confianza de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, por sus siglas en ingles, método de grupos pares no ponderados con medias aritméticas) éste es el método de reconstrucción filogenética más sencillo de todos, fue inventado inicialmente para construir fenogramas taxonómicos, es decir, árboles que reflejaran las similitudes fenotípicas entre los OTUs (Sokal y Michener, 1958), puede ser utilizado para construir árboles filogenéticos si las tasas de evolución entre las secuencias son aproximadamente constantes entre linajes, de tal forma que existe una relación aproximada entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia.

Una vez completada la información instantáneamente nos desplegara la tabla de distancias entre los individuos, para guardar esta matriz de similaridad o distancia, se dará click con el botón derecho del Mouse y se copiara en portapapeles y se pega en bloc de notas o Excel, para guardarla. En la siguiente pestaña se leerá *Reference tree* y si se abre aparecerá abajo el árbol filogenético que se genero con esos datos, normalmente ese no es el que se utilizara; el que se utilizara será el que se genere en la última pestaña *Resampling Methods* donde dentro de las opciones a escoger se escogió la de Bootstrapping el cual es un método de remuestreo intensivo de análisis estadístico que utiliza la simulación para calcular errores estándar, intervalos de confianza y pruebas de significación; donde el valor para este fue de 1000 en el cuadro de dialogo *repetition count* este fue el número de repeticiones que se hicieron para el análisis, puede ser cambiado por 5000 si los individuos y el numero de bandas a analizar no son demasiadas que haga muy lento el análisis una vez completado los parámetros se da click en RUN, cuando termina nos arroja una salida donde nos dice que el árbol fue el mas parsimonioso de aquí es necesario regresar a la pestaña Referente tree, aquí se copia el árbol de la salida y se copia en el portapapeles (click derecho).

6.3.3 Visualización del árbol filogenético

Para visualizar el árbol filogenético generado con los datos del secuenciador y el software informático FreeTree, se utilizara el software informático Treeview. Una vez copiado nuestro árbol mas parsimonioso del paso anterior en el menú edit se selecciona la opción paste, e inmediatamente aparecerá el dendrograma, se puede escoger aquí la opción de filograma que nos permite visualizar la escala que consiste en los valores del análisis bootstrap donde este son métodos computadora-intensivos de análisis estadístico que utilizan la simulación para calcular errores estándar, intervalos de confianza y pruebas de significación, el bootstrapping implica remuestreo (resampling) de los

datos obtenidos en una muestra, con reemplazamiento, muchas veces para generar una estimación empírica de la distribución muestral completa de un estadístico. También es posible visualizarlo como árbol filogenético sin raíz para el caso de análisis de poblaciones. De aquí ahora se puede importar como imagen o algún tipo de archivo específico, para su edición y manejo más sencillo se puede copiar de nuevo al portapapeles y en Microsoft Office Powerpoint 2007 (Microsoft corporation) se puede pegar en una diapositiva en blanco nueva.

7 RESULTADOS

7.1 Extracción del material genético.

Los métodos establecidos para la obtención de material genético tanto de hojas como raíces de aguacate recién colectadas y congeladas, permitió obtener ADN de buena calidad, en las Figuras 8 y 9, se muestran fotografías de electroforesis representativas de las extracciones de los diferentes individuos y tejidos de aguacate criollo mexicano analizados, esta obtención permitió continuar con los objetivos planteados.

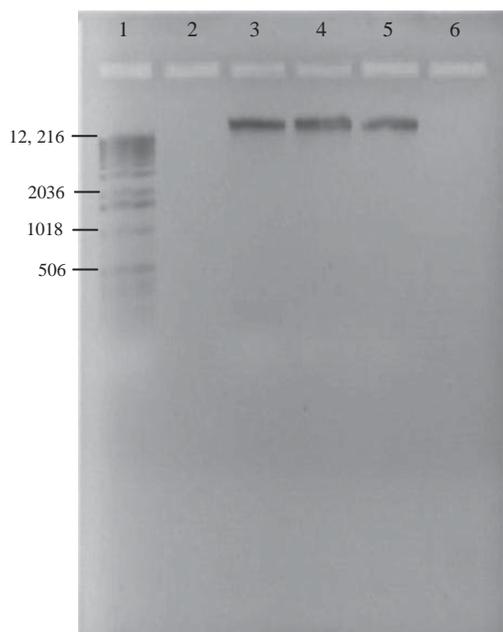


Figura 8. Gel representativo de una de las extracciones de material genético procedente de hojas congeladas de aguacate criollo mexicano carriles: 1) 1Kb DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2) Buffer QIAGEN®; 3) PADb1; 4) PADv1; 5) PADh1.

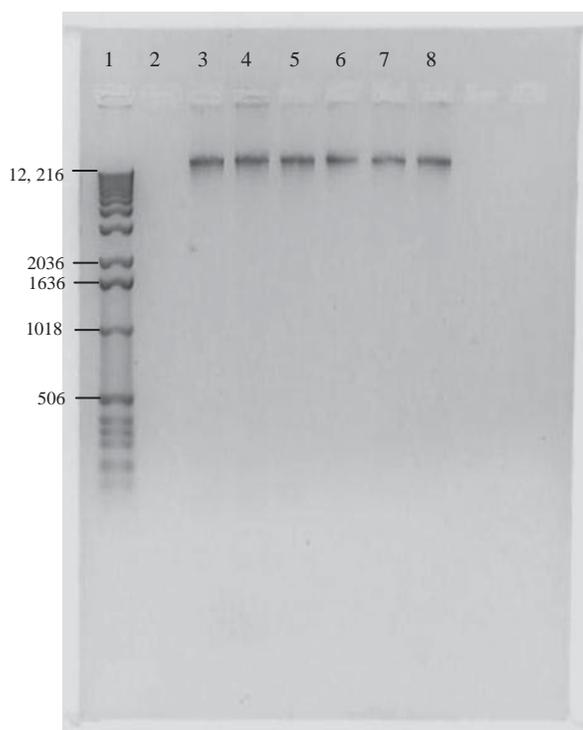


Figura 9. Gel representativo de una de las extracciones de material genético procedente de raíces congeladas de aguacate criollo mexicano carriles: 1) 1Kb DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2) Buffer QIAGEN®; 3) PADb1; 4) PADv1; 5) PADh1; 6) HASS; 7) PADv02; 8) PADb3.

Dado que las extracciones de material genético de aguacate de material vegetal recién colectado es difícil por la presencia de altos contenidos de polisacáridos gomosos y polifenoles, los protocolos probados reportados obtuvieron material con contaminantes como polisacáridos y polifenoles coloridos, pegasosos y viscosos, haciendo necesario removerlos antes de precipitar en ADN ya que estos actúan como inhibidores durante la extracción, y dado que el material obtenido de material vegetal seco implica mayor cuidado y tratamiento más cuidadoso, se procedió a realizar un sistema de extracción consistente en tres soluciones: Una de lavado, Una de extracción y Una de resuspension, con buenos resultados (Figura 10).

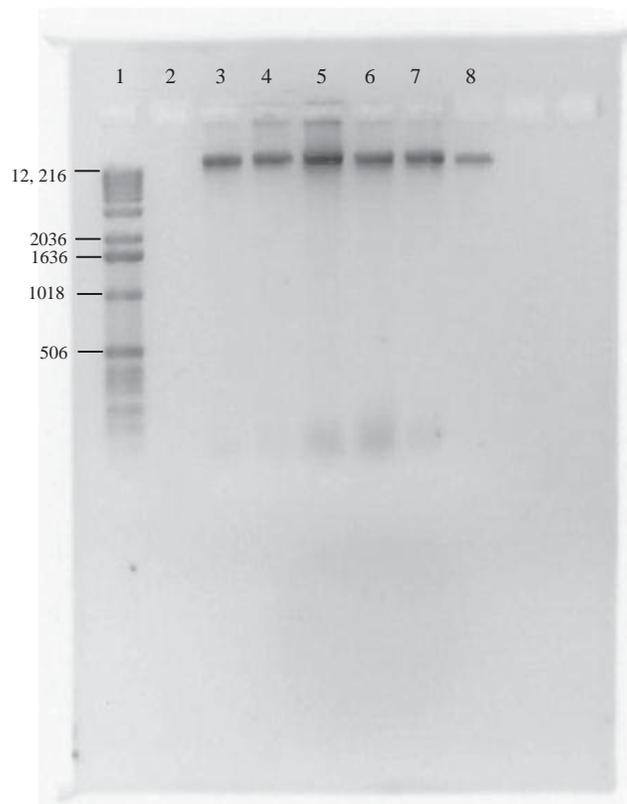


Figura 10. Gel representativo de una de las extracciones de material genético procedente de muestras secas herborizadas de aguacate criollo mexicano carriles: 1) 1Kb DNA Ladder Invitrogen ® cat. 15615-016AE; 2) Buffer de resuspensión TE 1X estéril; 3) PAA01; 4) PAA02; 5) PAA03; 6) PAG01; 7) PAG02; 8) PAG03.

Dadas las características de material genético de alto peso molecular útil para reacciones como las de PCR y restricción enzimática, este material obtenido fue sometido a pruebas de este tipo las cuales resultaron positivas para su uso lo que permitió seguir con los objetivos planteados.

7.1.1 Cuantificación del ADN

Los resultados de la cuantificación del ADN fueron necesarios para poder estandarizar las concentraciones de los materiales en estudio para los posteriores procesos.

Las cantidades de ADN obtenidas con la metodología de QIAGEN® tuvieron rendimientos de los 100 a 400ng/μL por gramo de muestra fresca procesada, presentando intervalos de absorbencia de 1.79 a 2.1; para el caso del material obtenido por la metodología de buffer modificado de Lin *et al.*, 2001 y columnas Fujifilm® los rendimientos fueron de 30 a 200ng/μL por cada 100mg de muestra fresca procesada y con intervalos de absorbencia de 1.78 a 2.08; finalmente para el método establecido para material proveniente de material seco los rendimientos oscilaron entre los 50 a 150ng/μL por cada 50mg de muestra seca procesada y con lecturas de absorbencia de entre 1.74 a 2.14 hasta aquí todos las mediciones fueron muy próximas al óptimo (1.8- 2.0 manómetros) indicando la presencia de un ADN de buena calidad útil para las posteriores pruebas.

7.1.2 Prueba de calidad del ADN

Con el ADN obtenido, se llevó a cabo una prueba de amplificación de los marcadores SSRs elegidos para las pruebas en aguacate. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las descritas con anterioridad en la metodología.

7.1.3 Resolución preliminar de los amplificados

Los productos de amplificación se presentan en la Figura 11, 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 variedad, 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 variaciones genéticas del individuo y no a problemas de amplificación. Este resultado confirmó la utilidad del ADN obtenido con los protocolos utilizados y estos pueden recomendarse para ser utilizados en trabajos involucrando al aguacate cuando se requiera de ADN de alta pureza y en cantidades parecidas a las obtenidas aquí.

En la obtención de perfiles genéticos en los geles de agarosa al 2%, se observa una resolución deficiente y un bajo número de bandas, como se muestra en la Figura 11, por lo que se procedió a hacer una resolución en geles de poliacrilamida para mayor nitidez.

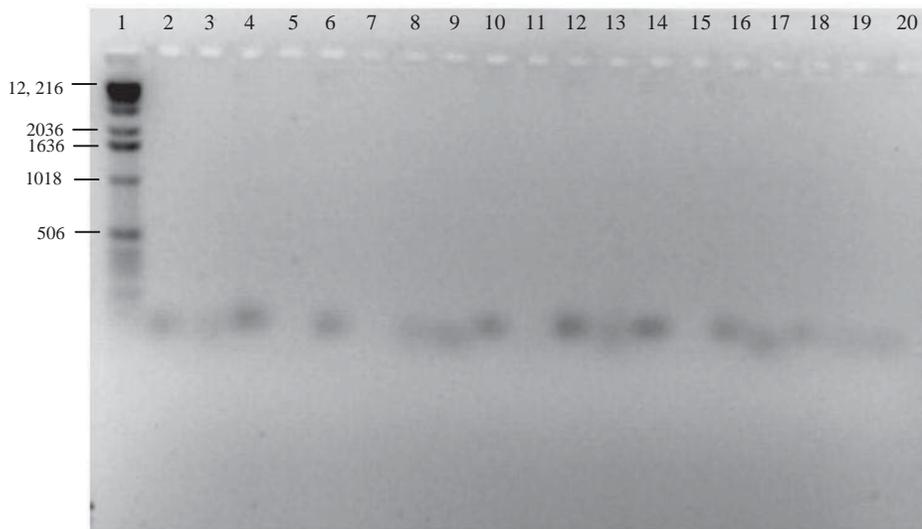


Figura 11. Gel de agarosa TAE 2% para el marcador de aguacate AguaFW17 con tamaño de amplificadas de 70 a 110pb carriles: 1) DNA Ladder Invitrogen® cat. 15615-016AE; 2 – 9) ADN proveniente de muestras de aguacate obtenido con el protocolo de QIAGEN®; 10 – 14) ADN proveniente de muestras de aguacate obtenido con el protocolo modificado de Lin *et al.*, 2001 y columnas Fujifilm®; 15 – 20) ADN proveniente de muestras secas de aguacate.

7.2 Caracterización genética

7.2.1 Resolución en geles de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida, muestran una mejor resolución y un mayor número de bandas observándose así de mejor manera el perfil genético, a inferir. Se obtuvieron 9 diferentes perfiles genéticos como se describió en la metodología, imagen para un par de oligos marcados a 700nm y en el mismo gel otro juego de oligos marcados para 800nm para un total de 17 juegos de oligos Figura 12 obteniéndose una excelente resolución, misma que permitió distinguir con facilidad la presencia de las bandas polimórficas de las diferentes muestras de aguacate analizadas mediante estos geles. El tamaño de cada posible alelo en nucleótidos se determinó usando el tamaño de banda de mayor intensidad de cada producto de amplificación comparado con el marcador de tamaño molecular y la captura de las imágenes en el sistema LI-COR global IR².

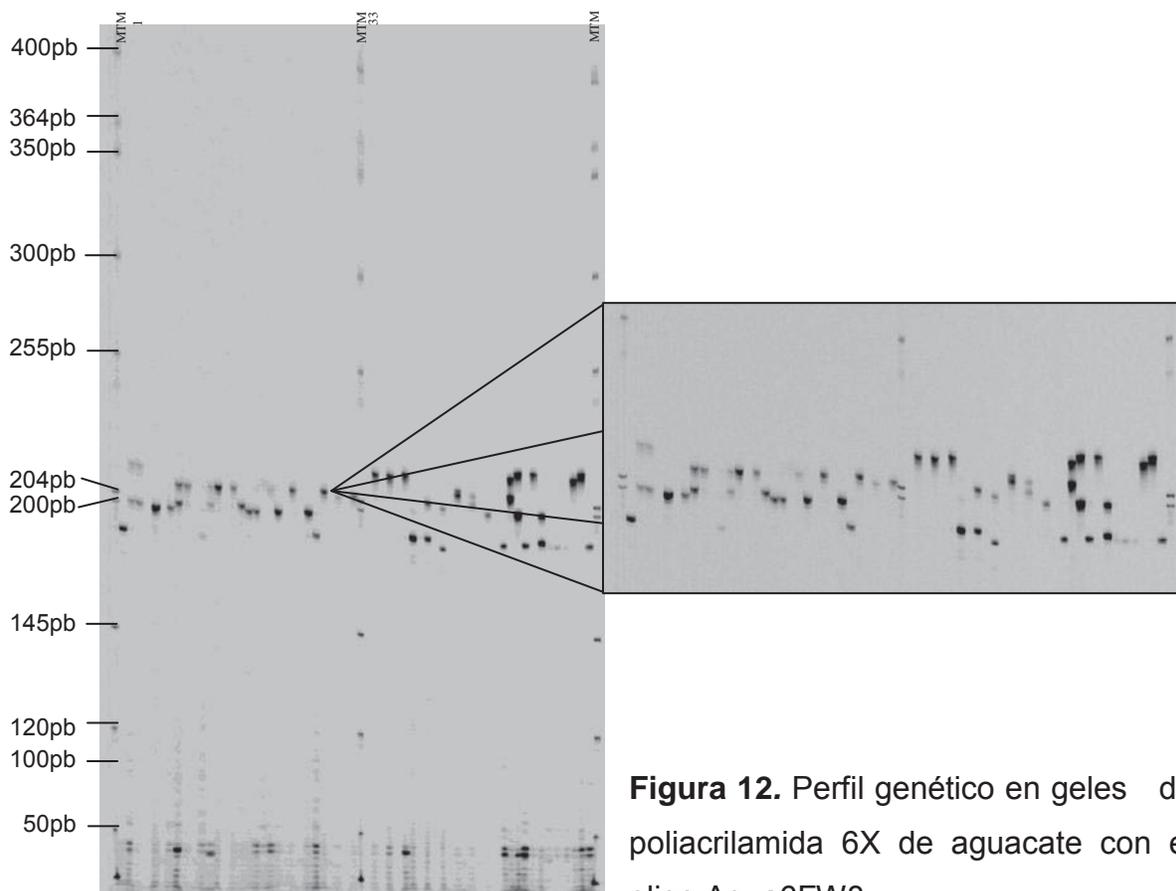


Figura 12. Perfil genético en geles de poliacrilamida 6X de aguacate con el oligo Agua6FW8.

7.3 Estimación de distancias genéticas

7.3.1 Análisis de Datos

En el análisis de datos se evaluó tanto la cantidad de bandas como los tamaños moleculares de las mismas y su relación con las demás. Los perfiles obtenidos de la 41 muestras de aguacate criollo y las 9 tomadas como control entre aguacates criollos guatemaltecos, antillanos y cultivar hass.

Se identificó una gran variabilidad genética dentro de los individuos de aguacate criollo mexicano con respecto a sus controles (Cuadro 8).

Cuadro 8. Características de las corridas y datos obtenidas del sistema LI-COR IR².

No.	Oligo provado	Tamaño esperado (pb)	Tamaño obtenido (pb)	Individuos amplificados
1	Agua1FW7	70-110	75-103	37
2	Agua2FW8	154-191	158-172	27
3	Agua3FW7	148-190	156-194	41
4	Agua4FW8	81-127	82-161	50
5	Agua5FW7	86-122	91-123	50
6	Agua6FW8	182-213	180-212	48
7	Agua7FW7	201-299	148-220	36
8	Agua8FW8	240-288	151-262	20
9	Agua9FW7	204-264	151-236	28
10	Agua10FW8	288-321	153-290	27
11	Agua11FW7	283-331	149-324	4
12	Agua12FW8	74-113	80-166	26
13	Agua13FW7	129-153	128-134	17
14	Agua14FW8	147-179	150-169	25
15	Agua15FW7	132-162	129-158	30
16	Agua16FW8	142-171	153-174	35
17	Agua17FW7	146-184	153-161	21

7.3.2 Tabla de distancias

Derivado del análisis de la matriz de ceros y unos generada a partir de los datos moleculares de las bandas de SSRs, se obtuvo una matriz de distancias genéticas (Cuadro 9), 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

7.3.3 Arbol filogenético

El árbol filogenético elaborado con los perfiles de banda obtenidas de *Persea americana* var. *drymifolia* y los siete individuos tomados como controles, se muestra en la Figura 13, el cual resalta lo siguiente.

En este árbol filogenético se observa la formación de tres grandes grupos. El primer grupo (grupo I) ubica a 2 subgrupos, con 26 individuos en total dentro del primer subgrupo (subgrupo Ia) se agrupan a 13 individuos los cuales son: PADb4, PADb3, PADv6, PADv3, PADv5, PADv4, PADv12, PADv1, PADv9, PADv8, PADv7, PADv11 y PADv10; para el siguiente subgrupo (Subgrupo Ib), se agruparon a 13 individuos los cuales corresponden a los individuos: PADb8, PADb5, PADb10, PADb6, PADb2, PADb1, PADb12, PADb11, PADb16, PADb9, PADh5, PADh4, PADh3. En el subgrupo Ia se puede reconocer o dividir en mas subgrupos donde 7 lo forman; i1 lo formaron los individuos PADv7, PADv8 y PADv9; i2 formado por PADv1 y PADv12. Este subgrupo se asocio por medio de PADv11 al subgrupo i3. Esta se asocio con PADv4 y PADv5 al siguiente subgrupo i4. Este subgrupo se asocio al i5 por medio del individuo PAD10. En i6, se agruparon, PADv3 y PADv6 asociándose al interior con el anterior y en i7 PADb3 y PAD4 asociándose al interior con i6. Este ultimo sirvo de enlace entre el subgrupo Ia y Ib donde éste estuvo formado por 5 subgrupos b1 PADh3, PADh4, PADh5, PADb11 y PADb12 asociado al subgrupo b2 por medio del PADb16.

B3 estuvo formado por PADb1, PADb2 y PADb6. b4 estuvo formado por el individuo PADb9 asociado al interior con b3. b5 se formo con PADb10, PADb5 y PADb8.

En el subgrupo Ia, las colectas con mayor similitud genética fueron PADv8 con PADb9 ambas de Uruapan, Michoacán. Del grupo I, de diferentes subgrupos, presentaron el mismo número de bandas polimórficas entre ellos los individuos PADh4 de Peribán, Michoacán, y PADh5 de Santiago Tangamandapio, Michoacán. Así mismo los individuos PADb12 de Uruapan, Michoacán y PADb6 de Uruapan, Michoacán. Otros individuos con mismo perfil de bandas son PADv8, PADv 9 y PADv3 provenientes de viveros de Uruapan, Michoacán. Y por último, PADb1 de San Angel Zurumucapio, Michoacán y PADb8 de Uruapan Michoacán, presentaron el mismo número de bandas polimórficas y menor similitud con las anteriores (Figura 14).

El grupo II que incluyó dos subgrupos, (IIa y IIb) IIa se formó con 9 individuos PADv2, PADb13, PADb17, PADh2, PAHC2, PADb7, PAHC3, PAG1 y PAG2. El subgrupo IIb, fue formado por 13 individuos PAG3, PADb23, PADh1, PADb15, PAA2, PADb14, PADb19, PADb18, PAHC1, PADb21, PADb22, PAA3, PADb20. El grupo III con dos individuos PADb24 y PAA1.

En el subgrupo IIb, presentaron el mismo número de bandas polimórficas los siguientes individuos, PADb23 de San Miguel, Puebla y PADb20 de Tingambato, Michoacán. Los individuos PADb19 de San Juan de la Vega, Guanajuato y PADb18 de Zitácuaro, Michoacán, presentaron el mismo perfil de de bandas, entre ellos (Figura 16)

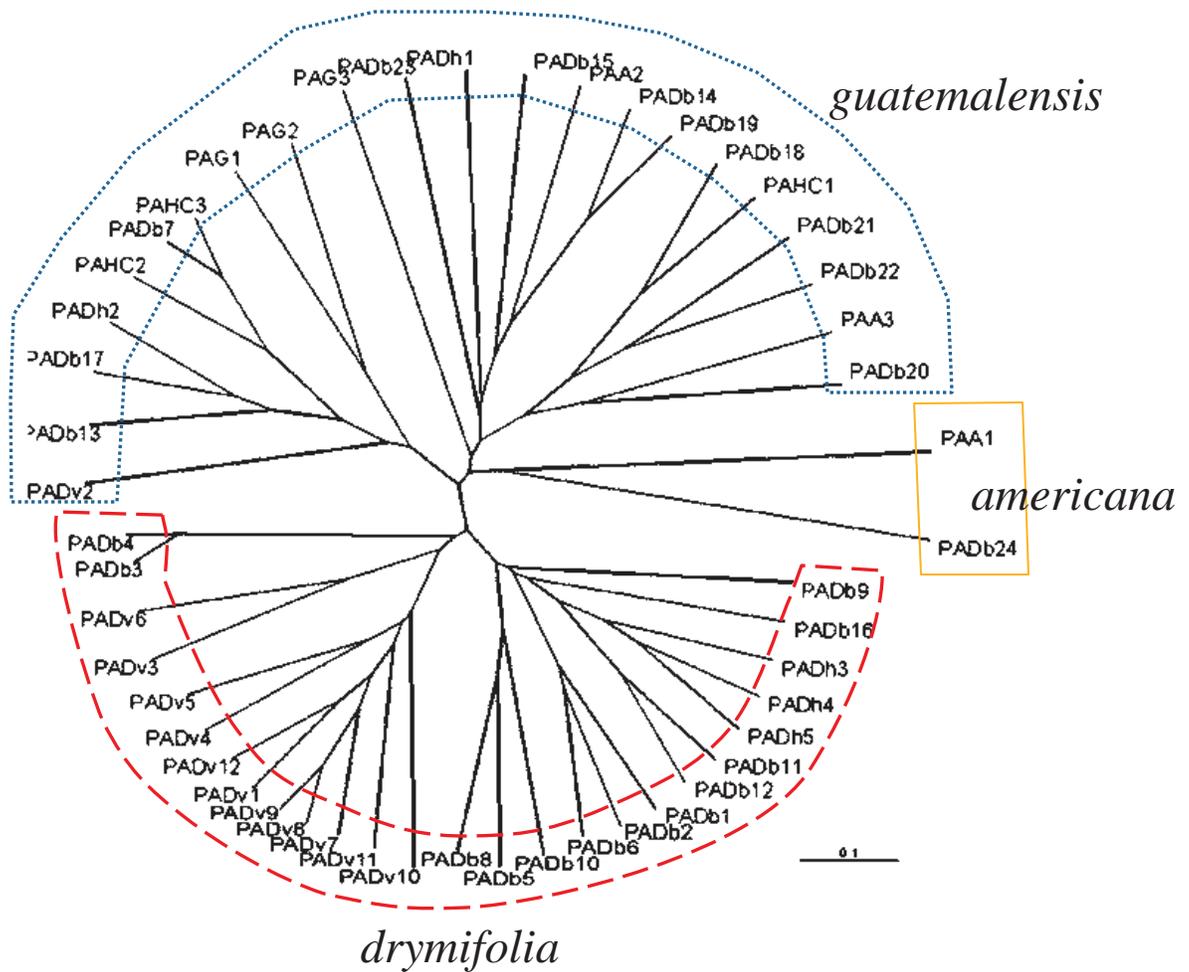


Figura 13. Árbol filogenético consenso obtenido con el índice de Nei y Li 1979 con 1,000 de bootstrap con las frecuencias de 17 loci microsatélites para 50 genotipos de aguacate. Las líneas punteadas separan las tres variedades botánicas silvestres Guatemalteco (*P. americana* var. *guatemalensis*; línea interrumpida azul), Mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*; línea interrumpida Roja) y Antillano (*P. americana* var. *americana*; Línea continua Amarilla).

8 DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento de los genetistas de los SSRs (Litt & Luty 1989; Tautz 1989; Weber y May 1989) muy pocos estudios sobre marcadores SSRs se han generado en plantas (Akkaya *et al.*, 1992; Cregan, 1992; Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante y Olivieri, 1993; Senior y Heum, 1993; Zhao y Rochert, 1993).

La estimación de la distancia genética entre individuos a partir del análisis de bandas compartidas entre dos genomas es formalmente propuesta por Nei y Li en 1979, denominado análisis de fragmentos de restricción (Clarck y Lanigan, 1993).

Se trabajó con microsatélites debido a que son marcadores genéticos versátiles que combinando propiedades de alta variabilidad, codominancia, y una buena reproducibilidad (Litt y Luty, 1989; Smeets *et al.*, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989) permite trazar o inferir la paternidad o el seguimiento del movimiento del polen (Jarne y Lagoda, 1996; Queller *et al.*, 1993; Goldstein y Pollock, 1997; Goldstein y Schlötterer, 1999; Sunnucks, 2000). Beneficios adicionales se derivan de su relativa abundancia e incluso de la distribución a través del genoma (Hamada *et al.*, 1982; Stallings *et al.*, 1991; Weissenbach *et al.*, 1992; Roots y Baker, 2002; Schmidt y Heslop-Harrinson, 1996).

El aguacate es una de los primeros árboles domesticados en el neotrópico y puede ser utilizado como un modelo de domesticación de arboles de áreas de gran diversidad biológica (Galindo-Tovar *et al.*, 2007).

Más aún muchos de los cultivares de aguacates modernos son el resultado de hibridaciones de dos o más variedades geográficas distintas, aunque los orígenes de los híbridos actuales dejan mucho a la especulación (Chen *et al.*, 2008). Se ha sugerido que las tres variedades silvestres experimentaron domesticaciones separadas y no estuvieron en contacto hasta la llegada de los europeos en el siglo XVI.

En la década de los 1980's la mejora de aguacates ganó terreno mediante la hibridación interracial entre las variedades guatemaltecas y germoplasmas cubanos (antillanos) en florida (Robinson, 1926; Davenport, 1986).

El largo periodo de polinización abierto e hibridación interracial en el aguacate ha resultado en los cultivares modernos que son tan complejos y regularmente caracterizados inadecuadamente dada la mezcla de las 3 variedades (Davis *et al.*, 1998; Scora *et al.*, 2002).

Generalmente los aguacates silvestres mexicanos han dejado una mayor huella génica en los híbridos actuales que sus contrapartes de otras zonas del mundo. Sin embargo cabe mencionar que diferentes especies han contribuido a la obtención de los cultivares modernos. Por ejemplo, los posibles padres del cultivar Hass están dados por mezclas de individuos mexicanos y guatemaltecos (Chen *et al.* 2008).

El impacto potencial de la domesticación selectiva de la diversidad existente en el cultivo del aguacate es altamente significativa ya que la imposición en la selección, ha restringido la diversidad genética por la limitación del número de linajes que son mantenidos para su propagación. Últimamente, esto se traduce en la reducción de los tamaños de las poblaciones efectivas que proveen de cargas génicas diferentes afectando todos los genes del genoma, esto debido a que *Persea americana* tiene un sistema de hibridación abierta dioica sincronizada que tiende a promover el entrecruzamiento (Davenport 1986) por lo tanto la autofecundación no ocurre en cultivos conformados de un solo genotipo (Davenport *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que el gran entrecruzamiento genético entre individuos de aguacate criollo mexicano con los cultivares actuales en la región de Michoacán (Hass, Fuerte, guatemalteco, antillano) desde hace aproximadamente 30 años,

origina la pérdida de cargas génicas de los materiales silvestres y más aun del aguacate criollo mexicano (Sánchez-Pérez, 1999).

En la actualidad, el 90% de los huertos de la región aguacatera en Michoacán, tienen como base al cultivar Hass, los individuos de aguacate criollo mexicano se restringen a los traspatios y pequeñas áreas dentro de los huertos comerciales (Sánchez-Pérez, 1999).

Los resultados del presente trabajo han comprobado lo anterior, logrando identificar individuos de aguacate criollo considerados como criollos mexicanos, y otros que aun con características morfológicas de aguacate criollo mexicano, presentan ya un grado de hibridación con otra variedad o cultivar de *Persea*. En el presente estudio fue utilizada una serie de datos de patrón de bandeo acoplado a análisis estadísticos para tratar de inferir la genealogía de aguacates resguardados en un banco de germoplasma y así poder inferir los grados de hibridación de estos materiales resguardados.

De la matriz de distancias genéticas se derivó un árbol filogenético (Figura 13), logrado con la información de los marcadores SSRs y en el cual se agruparon los diferentes materiales de aguacate en estudio. Con base a las distancias genéticas determinadas entre estos, empleándose para tal efecto el coeficiente de Nei y Li, 1979; UPGMA y un valor de 1000 de Bootstrap.

Un total de 50 genotipos de aguacate fueron estudiados con 17 marcadores SSR's previamente descritos por Borrone *et al.* 2007. Estos marcadores SSRs fueron escogidos con diferentes longitudes y características de composición encontrando que cada uno produce patrones de amplificación especiales para cada individuo. El análisis UPGMA divide a los genotipos estudiados en tres bien definidos grupos que reflejan tanto el origen geográfico como las cargas génicas de cada uno de los individuos.

El grupo I son árboles de aguacate criollo mexicano que no presentan grado de hibridación con organismos de las otras variedades silvestres de aguacate, dentro de este grupo se encuentran dos subgrupos; Ia y Ib.

En el subgrupo Ia, se encuentran mayoritariamente árboles provenientes de viveros de Uruapan Michoacán lo cual nos presenta la relación genética o lo emparentados entre estos individuos posiblemente obtenidos de una misma población de esta zona.

En el subgrupo Ib, principalmente se agrupan individuos que proceden del banco de germoplasma y tres de un huerto comercial de aproximadamente 15 años de edad. Confirmando la naturaleza *drymifolia* de estos materiales resguardados en el banco de germoplasma, con sus homólogos en los huertos comerciales de la zona de Perivan, Michoacán. Es el grupo menos divergente en el cual están principalmente individuos de la región aguacatera Michoacán.

En el grupo II se encuentran individuos con aparente entrecruzamiento entre el aguacate criollo mexicano, aguacate Hass y aguacate criollo guatemalteco.

Debido a que este grupo engloba a materiales de aguacate Hass colectado en Michoacán, así como otros híbridos provenientes de este cultivar y más aun como mediadores de las ramas de conexión entre los subgrupos IIa y IIb se tiene a individuos de aguacate criollo guatemalteco.

Individuos procedentes de vivero se encuentran en este grupo, lo que haría pensar que todos podrían caer en esta clasificación, sin embargo son los mínimos, es de notar que la mayoría de los individuos que conforman estos subgrupos además de los ya mencionados, sean individuos caracterizados previamente fenotípicamente como aguacates criollos mexicanos los cuales se resguardan en un banco de germoplasma.

La explicación no parecería muy sencilla sin embargo puede inferirse al saber que los individuos resguardados en este banco de germoplasma fueron obtenidos a partir de semillas colectadas a lo largo del territorio mexicano (Sánchez-Pérez, 1999), lo que explicaría una posible hibridación con otras variedades o cultivares de *Persea* y dado que el banco de germoplasma es de reciente creación podría inferirse que ya el flujo de huertas con aguacates como cv. Hass ya se encontraban presentes en estas zonas.

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.

Al final con la menor similitud genética (las más distantes de todas) se ubicaron a los individuos PADb24 de Jalancingo Veracruz y PAA1 de El Carmen, Campeche.

Dado que la identificación de cultivares es tradicionalmente basada en características morfológicas los marcadores genéticos proveen un identificación más precisa del los genotipos y son de gran interés para la caracterización de frutales (Wünsch y Hormaza, 2002).

Múltiples estudios se han realizado para intentar clasificar materiales vegetales por izoenzimas (Market y Moller, 1959; Moore y Durham, 1992; Mallikarjuna *et al.*, 1994) específicamente en aguacate se han utilizado diversas técnicas como RFLP (Ashworth y Clegg, 2003), Minisatelites (Mhammeed *et al.*, 1997), RAPD (Sharon *et al.*, 1998) y más recientemente los SSRs (Birnbaum *et al.*, 2003; Schnell *et al.*, 2003)

Los marcadores microsatelites (Litt y Luly, 1989; Tautz, 1989) se están convirtiendo en la elección para determinar huellas génicas dado su alto grado de polimorfismo y reproducibilidad (Gupta y Varshney, 2000; Wünsch y Hormaza 2002), dado que los marcadores de este tipo pueden ser aplicados fácilmente en las secuencias flanqueantes que frecuentemente están muy conservadas entre especies y géneros (Downey y Iezzoni 2000; Hormaza, 2002; Yamamoto *et al*, 2001). Específicamente en este estudio se puede poner como ejemplo a los pares de oligonucleótidos Agua4 y Agua5 los cuales en los 50 individuos en estudio se genero amplificación de este locus (Figura 14).

Algunos marcadores SSRs fueron curiosamente amplificados solo por algunos materiales siendo que para el oligonucleotido Agua2 y Agua8 fueron exclusivamente amplificados en los materiales catalogados como *drymifolia*, el oligonucleótido Agua11 solamente fue amplificado en individuos de la variedad americana y para el oligonucleotido Agua17 solo se presento amplificación de este locus en individuos de la variedad guatemalteca o híbridos con esta variedad (Figuras 14 y 15).

Con estos resultados se podría esbozar una idea de encontrar locus específicos para cada una de las variedades para una caracterización molecular completa y así inferir grados de hibridación dentro de diferentes materiales a muy corto plazo, así como la movilización de materiales o los lugares de procedencia de estos como se ha demostrado en estudios anteriores donde organismos con grados de parentesco, hibridación o posición geográfica se han descrito (Rincón-Hernández, 2009).

Los resultados confirman la eficiencia de los SSRs para la caracterización de materiales de aguacate así mismo se ha demostrado la conservación de ciertos locus en las diferentes variedades de *Persea* mostrándose así que algunos de ellos pueden ser utilizados en la variación intraespecífica en variedades

relacionadas ya que la habilidad para amplificar loci y detectar polimorfismos usualmente decrete al aumentar la distancia genética (Steinkeller *et al.*, 1997; White y Powell, 1997; Maguire *et al.*, 2000; Roa *et al.*, 2000).

El hecho de utilizar tres fuentes de ADN (hojas, raíces y hojas secas) favorece la obtención de material genético de cualquier parte de la planta y en cantidad suficiente para amplificación de SSRs para la caracterización del material vegetal incluso en cualquier época del año. La detección de SSRs usando electroforesis en geles de poliacrilamida favorece la identificación de los alelos microsatelites, favoreciendo la separación de los productos de amplificación para una lectura más confiable a una resolución mayor comparados con los corrimientos en geles de agarosa.

En este trabajo la amplificación de SSRs en aguacate de previos trabajos fue posible para los 17 probados (100%) sin embargo, para algunas variedades en estudio como en *Persea americana* var. *drymifolia* solo amplificaron 15 de los 17 (88%), en *Persea americana* var. *guatemalensis* 14 de los 17 (82%) fue amplificado y para *Persea americana* var. *americana* 14 de 17 SSRs probados (82%) posiblemente debido a la diferencias en relación filogenética de las variedades de aguacate (Chanderbali *et al.*, 2008).

El dendrograma agrupa a los 50 genotipos de aguacate en tres grandes grupos acorde a sus variaciones en amplificación y patrón de bandeo, de las cuales también es de notar que indirectamente se agrupan a individuos de las mismas zonas geográficas lo que podría inferir el posible origen de estos materiales de acuerdo con su área de cultivo, probablemente reflejando también la selección local de los materiales silvestres. Uno de los grupos contiene genotipos de la zona aguacatera de Michoacán, el segundo a individuos emparentados con cultivares comerciales como el Hass, y *Persea americana* var. *guatemalensis* del cual se origina el hass y donde el porcentaje de hibridación es de 42% x 58% (*drymifolia* x *guatemalensis*) (Chen *et al.*, 2008); y el tercero agrupa a los

individuos más lejanos como lo es *Persea americana* var. *americana* y otro material de la zona suroeste del territorio mexicano.

La identificación de genotipos puede proporcionar una referencia de estandarización de cualquier cultivar y controlar su propagación, independientemente de cualquier factor que puede estar influenciado por la caracterización fenotípica como el ambiente, la temporada del año o la edad del árbol. Así mismo la posibilidad de estudiar la diversidad genética en diferentes cultivares o híbridos comerciales y poblaciones con la finalidad de desarrollar programas de conservación, mejoramiento y resguardo de materiales de *Persea americana* var. *drymifolia*, para caracterización de materiales parentales elite para cruzamiento y mejora genética y manejo de germoplasma masa maximizar la conservación de germoplasma.

El alto nivel de polimorfismo detectado con los SSRs indica el alto grado de variación genética existente en las colectas del aguacate *Persea americana* var. *drymifolia*, analizadas en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos indicaron la amplia diversidad genética que existe en el banco de germoplasma de aguacate. La utilización de los SSRs para detectar variación, incluso en individuos estrechamente emparentados, fue corroborada en este trabajo y coincide con lo reportado por (Nybom y Hall 1991; Clegg *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2007; Schnell *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; Librada-Alcaraz y Hormaza, 2007; Viruel *et al.*, 2007), quienes destacan que los SSRs 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. Los SSRs 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).

Previos esfuerzos por tratar de caracterizar la diversidad de los cultivares y fuentes de germoplasma de aguacate usando marcadores microsatélites conjuntamente con distancias genéticas y el análisis de sus componentes principales (Ashworth y Clegg 2003; Schnell *et al.*, 2003) han sufrido de la necesidad de asignaciones a priori al intentar esbozar conclusiones de la composición genética y de la dificultad para lidiar con los análisis de distancia de los híbridos.

La mayoría de los microsatélites produjeron productos de amplificación, con pocas excepciones. Esto significa que la secuencia de iniciadores diseñada de las regiones flanqueantes son altamente conservadas a pesar del heterogéneo origen de las muestras. El polimorfismo en los microsatélites se debe a la diferencia en la longitud de cada alelo. La diferencia entre los alelos reportados en este trabajo fue de 1 a 34bp.

La mayoría de los iniciadores amplificaron un solo locus, aunque algunos iniciadores mostraron un claro segundo locus, presumiblemente debido a la ocurrencia de duplicaciones cromosómicas. Estas mutaciones parecen haber sucedido en sólo algunos individuos debido a que se pudo apreciar un porcentaje alto de alelos nulos en algunos de los segundos locus.

La información colectada de los marcadores microsatélites fue también usada para analizar la diversidad genética entre los genotipos probados. Los coeficientes de similitud (SM) (Cuadro 7) estimados para los genotipos posibles los cuales estuvieron en el rango de 0.44 a 1. Resultados que sugieren niveles medios de diversidad entre los once genotipos.

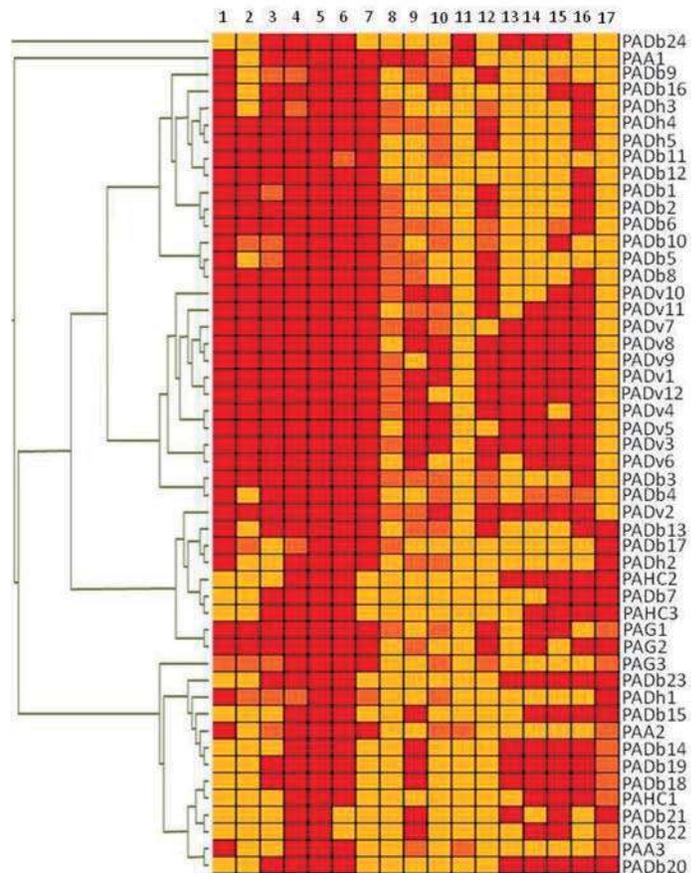


Figura 14. Patrón de bandeo de los individuos estudiados rojo de los tres corrimiento efectuados la banda siempre se presento; naranja de los tres dos ocasiones se presento la banda; amarillo ausencia de amplificación de estos loci en las tres corridas.

El árbol filogenético sugiere que mientras los genotipos de diversas poblaciones pueden estar agrupados dentro del mismo grupo, los genotipos de un mismo lugar de procedencia, frecuentemente pertenecen a varios grupos. Estos datos indican la gran movilización del germoplasma, por lo tanto los programas de mejoramiento genético se deben concentrar en la búsqueda de genotipos más diversos pero conservando las características puras de las poblaciones, las cuales pueden ser identificados utilizando los marcadores desarrollados en el presente trabajo.

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 Ogiwara, 1997; Prevost y Wilkinson, 1999).

Realizando un estudio de 17 loci en 50 materiales de aguacate se puede inferir el estado de hibridación que presentan, debido a las dificultades con la amplificación de algunas muestras no todos los individuos pudieron ser analizados en todos los loci resultando tamaños de muestra menores de los esperados.

Cuando se asignaron las composiciones genómicas de cultivares relativos a los 3 grupos silvestres, se identificó el pensamiento de que todos los cultivares comparten un ancestro esto sugiere fuertemente que las poblaciones del sur de México son muy similares con el grupo guatemalteco y probablemente tengan alotipos similares. Los resultados solo pueden corroborar que los aguacates antillanos se originaron en zonas diferentes más hacia el sur de Guatemala lo cual es consistente con la propuesta del origen de las razas de aguacate (Sanchez-Colin *et al.*, 1998).

En este caso 14 de las 41 progenies se encontró que eran híbridos. Estos análisis sirven como herramienta para distinguir entre organismos puros e híbridos los cuales se producen por el entrecruzamiento de dos variedades para la presencia de materiales híbridos o de otro cultivar.

Los SSRs pueden ser utilizados para ambas identificaciones y es una poderosa herramienta para mejorar la metodología de hibridación por la identificación del linaje con los tratamientos importantes en agricultura debido al decrecimiento del número de generaciones necesarias para la introgresión de genes (Hillel *et al.*, 1990).

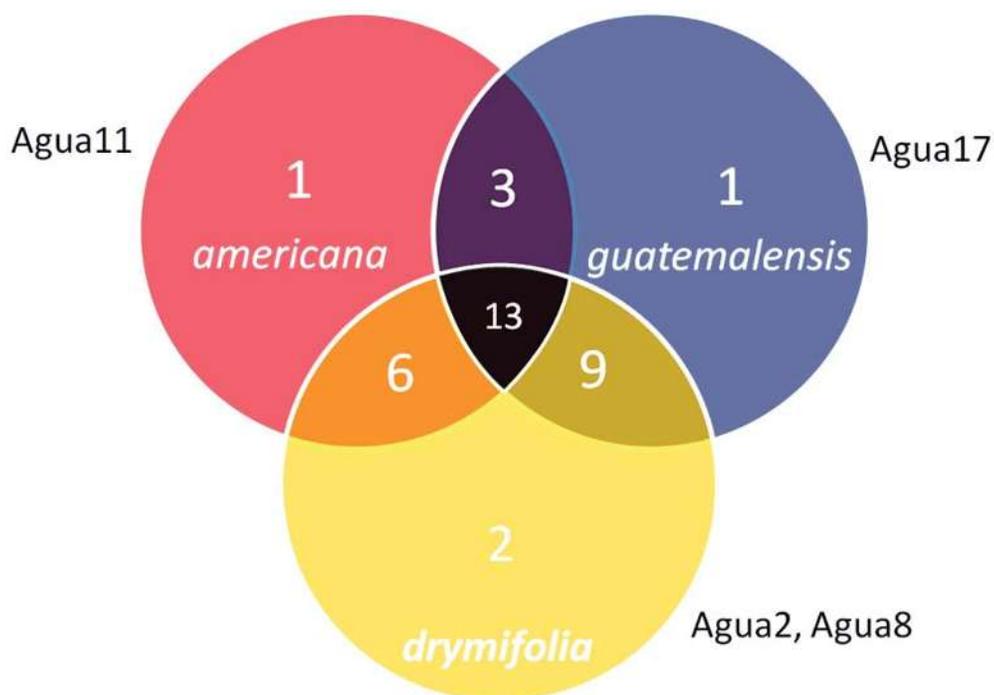


Figura 15. Diagrama de Venn de los juegos de marcadores SSRs utilizados en el presente trabajo. Circulo Rojo corresponde al numero de marcadores compartidos y específicos para los individuos de Aguacate Antillano; Azul: Guatemalteco y Amarillo: Mexicano. Los puntos de intersección entre los círculos informan los marcadores SSR's que comparten entre si.

Por medio del cultivo de tejidos vegetales, puede ayudar a la propagación de materiales de estas características a través de un sistema de regeneración de planta completa de aguacate, o incluso la polinización y germinación de materiales controlados que garanticen cargas génicas favorables, lo que permitiría poder obtener plantas libres de enfermedades o con la capacidad de atacarlas más eficientemente, y así obtener plantas con características agronómicas deseables.

Los aguacates mexicanos y antillanos mostraron la relación más baja uno respecto con el otro ($35 \pm 3\%$), los aguacates mexicanos con respecto a los guatemaltecos con estrecha relación ($30 \pm 1\%$) y los guatemaltecos con respecto a los antillanos también con una estrecha relación filogenética ($41 \pm 10\%$).

La caracterización agromorfológica y molecular de materiales es una actividad primaria para el uso de germoplasma. El estudio de la variedad agromorfológica 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, es una herramienta poderosa para que los recursos genéticos puedan evaluarse y caracterizarse a un nivel de ADN (Lanaud y Lebot, 1995) e incluso es posible realizar comparaciones filogenéticas entre poblaciones de una misma especie o entre especies muy próximas entre sí (Avisé, 1994).

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).

El estudio realizado para la presente tesis provee un grupo de marcadores moleculares microsatélites beneficiosos para aplicaciones en estudios genéticos y en programas de mejoramiento genético de Aguacate (Figura 15).

9 CONCLUSIÓN

Los microsatélites utilizados lograron la identificación exitosa de individuos de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sin ningún grado de hibridación con otra variedad o cultivar.

10 LITERATURA CITADA

Abajian, C. 1994. Sputnik. <http://espressosoftware.com/pages/sputnik.jsp>

Abo-Elwafa, A., Murai, K. y Shimada, T. (1995). Intra and inter-specific variations in Lens revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 335-340.

Ahner, D., Lee, M., Austin, D.F., Livini, C., Woodman, W.L., Openshaw, S.J., Smith, J.S.C., Porter, K. y Dalton, G. (1996). Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with DNA markers and pedigree information. *Crop Science* 36: 1385-1392.

Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. y Cregan, P.B. (1992). Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.

Aranguren-Méndez, J., Jordana, J. y Gómez, M. (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.*, 33: 243-252.

Archak, S., Gaikmad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V., Swamy, K.R., Karihaloo, J.L. (2003). Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46(3):362-369.

Arumuganathan, K., Earle, E.D., (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 208–218.

Albert, V. A., Soltis, D. E., Carlson, J. E., Farmerie, W. G., Wall, P. K., Ilut, D. C., Solow, T. M., Mueller, L. A., Landherr, L. L., Hu, Y., Buzgo, M. S., Kim, M.,- Yoo, J., Frohlich, M. W., Perl-Treves, R., Schlarbaum, S.E., Bliss, B.J., Zhang, X., Tanksley, S. D., Oppenheimer, D. G., Soltis, P. S., Ma, H., DePamphilis, C. W., y Leebens-Mack, J. H. (2005). Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biology*. 5:5, doi:10.1186/1471-2229/5/5.

Alcaraz, M. L. y Hormaza, J. I. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*, 144:244–253.

Anderson, E. (1949). *Introgressive hybridization*. Wiley, Nueva York

Appels, R. y Dvorak, J. (1982). The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species. *Theor Appl Genet* 63: 337-348.

Ashworth, V. E. T. M., Kobayashi, M. C., De La Cruz, M., y Clegg, M. T. (2004). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Sci. Hort.* 101:255-267.

Ashworth, V.E.T.M., Clegg, M.T., (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.). Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *J. Hered.* 94, 407–415.

Ax, P. (1987). *The Phylogenetic System. The systematization of organism on the basis of their phylogenies*. John Wiley, Chichester.

Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Revisión bibliográfica, Agronomía mesoamericana*, 17(2): 223-242.

Avise, J.C. (1994). *Molecular markers. Natural History and evolution*. Chapman & Hall. New York.

- Barker, H., Webster, K. D. y Reavy, B. (1993). Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Research* 36, 13-20.
- Baum, D.A. y Donoghue, M.J. (1995). Choosing among alternative “phylogenetic” species concepts. *Systematic Botany* 20:560-573.
- Baverstock, P.R. y Moritz, C. (1996). Project Design. In: *Molecular Systematics*. (ed. D. M Hillis, C. Moritz and B. K. Mable) Sinauer Associates, Inc, Sunderland. pp 17-29.
- Beckmann, J.S., y Soller, M. (1990). Toward a unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* 8:930-932 .
- Bello-González, M. A. (2006). Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.
- Benson, G. (1999). Tandem repeat finder: a program to analyze DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 27, 573-580.
- Ben Ya'acov, A. (1995). The taxonomy of the avocado: A proposed new classification of the *Persea*, Sub-Genus *persea*. Proc. World Avocado Congr. III. Tel Aviv, Israel p. 3-ABT-7.
- Ben Ya'acov, A., Lopez, L.I., De La Cruz, T.E. y Barrientos – Priego, A.F. (1992a). A study of avocado germplasm resources, 1988 – 1999. II. Findings from the central part of Mexico. Proc. of second world Avocado Congress pp. 543 – 544.
- Bergh, B.O. (1986). *Persea americana*. In: Halevy, A.B. (ed.) CRC Handbook of flowering, Vol. 5. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 253-268.
- Bergh, B.O. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. California Avocado Society Yearbook 76, 61-75.
- Bergh, B.O. y Lahav, E. (1996). Avocados. In: Janick, J. y Moore, J.N. (eds) Fruit Breeding, Vol. I: Tree and tropical fruits. John Wiley & Sons, West Lafayette, Indiana pp 113-166.
- Biale, J. B., Young, R. E. (1971). The avocado pear: In: The Biochemistry of Fruits and their Products Vol. 2. A C Hulme (ed). Academic Press. New York. pp:1-63.
- Billotte, N., Marseillac, N., Risterucci, A.M., Adon, B., Brottier, P., Baurens, F.C., Singh, R., Herran, A., Asmady, H., Amblard, P., Durand-Gasselin, T., Courtois, B., Asmono, D., Cheah, S.C., Rohde, W., Ritter, E., y Charrier, A. (2005). Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics* 110(4):754-765.
- Birnbaum, K., Desalle, R., Peters, C. y Benfey, P. (2003). Integrating gene flow, crop biology, and farm management in on-farm conservation of Avocado (*Persea americana*, Lauraceae). *American Journal of Botany* 90(11):1619-1627.
- Bjørnstad, G. y Røed, K.H. (2001). Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal Genetics* 32, 59–65.
- Boehmer, H. (1760). *Definitiones Genera Plantarum* 64 Ludwig.
- Borojevic, S. (1990). Principles and methods of plant breeding. *Developments in Crop Science* 17. Elsevier Sci. Publ. B.V. pp 368.

- Borrone, J.W., Schnell, R.J., Violi, H.A., y Ploetz, R.C. (2007). Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequence tags. *Mol. Ecol. Notes* 7:439–444.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R. y Cavalli-Sforza L.L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
- Bowman, K.D. y Scora, R.W. (1992). The necessity of avocado germplasm resources. *Proc. of Second World Avocado Congress* pp 531-534.
- Brown, S. M. y Lomolino, M.V. (1998). *Biogeography*, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Bruns, T. D., White, J. y Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564.
- Bush, R. M. (2001). Predicting adaptive evolution. *Nature Reviews Genetics.* 2:387–392.
- Buth, D. G. (1984): The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann. Ecol. Syst.* 15: 501–522.
- Cardle, L., Ramsay, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D., Waugh, R. (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics.* 156:847–854.
- Castro, M., Oyanedel, E. y Cautín, R. (1995). *In vitro* shoot proliferation in avocado (*Persea americana* Mill.) induced by CPPU. *Proc. World Avo. Cong. III.*, 223–226.
- Caujape-Castells, J. y Jansen, R.K., (2003).- The influence of the Miocene Mediterranean dessication on the geographical expansion and genetic variation of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (*Colchicaceae*). *Molec. Ecol.* 12: 1515-1525.
- Cavalli-Sforza, L. L. y Edwards, W. F. (1967). Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics.* 19: 233-257.
- Cervera, M., Cabezas, J., Martínez, J. (2002). Análisis genético de la vid (en línea). Madrid, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.rubes.es/ace/ciencia56_1.htm
- Chambers, G. K. y MacAvoy, E. S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 126: 455–476.
- Chanderbali, A.S., Albert, V.A., Ashworth, V.E.T.M., Clegg, M.T., Litz, R.E., Soltis, D.E. y Soltis, P.S. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomic era. *Bioessays.* 29:1-11.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., y McVean, G.A. (2001). Genome sequences and evolutionary biology, a two-way interaction. *Trends in Ecol Evol* 16(5):235-242.
- Chen, H., Morrell, P.L., Ashworth, V.E.T.M., De La Cruz, M. y Clegg, M.T. (2008). Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. *Journal of Heredity* 99: 1 – 10.
- Chen, H., Morrell, P.L., De La Cruz, M., y Clegg, M.T. (2008b). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *J. Hered.* 99: 382-389.
- Cheng, H.H., y Crittenden, L.B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* 73: 539-546.

- Christoffersen, M.L. (1995). Cladistic Taxonomy, Phylogenetic Systematics, and Evolutionary Ranking. *Syst. Biol.* 44(3): 440-454
- Clarck, A. y Lanigan, C.M.S. (1993). Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10:1096-1111.
- Clarke, B.C., Moran, L.B. y Appels, R. (1989). DNA analyses in wheat breeding. *Genome* 32: 334-339.
- Clegg, M., Kobayashi, T. y Zhong Li, J. (1999). The use molecular markers in the management and improvement of avocado (*Persea americana* Mill.) *Revista Chapingo serie Horticultura.* 5: 227-231.
- Clusius, C. (1610). *Rariorum Stirpium Historia* 1:2 Antwerpia, Plantinus, 766p.
- Crawford, D.J. (1990). *Plant Molecular Systematics: Macromolecular Approaches.* Wiley, Nueva York.
- Cregan, P.B. (1992). Simple sequence repeat DNA length polymorphism. *Probe* 2:18-22.
- Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E. y Guyer, M. S. (2003). A vision for the future of genomics research A blueprint for the genomic era. *Nature* 422, 835-847
- Cummings, K. y Schroeder, C.A. (1942). Anatomy of the avocado fruit. *California Avocado Society Yearbook* 1942, 56-64.
- Davenport, T.L. (1986). Avocado flowering. *Horticultural Reviews* 8, 257-289.
- Davenport, T.L., Parnitzki, P., Fricke, S. y Hughes, M.S. (1994). Evidence and significance of self-pollination of avocados in Florida. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:1200-1207.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M. y Clegg, M.T. (1998). Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *J. Hered* 89: 319-323.
- Decker-walters, D.S., Chung, S.M., Staub, J.E., Quemada, H.D. y López-Sesé, A.I. (2002). The origin and genetic affinities of wild populations of melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) in North America. *Plant Systematic and Evolution* 233(3-4):183-197.
- Degani, C. y Gazit, S. (1984). Selfed and crossed proportions of avocado progenies produced by caged pairs of complementary cultivars. *HortScience* 19, 258-260.
- Degani, C., Glodring, A., Adato, I., El Batsri, R. y Gazit, S. (1990). Pollen parent effect on outcrossing rate, yield, and fruit characteristics of Fuerte avocado. *HortScience* 25, 471-473.
- De haro, J.J. y Melic, A. (1998). Debates entomológicos online: Taxonomía, Sistemática, Filogenia y Clasificaciones. *B(23):* 57-58. disponible en formato HTML en: <http://entomologia.rediris.es/documentos/taxonomia.htm>
- Deshmukh, V.P., Thakare, P.V., Chaudhari, U.S. y Gawande, P.A. (2007). A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb) Wight and Arnot. *Elect. J. Biotechnol.* 10: p. 3.
- Dnyaneshwar, W., Preeti, C., Kalpana, J. y Bhushan, P. (2003). DNA isolation from fresh and dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant molecular Biology reporter.* 21: 467a-467f.
- Dobzhansky, T. (1950). "Mendelian populations and their evolution," *American Naturalist* 84: 401-418.

- Doebley, J. y Stec, A. (1993). Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F2 populations. *Genetics* 134:559-570.
- Doldi, M. L., Vollmann, J. y Leley, T. (1997). Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. *Plant Breed.* 116:331-335.
- Downey, S. y Lezzoni, A. (2000) Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 125:76-80.
- Doyle, J.J. (1993). DNA phylogeny, and the flowering of plants systematic. *BioScience* 43: 380-389.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Dubreuil, P., Dufour, P., Krejci, E., Causse, M., De Vienne, D., Gallais, A., y Charcosset, A. (1996). Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups. *Crop Sci* 36: 790-799
- Eding, J.H. y Meuwissen, T.H.E. (2001). Marker based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 118: 141-159.
- Elena, S.F., Moya, A. y Gonzalez-Candelas, F. (1996). Sobre la simulación de procesos de evolución molecular: consideraciones sobre la derivación y contrastación de un estimador de la varianza de la divergencia nucleotídica a partir de fragmentos de restricción. *Qüestiió* 20: 327-346
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen pp220.
- Fisher, R. A., (1959). Natural selection from the genetical standpoint. *Aust. J. Sci.* 22: 16-17..
- Furnier, G.R., Cummings, M.P. y Clegg, M.T. (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction site variation. *Journal of Heredity* 81:183-188.
- Galindo-Tovar, M.E., Ogata-Aguilar, N. y Arzate- Fernandez, A.M. (2007). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55(3): 441-450.
- Gama, C. y Gómez, P.A. (1992). An ethnoecological approach for the study of *Persea*: A case study in the maya area. *Proceedings of Second World Avocado Congress*, p. 11-17.
- Ge, X.J., Liu, M.H., Wang, W.K., Schaal, B.A. y Chiang, T.Y. (2005). Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprint and cpDNA PCR-RFLP. *Molecular Ecology* 14(4)933.
- Giannasi, D.E., Zurawski, G., Learn, G. y Clegg, M.T. (1992). Evolutionary relationships of the *Caryophyllidae* based on comparative *rbcL* sequences. *Syst Bot* 17:1-15.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. y Feldman M.W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- Goldstein, D.B. y Pollock, P.D. (1997). A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* 88:335-342.
- Goldstein, D.B. y Schötterer, C. (Eds.). (1999). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.

- González-Candelas, F. y Montolío, A. (2000). Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. *J. Hered.* 91: 134-141.
- Gottlieb, L. D. (1971). Evolutionary relationships in the outcrossing diploid annual species of *Stephanomeria* (Compositae). *Evolution* 25: 312-329.
- Graner, A., Ludwingm, W.F. y Melchinger, A.E. (1994). Relationships among European barley germplasm: II. Comparison of RFLP and pedigree data. *Crop Science* 34:1199-1205.
- Gupta, P.K. y Varshney, R.K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Hadrys, H., Balick, M. y Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1: 55-63.
- Hamada, H., Petrino, M.G. y Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential in widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:6465-6469.
- Harlan, J.R. (1992). *Crops and Man*. American society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. Madison Wisconsin.
- Harlan, J. R. y De Wet J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509-517.
- Hearne, C.M., Ghosh, S. y Todd, J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 8: 288-294.
- Heister, L. (1763). In: Fabricius, *Ennumeratio Methodica Plantarum Horti Medici Helmstadiensis* edn. 2. 400.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic Systematics*, 3rd edition, trans. D.D. Davis y R. Zanderl. University of Illinois Press, Urbana Illinois.
- Hibbett, D. S. y Vilgalys, R. (1991). Evolutionary relationships of *Lentinus* to the *Polyporaceae*: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 83: 425-439.
- Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R. y Michelmore, R. (1996). PCR-based fingerprint using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1202-1210.
- Hillel, J., Schaap, T., Haberfeld, A., Jeffreys, A.J., Plotsky, Y., Cahaner, A. y Lavi, U. (1990). DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. *Genetics* 124: 783-789.
- Hillis, D.M., Moritz, C. y Mable, B.K. (1996). *Molecular systematic of plants*, 2ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hormaza, J.I. (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor Appl Genet.* 104:321-328.
- Huff, D.R. (1997). RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science* 37:557-564.

Jarne, P. y Lagoda, J.L. (1996). Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424-429.

Jeffreys, A.J., Wilson, V. y Thein, S.L. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.

Kantely, R.V., Zhang, X., Bennetzen, J.L. y Zerh, B.Z. (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., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. y Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2: 1-47.

Karp, A. y Edwards, K. (1998). DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.

Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S. y Thomas, M.R. (1995). An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis with *Citrus* and related species. *Genome* 38: 349-355.

Kobayashi, M., Lin, J.Z., Davis, J., Francis J.L. y Clegg M.T. (2000). Quantitative analysis of avocado out crossing and yield in California using RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 86: 135-149.

Krueger, R. y Roose, M. (2003). Use of molecular marker in the management of citrus germplasm resources. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(6):827-837.

Kumar, S. y Filipski, A. (2001). "Molecular Phylogeny Reconstruction" in *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Ltd, Oxford, UK. <http://www.els.net>

Lafontaine, D.L.J. y Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2: 514---520.

Lamboy, W.F. y Alpa, C.G. (1998). Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 182-188.

Lagercrantz, U., Ellengren, H. y Andersson, L. (1993). The abundance of microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* 21:1111-1115.

Lahav, E. y Gazit, S. (1994). World listing of avocado cultivars according to flowering type. *Fruits* 49, 299 – 313.

Lanaud, C. y Lebot, V. (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., Akkaya, M. y Bhagwat, A. (1994). Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* M). *Euphytica* 80(3):171-177.

Lavi, U., Cregan, P.B. y Hillel, J. (1994b). Application of DNA markers for identification and breeding of fruit trees. *Plant Breeding Reviews* 12: 195-226.

Lavi, U., Lahav, E., Genizi, A., Degani, C., Gazit, S. y Hillel J. (1991). Quantitative genetic analysis of traits in avocado cultivars. *Plant Breeding* 106: 149-160.

- Lee, D.J., Berding, N., Jackes B.R. y Bielig L.M. (1998). Isozyme markers in *Saccharum* spp. Hybrids and *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jeswiet. Australian Journal of Agricultural Research 49: 915-921.
- Lee, S., Shin, J.S., Park, K.W. y Hong, Y.P. (1996). Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. Theoretical and Applied Genetics 92(6):719-725.
- Librada-Alcaraz, M. y Hormaza, J.I. (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.
- Lin, R. C., Ding, Z.S., Li L.B. y Kuang T.Y. (2001). A rapid and efficient DNA Minipreparation suitable for screening transgenic plants. Plant Molecular Biology Reporter 19: 379a-379e.
- Litt, M. y Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44, 397–401.
- Lopez-Gomez, R. y Gomez-Lim M.A. (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. Horticultural Science 27(5): 440-442.
- Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P. (2004). Ecological genetics; design, analysis, and application. Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.
- Linnaeus, C. (1753). Species plantarum 1, 379 L. Salvius, Stockholm.
- Maddison, W. P. (1995). Phylogenetic histories within and among species. in Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. Monographs in systematics, in: Hoch and A. G. Stevenson, (eds.). Missouri Botanical Garden, St. Louis. 53: 273-287
- Maguire, T.L., Edwards, K.J., Saenger, P. y Henry, R. (2000). Characterisation and analysis of microsatellite loci in mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). Theor Appl Genet 101: 279-285.
- Mailer, R.J., Scarth, R. y Fristensky, B. (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 697-704.
- Mallikarjuna, K. A., Zee, F. y Marshardt, R.M. (1994). Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. Euphytica 79: 87-99.
- Market, C. y Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. 45:753-763.
- Martin, D. N., Proebsting, W. M., y Hedden, P. (1997). Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94: 8907–8911.
- Martin, W., Lydiate, D., Brinkmann, H., Forkmann, G., Saedler, H. y Cerff R. (1993). Molecular phylogenies in angiosperm evolution. Molecular Biology and Evolution 10: 140-162.
- Maughan, P. J., Saghai–Maroof, M. A. y Buss, G. R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. Genome 38:715–723.

- Mayr, E. (1969). The biological meaning of species. *Biol. J. Linn. Soc.* 1, 311-320.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. y Lavi, U. (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 279-286.
- Mhameed, S., Hillel, I., Lahav, E., Sharon, D. y Lavi, U. (1995). Genetic association between DNA fingerprint fragments and loci controlling agriculturally important traits in avocado (*Persea americana* Mill.). *Euphytica* 81:81-87.
- Meissner, C.F. (1864). *Lauraceae*. In: De Candolle, *Prodromus* 15(1), 1-260.
- Menkir, A., Goldsbrough P. y Ejeta G. (1997). RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. *Crop Science* 37:564-569.
- Mez, C. (1889). *Lauraceae americane* (monographice). *Jahrbuch Koeniglicher Botanischer Garten Berlin* 5, 1 – 566 pl. 1-3.
- Mhameed, S., Sharon, D., Hillel, J., Lahav, E., Kaufman, D. y Lavi, U. (1996). Level of heterozygosity and mode of inheritance of variable number of tandem repeat loci in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 778-782.
- Moore, A.G. y Durham, R.E. (1992). Molecular markers. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. Ed. By F.A. Hammerschlag. CAB International UK. Pp. 105-139.
- Moreno, S., Gogorcena, Y. y Ortiz, J.M. (1997). Progreso en la caracterización y mejora de la vid (*Vitis vinifera* L.) mediante marcadores moleculares *ITEA* 93(3): 135-155.
- Morgante, M. y Olivieri A.M. (1993). PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182.
- Moritz, C. y Hillis, D. M. (1996). Molecular systematics: context and controversies. In: Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds.). *Molecular systematics*. 2a ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. pp: 1-12.
- Mumm, R.H. y Dudley J.W. (1994). A classification of 148 U.S. maize inbreds. I. Cluster analysis based on RFLPs. *Crop Science* 34:842--851
- Nagamine, Y. y Higuchi, M. (2001). Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 118: 101-109.
- Nagaoka, T. y Ogihara, Y. (1997). Aplicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94(5): 597-602.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M. y Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 76, 5269- 5273
- Nei, M., Tarima, F. y Tateno, T. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal Molecular and Evolution*. 19: 153-170. In: Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York. 1987.

Nei, M. y Miller, J.C. (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125, 873-879.

Nees, C.G.D. (1836). *Systema Laurinarum*. Veit, Berolini, 720pp.

Nybon, H. y Hall, H.K. (1991). Minisatellite DNA "fingerprints" can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53:107-114.

O'Brien, S. J. (1994). A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 91:5748-5755.

O'Donoghue, L.S., Souza, E., Tanksley, S.D. y Sorrels, M.E. (1994). Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphism. *Crop Science* 34: 1251-1258.

Orozco – Castillo, C., Chalmers, K.J., Waugh, R. y Powell, W. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 934-940.

Parani, M., Singh, K. N., Rangasamy, S. y Ramalingam, R.S. (1997). Identification of *Sesamum alatum* x *Sesamum indicum* hybrid using protein, isozyme and RAPD markers. *Indian Journal of Genetics and Plants Breeding* 57: 381-388.

Parasnis, A.S., Ramakrishna, W., Chowdari, K.V., Gupta, V.S. y Ranjekar, P.K. (1999). Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. *Theoretical and Applied Genetics* 99(6):1047-1052.

Patterson, B. y Guthrie, C. (1987). Genome mapping in plants *Cell*, 49, 613-624.

Pavlicek, A., Hrda, S. y Flegr, J. (1999). Free tree free ware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/Jack Knife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica*, 45: 97-99.

Paz, M.M. y Veilleux, R.E. (1997). Genetic diversity based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and its relationship with the performance of diploid potato hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 740-747.

Philippi, R.A. (1895). *Laurineas*. I *Persea* Gaertner. *Anales de la Universidad de Chile* 91, 501.

Phillips, W., Rodríguez, H. y Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.

Plumier, C. (1703). *Nova Plantarum Americanum Genera*. *Persea* 44. Boudot, Paris.

Poisson, S. D. (1838). *Recherches sur la Probabilité des Jugements en Matière Criminelle et en Matière Civile* (Researches on the Probability of Criminal and Civil Verdicts).

Porebski, S., Bailey, L.G. y Baum, B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular Biology Reporter* 15(1): 8-15.

Prabhu, R.R., Webb, D., Jessen, H., Luk, S., Smith, S. y Gresshoff, P.M. (1997). Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP and pedigree. *Crop Science* 37: 1590-1595.

- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Mcnicol, J.W., Machray, G.C., Doyle, J.J., Tingey, S.V. y Rafalsky, J.A. (1995). Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for de chloroplast genome. *Current Biology* 5: 1023-1029.
- Prevost, A. y Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E. y Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.* 8:285-288.
- Rafalsky, J.A. y Tingey, S.V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9: 275-280.
- Rafinesque, C.S. (1838). *Sylva Telluriana* 136. Rafinesque, Philadelphia.
- Rallo, P., Belaj, A., De La Rosa, R. y Trujillo, I. (2002). Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-unio_2000/almazara/almazara1.htm
- Ratnaparkhe, M.B., Tekeoglu, M. y Muehlbauer, F.J. (1998). Intersimple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 97: 515–519.
- Rieseberg, L.H. (1995). The role of hybridization in evolution: Old wine in new skins. *American Journal of Botany* 78: 1218-1237.
- Rieseberg, L.H. y Ellstrand, N.C. (1993). What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Science* 12: 213-241.
- Rincon-Hernandez, C.A. (2009). Identificación de individuos de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) con caracteres ancestrales, por medio de ITS. Tesis. UMSNH. 66pp.
- Ritland, K. y Clegg, M.T. (1987). Evolutionary analysis of plant DNA sequences. *American Naturalist* 130: s74-s100.
- Roa, A.C., Chavarriaga-Aguirre, P., Duque, M.C., Maya, M.M., Bonierbale, M.W., Iglesias, C. y Tohme, J. (2000). Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymor degree of relationship. *Am. J. Bot.* 87: 1647-1655.
- Robinson, T.R. (1926). Avocados for Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 39:182-191.
- Rochambeau, H., De Allain, D., Thebault, R.G. y Vrillon, J.L. (2000). Divergent selection experiment for total fleece weight in angora rabbits: preliminary results. In (Ed.) "7th World Rabbit Congress", Valencia, Spain, 4-7 July 2000, *World Rabbit Science*, 8 (sup. 1):577-581.
- Rodriguez, N.N., Coto, J.L.O., Fuentes, V.R., Ramirez, M.I., Becker, D., Rodriguez, I., Gonzalez, C., Xiqués, S., Roman, M.I., Velazquez, B., Rhode, W. y Jimenez N. (2007). Comparative study of polymorphism level, discrimination capacity and informativeness of AFLP, ISTR, SSR and Isoenzymes 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.
- Roots, E.H. y Baker, R.J. (2002). Distribution and characterization of microsatellites in the emu (*Dromaius novaebollandiae*) genome. *J. hered.* 93:100-106.

- Saghai - Maroof, M.A., Zhang, M.Q. y Biyashev, R. (1995). Comparison of restriction fragment length polymorphism in wild and cultivated barley. *Genome* 38: 298-306.
- Salimath, S.S., De Oliveira, A.C., Goodwin, I.D. y Bennetzen, J.L. (1995). Assessment of genome origins and genetic diversity in genus *Eleusine* with DNA markers. 28: 757-763.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview. New York.
- Sanchez-Colin, S., Mijares-Oviedo, P., Lopez-Lopez, L. y Barrientos-Priego, A.F. (1998). Historia del Aguacate en Mexico. Memoria Fundacion Salvador Sanchez Colin 1998-2001. Coatepec Harinas (Mexico): CICTAMEX. Pp. 171-187.
- Sánchez-Pérez, J.L. (2001). Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México.
- Sánchez-Pérez, J.L. (1999). Recursos Genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines de Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5: 7-18.
- Saxena, S., Chandra, R. C., Srivastava, A.P., Mishra, M., Pathak, R.K. y Ranade, S.A. (2005). Analysis of genetic diversity among papaya cultivar using Single Primer Amplification Reaction (SPAR) methods. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80(32):291-296.
- Schieber, E. y Zentmyer, G.A. (1992). Archeology of the avocado in Latin America. Proc. of second World Avocado Congress, pp 49
- Schlechtendahl, D.F.L. (1831). *Plantarum Mexicanarum* Linnaea 6, 365.
- Schmidt, E. y Helsop-Harrison, J.S. (1996). The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8761-8765.
- Schnell, R.J., Brown, J.S., Olano, C.T., Ayala-Silva, T., Kuhn, D.N. y Motamayor, J.C. (2007). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. En memoria del VI Congreso Mundial del Aguacate. Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso. Viña del Mar, Chile. 12 al 16 de Noviembre de 2007 p. 48.
- Schnell, R.J., Brown, J.S., Olano, C.T., Power, E.J., Krol, C.A., Kuhn, D.N., Motamayor, D.N. (2003). Evaluation of Avocado Germoplasm Using Microsatellite Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(6):881-889.
- Scora, R.W., Wolstenholme, B.N. y Lavi, U. (2002). The avocado: Botany, production and uses Wiley, A.W. Schaffer B. y Wolstenholme B.N. (eds) CABI International. 15- 37pp.
- Senior, M.L. y Heun, M. (1993). Mapping maize microsatellites and polimerase chain reaction confirmation of targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36:884-889.
- Shuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Sharma, P. C., Hüttel, B., Winter, P., Kahl, R., Gardner, C. y Weising K. (1995). The potential of microsatellites for hybridization and polymerase chain reaction based DNA fingerprinting of Chickpea. *Electrophoresis* 16: 1755 – 1761.
- Sharon, D., Cregan, P.B., Mhameed, S., Hillel, J., Lahav, E. y Lavi, U. (1997). An integrated genetic linkage map of avocado. *Theoretical and Applied Genetics* 95:911-921.

SIDTA. (1999). Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Disponible en: <http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>

Smeets, A.J.M., Brunner, H.G., Ropers, H.H. y Wieringa, B. (1989). Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to the study of myotonic dystrophy. *Hum. Genet.* 83:245-251.

Sokal, R.R. y Michener, C.D. (1958). A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *The University of Kansas Scientific Bulletin* 38: 1409-1438.

Sokal, R.R. y Crovello, T.J. (1970). The biological species concept: a critical evaluation. *American Naturalist* 104, 127-153.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Clegg, M.T. y Durbin, M. (1990). rbcL sequence divergence and phylogenetic relationships in *Saxifragaceae* sensu lato. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 87: 4640-4644.

Spooner, D.M. y Lara-Cabrera, S. (2001). Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Instituto de Biología, UNAM. Fondo de cultura económica. México D. F. Pp. 57 – 114.

Spooner, D.M. y Van Den Berg, R.G. (1992). An analysis of recent taxonomic concepts in wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *Gen. Res. Crop Evol.* 39:23-37.

Stallings, R.L. Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C. Hildebrand, C.E. y Moyzis, R.K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807-815.

Staub, J., Danin, P.; Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N. y Katzir, N. (2000). Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Euphytica* 115(3):225-241.

Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E. y Gloszl, J. (1997). Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol Ecol.* 6: 1189-1194.

Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. y Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics*, 2nd edition. Hillis, D.M., Mable B.K. y Moritz, C. (eds). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts pp 407 – 514.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15, 199–203.

Takezaki, N. y M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics.* 144: 389-399.

Tauz, D. (1989). Hypervariability of simple-sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.

Taylor, G.R., Haward, S., Noble, J.S. y Murday, V. (1992). Isolation and sequencing of CA/GT repeat microsatellites from chromosomal libraries without subcloning. *Anal Biochem* 200:125–129.

Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K. y Saelder, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol* 42:115-149.

- Thieme, R. (1997). Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica* 97:189-200.
- Thomas, M.R. y Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86:985-990.
- Tingey, S.V. y Del Tufo, J.P. (1993). Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol* 101: 349-352.
- Tsumura, Y., Ohba, K. y Strauss S.H. (1996). Diversity and inheritance on inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga manziessii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92(1):40-45.
- Valadez, E. y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa Universidad Autónoma Chapingo. México. 147p.
- Vignani, R., Bowers, J.E. y Meredith, C.P.L. (1996). Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* Sangiovese. *Scientia Horticulturae* 65: 163-169.
- Van Raamsdonk, L.W.D. y Van der Maesen, L.J.G. (1996). Crop-weed complexes: The complex relationship between crop plants and their wild relatives. *Acta Botanica Neerlandica* 45: 135-155.
- Van der Werff, H. y Lorea, F. (1997). Familia Lauraceae. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*. 56:45-49
- Velloso, J.M. Da C. (1827). *Flora Fluminensis*. Knecht, Paris 4, 52-59.
- Viruel, M.A., Gross, E. y Barceló-Muñoz, A. (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.
- Viruel, M. A., Escribano, P., Barbieri, M., Ferri, M. y Hormaza, J. I. (2005). Fingerprint, embryo type, and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., *Anacardiaceae*) with microsatellites. *Mol. Breed.* 15:383-393.
- Wals, E.J. (2000). Integrating sustainability in higher agricultural education: dealing with complexity, uncertainty and diverging world views, Interuniversity Conference for Agricultural and Related Sciences in Europe, Ghent, Belgium.
- Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G. y Tanksley, S.D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.
- Warnke, S.E., Douches, D.S. y Branham, B.E. (1998). Isozyme analysis supports allotetraploid inheritance in tetraploid creeping bluegrass (*Agrostis palustris* Huds.). *Crop Science* 38: 801-805.
- Weber, J.L., May, P.E., (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396.
- Weir, B. S., y Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millaseau, P., Vaysseix, G. y Lathrop, M. (1992). A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 359:794-801.

Wendel, J.F. y Doyle, J.J. (1998). Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution. In: P.S. Soltis y J.J. Doyle (eds), Plant molecular Systematics II. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 265-296.

Westman, A. L. y Kresovich, S. (1998). The potential for cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas Theor. Appl. Genet. 96: 272-281.

Whiley, A.W. Schaffer, B. y Wolstenholme, B.N. (2002). The Avocado. Cabi Publishing. UK 403pp.

White, G. y Powell, W. (1997). Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. Mol. Ecol. 6: 1195-1197.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420

Wu, R.S. y Tanksley, S.D. (1993). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241:225-235.

Wünsch, A. y Hormaza, J.I. (2002). Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. Heredity 89: 56-63.

Yamamoto, M., Tomita, T., Onjo, M., Ishihata, K., Kubo, T. y Tominaga, S. (2007). Genetic diversity of White sapote (*Casimiroa edulis* la Llave & Lex.) demonstrated by intersimple sequence repeat analysis. Hort. Science 42(6): 1329-1331.

Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T. y Matsuda, N. (2001). SSRs isolated from Apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor Appl Genet 102: 865-870.

Yang, W.P., De Oliveira, A.C., Godwin, I., Schertz, K. y Bennetzen, J.L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese sorghums. Crop Science 36: 1669-1676.

Yuille, M.A.R., Hampson, R.M., Harris, R.M., Affara, N.A., Yates, J.R.W., Ferguson-Smith, M.A. (1990). CA repeat polymorphism at the ASS locus. Nucleic Acids Res 18:7472

Zhao, X. y Rochert G. (1993). Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.) Plant. Mol. Biol. 21:614-617.