

## **ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE POLIMORFISMO, CAPACIDAD DE DISCRIMINACIÓN E INFORMATIVIDAD DE CARACTERES MORFOAGRONÓMICOS Y DE LOS MARCADORES AFLP, ISTR, SSR E ISOENZIMAS EN AGUACATERO**

N.N. Rodríguez<sup>1</sup>, J. L. Fuentes<sup>2\*</sup>, O. Coto<sup>1</sup>, V. R. Fuentes<sup>1</sup>, I. M. Ramírez<sup>2</sup>, D. Becker<sup>3</sup>, I. Rodríguez<sup>4</sup>, C. González<sup>5</sup>, X. Xiqués<sup>5</sup>, M. I. Román<sup>5</sup>; B. Velázquez<sup>1</sup>, W. Rohde<sup>3</sup> y R. Jiménez<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), 7<sup>th</sup> Ave. # 3005, e/30 y 32, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba. orlandocoto@inica.edu.cu, mejoramiento@iift.cu

<sup>2</sup> Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear. (CEADEN), calle 30 and 5<sup>th</sup> Ave. # 502, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln, Germany.

<sup>4</sup> Empresa de Telecomunicaciones de Cuba, SA (ETECSA), Bauta, Cuba.

<sup>5</sup> Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 23, e/ I y J, Vedado, Habana.

<sup>6</sup> Unidad Científica Tecnológica de Base de Alquizar. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Carretera de Güira – Pestana Km. 2 ½. Alquizar La Habana Cuba. E mail: karygutda@yahoo.es y colaboración@iift.cu

\*Dirección actual: Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Ciudad Universitaria, Carrera 27-Calle 9, Bucaramanga, Colombia.

Se compararon los niveles de polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad de caracteres morfoagronómicos y marcadores AFLP, ISTR, SSR e isoenzimas, empleando 17 genotipos de la colección de germoplasma del IIFT. El poder de discriminación  $D$  utilizado para caracteres morfoagronómicos fue útil para la identificación de genotipos. Cuatro variables fueron suficientes para distinguirlos: forma del fruto, época de cosecha y color y espesor de la corteza del fruto. Los marcadores SSR, ISTR y AFLP constituyeron técnicas poderosas para la discriminación y certificación varietal, pero los marcadores dominantes resultaron los más eficientes. Con una combinación de cebadores AFLP o ISTR se identificaron todos los individuos. A su vez, las isoenzimas resultaron técnicas de bajo costo útiles para este propósito en el germoplasma evaluado. Los niveles más altos de heterocigosidad esperada se detectaron con marcadores codominantes, pero los microsátélites superaron en dos veces o más los obtenidos con isoenzimas y marcadores dominantes. El índice de diversidad morfológica resultó un buen estimador de la diversidad de las accesiones cuando se utilizaron variables de alta heredabilidad, y a su vez comparable con la heterocigosidad esperada determinada con las isoenzimas y los marcadores de ADN. El valor de este índice fue similar a los obtenidos con ISTR y AFLP. El índice de eficiencia del ensayo ( $A_i$ ) y el índice del marcador ( $M_i$ ) tuvieron el mismo patrón de variación que  $D$ ,  $I$ ,  $I_u$  y  $P$  para todos los marcadores moleculares, lo que sugiere que ambos índices probablemente reflejan sobre la capacidad de discriminación en el aguacatero.

## COMPARATIVE STUDY OF POLYMORPHISM LEVEL, DISCRIMINATION CAPACITY AND INFORMATIVENESS OF AFLP, ISTR, SSR AND ISOENZYMES MARKERS AND AGRO-MORPHOLOGICAL TRAITS IN AVOCADO

N.N. Rodríguez<sup>1</sup>, J. L. Fuentes<sup>2\*</sup>, O. Coto<sup>1</sup>, V. R. Fuentes<sup>1</sup>, I. M. Ramírez<sup>2</sup>, D. Becker<sup>3</sup>, I. Rodríguez<sup>4</sup>, C. González<sup>5</sup>, X. Xiqués<sup>5</sup>, M. I. Román<sup>5</sup>; B. Velázquez<sup>1</sup>, W. Rohde<sup>3</sup> and R. Jiménez<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), 7<sup>th</sup> Ave. # 3005, e/30 y 32, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba. orlandocoto@inica.edu.cu, mejoramiento@iift.cu

<sup>2</sup> Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear. (CEADEN), calle 30 and 5<sup>th</sup> Ave. # 502, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln, Germany.

<sup>4</sup> Empresa de Telecomunicaciones de Cuba, SA (ETECSA), Bauta, Cuba.

<sup>5</sup> Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 23, e/ I y J, Vedado, Habana.

<sup>6</sup> Unidad Científica Tecnológica de Base de Alquízar. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Carretera de Güira – Pestana Km. 2 ½. Alquízar La Habana Cuba. E mail: karygutda@yahoo.es y colaboración@iift.cu

\*Dirección actual: Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Ciudad Universitaria, Carrera 27-Calle 9, Bucaramanga, Colombia.

AFLP, ISTR, SSR, isoenzyme markers and agro-morphological traits were compared in terms of their polymorphism level, discriminating capability and informativeness among 17 genotypes assembled in the Cuban avocado germoplasm, maintained at Alquízar under the auspices of the IIFT (Playa, Havana City, Cuba). *D* parameter adopted for agro-morphological traits was useful for genotype identification. Only four variables: fruit shape, fruit skin color, harvest season and fruit skin thickness were necessary for distinguishing all the individuals analyzed SSR, AFLP and ISTR were powerful techniques for avocado discriminating and varietal certification, but the high level of polymorphic loci detected by dominant markers highlights the discriminating capacity of these molecular markers. With a single AFLP or ISTR primer combination all the individuals were identified. Also, isoenzymes were a low-cost technique useful for this purpose in local germplasm. The higher values of expected heterozygosity were detected in codominant markers, but the value for microsatellites doubled or more those obtained with isoenzymes and dominant markers. The morphological diversity index was a good estimator of diversity among avocado accessions when variables of high heritability are used and comparable with the expected heterozygosity scored with isoenzymes and DNA markers. The value of this index was very close to those obtained with ISTR and AFLP. The assay efficiency index ( $A_i$ ) and marker index ( $M_i$ ) had the same pattern of variation as  $D$ ,  $I$ ,  $I_u$  and  $P$  for all molecular markers. Then, both indexes probably reflect on the discriminating capability of avocado.

## 1. Introducción

La preservación de los recursos genéticos del aguacatero (*Persea americana* Mill) en Cuba comienza a principios del siglo pasado y tiene su máxima expresión posterior a 1965 con la fundación del Banco de Germoplasma de Frutales Tropicales y Subtropicales (González *et al.*, 1996-97); hoy Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.

En aguacatero, las variables morfológicas se han usado tradicionalmente para la evaluación de la variabilidad, pero además se ha suplementado con marcadores isoenzimáticos y de ADN (Rodríguez *et al.*, 2003). Los descriptores de aguacatero publicados por el Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI, 1995) sugieren el uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares para caracterizar y distinguir los individuos de las colecciones. Además, la UPOV (Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades de Plantas) promueve nuevos métodos que sean eficientes para la distinción y protección legal de las nuevas variedades obtenidas (Donini *et al.* 2000).

Los objetivos del presente trabajo fueron comparar los niveles de polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad de caracteres morfológicos, marcadores isoenzimáticos y marcadores de ADN, para futuras aplicaciones y manejo del germoplasma cubano de aguacatero.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material vegetal.

Se utilizó un total de 17 accesiones (Tabla 1) y fueron evaluadas a través de 14 caracteres sugeridos por IPGRI (1995) como descriptores altamente discriminativos: Superficie del tronco, color de la rama joven, superficie de la rama joven, forma de la hoja, pubescencia del pétalo y del sépalo (se refiere a los tépalos superiores e inferiores, respectivamente), forma del fruto, coloración de la corteza del fruto, forma del pedicelo, grosor de la corteza del fruto, textura de la pulpa, época de cosecha, forma de la semilla y superficie del cotiledón.

### 2.2. Análisis isoenzimático

Se colectaron hojas jóvenes, se lavaron y se conservaron a 2-3 °C hasta su uso. Se empleó un sistema de corrida en lámina vertical y buffers discontinuos. El gel de separación de poli(acrilamida) empleado fue de 8.5 %, con un buffer de corrida de Tris-Glicina 0.04 M a pH 8.3. Para las isoenzimas peroxidasas y polifenoloxidasas, se utilizó una intensidad de corriente de 30 mA durante 12 horas y para las isoenzimas ascorbato oxidasas, se empleó una intensidad de corriente de 50 mA, durante 5 horas.

Los métodos de tinción empleados para Peroxidasas (E. C. 1.11.1.7), Polifenoloxidasas (E.C. 1.10.3.1.) y Ascorbato oxidasas (E.C. 1.10.3.3.) fueron los sugeridos por González *et al.* (2002).

### 2.3. Extracción y purificación del ADN genómico.

Para la extracción del ADN se utilizó técnica propuesta por Ramírez *et al.* (2004).

### 2.4. Amplificación por PCR del ADN genómico.

Se utilizaron los siguientes marcadores de ADN bajo condiciones de reacción estándar con cebadores marcados (<sup>33</sup>P): Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP; Vos *et al.* 1995), Repeticiones de Secuencias Inversas Marcadas (ISTR; Rohde, 1996) y microsatélites (SSR; Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989).

#### 2.4.1. Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP).

Para la amplificación selectiva se utilizaron un total de 10 combinaciones de cebadores: (E32XM32: E-AAC x M-AAC, E32XM36: E-AAC x M-ACC, E32XM38: E-AAC x M-ACT, E32XM39: E-AAC x M-AGA, E32XM44: E-AAC x M-ATC, E32XM45: E-AAC x M-ATG, E32XM46: E-AAC x M-ATT, E32XM47: E-AAC x M-CAA, E33XM36, E-AAG x M-ACC, E33XM42: E-AAG x M-AGT).. Los pasos de la amplificación fueron los siguientes: 94°C, 30 s; 65°C (-0.7°C/ciclo), 30 s, y 72 °C, 60 s durante 12 ciclos, hasta alcanzar la temperatura óptima de 56 °C. A esta temperatura, se repitieron 24 ciclos para completar la amplificación.

#### 2.4.2. Repeticiones de Secuencias Inversas Marcadas. (ISTR).

Para la amplificación, se emplearon los cebadores F3/ B<sub>2</sub>B previamente designados (Rohde *et al.*, 1996). Las reacciones de amplificación se realizaron de acuerdo con el protocolo de Rohde *et al.* (1995) y el programa de amplificación fue el siguiente: paso 1, 95°C/3min; paso 2, 95°C/ 30seg; paso 3, 45°C/30seg; paso 4, 72°C/2min; paso 5, 72°C/10min, con 40 ciclos entre los pasos del 2 al 4.

#### 2.4.3. Secuencias simples repetidas o microsatélites (SSR).

Se emplearon 15 parejas de cebadores SSR designados por AM1, AM2, AM3, AM5, AM6, AM8, AM9, AM10, AM11, AM13, AM14, AM15, AM16, AM17 y AM18 por Ramírez *et al.* (2005). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 94°C por 30 seg, seguida de 32 ciclos consistentes en 94°C por 15 seg, de 45 °C a 50°C por 25 seg (dependiendo de los cebadores) y 68°C por 25 seg, y finalizando con un paso de 68°C por 2 min.

### 2.5. Corrida en gel de poliacrilamida.

Los fragmentos AFLP, ISTR o SSR amplificados se procesaron por análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con la adición de buffer de secuenciación (Promega, Mannheim, Germany) y desnaturalización por calentamiento a 94 °C. Se corrieron alícuotas de 2-3 µl sobre un gel de secuenciación de poliacrilamida al 4% con buffer 1 x TBE, pH 8.9 y 40 W.

Seguidamente el gel fue fijado en ácido acético al 10%, lavado con agua, secado a 80°C durante una hora y expuesto a una placa de rayos X durante 1-3 días a temperatura ambiente.

## 2.6. Análisis de los datos.

Con los datos morfológicos, el análisis se realizó sobre la base de la presencia (1) o ausencia (0) de los estados de cada variable. De forma similar, las bandas AFLP e ISTR se evaluaron siguiendo el sistema 1/0. A causa de su naturaleza codominante, las isoenzimas y los SSR se analizaron como genotipos homocigóticos o heterocigóticos.

Para comparar los niveles de polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad de los caracteres morfológicos y de los cuatro marcadores moleculares (isoenzimas, SSR, AFLP e ISTR), se estimaron los indicadores sugeridos por Belaj *et al.* (2003) y por Ramírez *et al.* (2005) para cada unidad de ensayo (*U*: variable, sistema enzimático o el producto de la amplificación de la PCR obtenida con una pareja de cebadores)

Para variables morfológicas, el índice de diversidad morfológica se definió como:  $D_m = 1 - \sum p_i^2$  donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ th estado de la variable y la media aritmética del índice como:  $D_M = \frac{\sum D_m}{n}$ , donde  $n$  es el número de

variables analizadas. Además, el índice de diversidad de Simpson (Simpson, 1949) se determinó usando la fórmula:  $D_s = \frac{1}{\sum p_i^2}$ , donde  $p_i$  es la relación entre el número de accesiones detectadas en el estado  $j^{\text{mo}}$  de la variable y el número total de accesiones analizadas, y la media aritmética se calculó usando la expresión:  $D_S = \frac{\sum D_s}{n}$ , donde  $n$  es el número de variables analizadas. Se

determinó el coeficiente de correlación lineal a un nivel de significación del 1% entre el índice de diversidad morfológica ( $D_m$ ) y el índice de diversidad de Simpson ( $D_s$ ).

## 3. Resultados.

### 3.1. Niveles de polimorfismo y capacidad de discriminación de variables morfológicas, isoenzimas y marcadores de ADN.

El análisis con caracteres morfológicos estuvo basado en el polimorfismo detectado a través de la presencia (1) o ausencia (0) de los diferentes estados o clases de cada variable y de la frecuencia derivada de ellos.

Todos los estados fueron polimórficos en las variables analizadas. El número total varió desde 2 para la forma del pedicelo, pubescencia del pétalo y pubescencia del sépalo hasta 7 para la forma del fruto. Este polimorfismo fenotípico generó de 2 a 7 patrones distintivos con un máximo de sólo 2 patrones únicos.

De acuerdo con estos resultados, se necesitaron cuatro variables reproductivas para la discriminación de todos los individuos: Forma, color de la corteza y espesor de la corteza del fruto maduro y la época de maduración (Tabla 1).

La Tabla 2 muestra una comparación de los niveles de polimorfismo y de la capacidad de discriminación de los caracteres morfológicos y de los cuatro marcadores moleculares utilizados. Todos los marcadores fueron altamente polimórficos y efectivos para la identificación de las accesiones de aguacatero estudiadas, aunque los mejores resultados se obtuvieron con los marcadores ISTR y AFLP. Por ejemplo, los mayores valores del número de bandas polimórficas y de los valores promedio del número de bandas polimórficas por unidad de ensayo se detectaron con estos marcadores. Resultados similares se obtuvieron además con el número total de patrones de bandas y patrones de bandas únicos. Por el contrario, los valores de estos índices generados por los 47 estados polimórficos de las variables morfológicas fueron los más bajos, respectivamente. Se encontraron valores intermedios con isoenzimas y SSR. Ninguno de estos índices para cada tipo de marcador se correlacionó con el número total de bandas (o estados) detectados.

Como una consecuencia de los bajos valores de probabilidad de confusión de los cuatro marcadores moleculares, se registraron altos valores de poder de discriminación, especialmente para ISTR y AFLP. Como se esperaba, los valores más bajos de capacidad de discriminación se detectaron con variables morfológicas. Los valores de  $D_L$  estimados para cada uno de los marcadores fueron muy cercanos a los de capacidad de discriminación de cada uno de ellos.

El número de patrones efectivos por unidad de ensayo indicó que se pueden distinguir más de 17, 12, 10 y 8 accesiones para ISTR, AFLP, isoenzimas y SSR con una pareja de cebadores (o sistema enzimático) cuando el tamaño de la población tiende a infinito. Con variables morfológicas solamente pueden ser discriminados más de dos individuos.

### 3.2. Comparación de la informatividad obtenida con variables morfológicas, isoenzimas y marcadores de ADN.

Se calculó un total de ocho indicadores para determinar los niveles de informatividad de los cuatro marcadores moleculares. Además, con el objetivo de comparar los resultados con los obtenidos con variables morfológicas, se definieron un grupo de índices sobre la base del número de estados, la presencia o ausencia de los estados de cada variable y de la frecuencia derivada de ellos, independientemente del número de loci y del tipo de herencia involucrados en las variables analizadas.

El índice de diversidad morfológica varió desde 0,43 para la forma del pedicelo y superficie del cotiledón hasta 0,11 para la superficie del tronco, superficie de la rama joven, pubescencia del pétalo y pubescencia del sépalo. Además, valores relativamente altos se detectaron para el grosor de la corteza del fruto (0,41), textura de la pulpa (0,41) y época de cosecha (0,38) y valores intermedios en el resto de las variables analizadas. Se encontró una

correlación lineal negativa significativa ( $r = -0,70$ ) entre el índice de diversidad morfológica y el índice de diversidad de Simpson.

La Tabla 2 ofrece además una comparación de la informatividad de las variables morfológicas y los cuatro marcadores moleculares empleados. En SSR, se detectó un promedio de 8,27 alelos por locus. Para el mismo marcador, el número de alelos efectivos por locus fue de 4,65, mientras que para ISTR y AFLP fueron más bajos, con valores respectivos de 1,39 y 1,42. En isoenzimas el valor fue algo superior (1,82) con respecto a los marcadores dominantes analizados. Estos valores se reflejaron claramente en la heterocigosidad esperada de todos los marcadores analizados. El índice de diversidad morfológica calculado con las 14 variables fue muy similar a los obtenidos con AFLP e ISTR. Los valores más altos del índice de eficiencia del ensayo y del índice del marcador se encontraron para marcadores dominantes (224,65 y 45,13 en ISTR y 19,55 y 4,04 en AFLP, respectivamente). Los valores distintivos de estos índices en ISTR fue una consecuencia de la detección simultánea de muchos marcadores polimórficos en la única combinación de cebadores utilizada, que influyó directamente en el número total de alelos efectivos y en el radio múltiple efectivo. Sin embargo, los valores más bajos del índice de eficiencia del ensayo y del índice del marcador se observaron en SSR (5,05 y 0,81, respectivamente).

#### 4. Discusión

Una premisa para la utilización de los marcadores genéticos es conocer el grado de polimorfismo, el nivel de discriminación y de informatividad que presentan para utilizarlos correctamente en el manejo de las colecciones.

El alto nivel de polimorfismo observado para los caracteres morfológicos y todos los marcadores moleculares concuerdan con estudios previos realizados con accesiones de aguacatero con variables morfológicas (Rodríguez *et al.*, 2003), isoenzimas (Lima *et al.*, 1982; Sánchez-Romero *et al.*, 1993; González *et al.*, 2002) y diferentes marcadores moleculares (Ramírez *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2005), lo cual confirma la gran diversidad existente dentro del germoplasma cultivado de aguacatero (Ashworth y Clegg, 2003).

Los valores más altos de heterocigosidad esperada se detectaron con marcadores codominantes, lo cual refleja el nivel de informatividad de los mismos, pero el valor detectado con microsatélites supera dos veces o más el obtenido con isoenzimas o con marcadores dominantes. Estos valores siguieron el patrón SSR > Isoenzimas > AFLP > ISTR, como una consecuencia del número efectivo de alelos por locus detectados en cada marcador, resultados que confirman los obtenidos en olivo por Balaj *et al.* (2003). Sin embargo, el valor del índice de diversidad morfológica fue muy similar a los obtenidos con ISTR y AFLP.

Para datos morfológicos, recientemente se han adoptado los conceptos de diversidad ecológica o biológica de las especies vegetales. Con este propósito, las accesiones o variedades locales son clasificadas por clases definidas en función de la expresión fenotípica de los caracteres morfológicos (Chávez,

2003). Louette *et al.* (1997) y Aguirre *et al.* (2000) estimaron de forma exitosa la diversidad mediante el uso de los índices de Shannon, Simpson y Margalef en diferentes muestras de maíz.

El hecho de que los índices de diversidad morfológica y de Simpson estén correlacionados sugiere que el primero de ellos es a su vez efectivo para estimar la diversidad dentro de las colecciones de aguacatero. Como se conoce, los caracteres morfológicos son influenciados por las condiciones ambientales, pero si el análisis contiene variables con alta repetibilidad (heredabilidad  $\gamma > 1$ ), se minimiza esta problemática (Chávez, 2003).

Tessier *et al.* (1999) definieron el parámetro *D* para la identificación de variedades. *D* puede emplearse para comparar diferentes tipos de marcadores sólo si se conocen las frecuencias de alelos. La extensión de este concepto para datos morfológicos, usando la frecuencia de los estados de cada variable (clases), permitió la selección de un grupo de caracteres morfológicos con alta capacidad de discriminación para identificar los genotipos estudiados.

Para la caracterización de aguacateros, IPGRI (1995) sugirió el uso de un mínimo de descriptores con alta capacidad de discriminación. Sin embargo, este estudio demostró que se obtienen valores distintivos para las diferentes variables analizadas. Es probable que estas diferencias no sólo dependan de las variables seleccionadas, sino también del grupo de individuos muestreados, por tanto, la selección de los caracteres morfológicos para la identificación de accesiones debe determinarse en cada colección de germoplasma. El parámetro *D* adoptado para caracteres morfológicos puede ser útil para este propósito. En este sentido, se necesitaron solamente cuatro variables para distinguir todas las accesiones estudiadas. A pesar de estos resultados, los bajos valores obtenidos del número efectivo de patrones por unidad de ensayo con datos morfológicos y la posible influencia del ambiente en la expresión fenotípica, sugiere el uso de marcadores adicionales para la discriminación y manejo del banco de germoplasma cuando se necesitan caracterizar e identificar numerosos cultivares de forma adecuada.

Las isoenzimas son variantes moleculares de las enzimas que pueden detectarse por electroforesis en gel de almidón o de poliacrilamida. Las proteínas y las isoenzimas se han usado con fines de identificación en muchos cultivos, incluyendo árboles, pero un polimorfismo insuficiente es un problema para muchas especies (Dettori y Palombi, 2000). Los patrones isoenzimáticos desarrollados en este estudio demostraron, sin embargo, una alta capacidad para la discriminación de accesiones, desde que solamente el sistema peroxidasas pudo distinguir todos los genotipos analizados. Estos resultados confirman los obtenidos por González *et al.* (2002) y la utilidad de los análisis isoenzimáticos para la identificación de accesiones de aguacatero.

Por otra parte, algunas proteínas pueden presentar variaciones espaciales y temporales, así como entre experimentos. Se han encontrado diferencias en los patrones de isoenzimas peroxidasas a partir de muestras tomadas de diferentes partes del fruto (Lima *et al.*, 1982) y a partir de hojas cosechadas en la misma accesión en estados adulto y juvenil (Sánchez-Romero *et al.*, 1993).



Por esta razón su uso con fines de identificación está limitado para germoplasmas locales y los patrones isoenzimáticos son intransferibles.

Con el desarrollo de los marcadores de ADN basados en la técnica de PCR, los RADP, AFLP y microsatélites son utilizados con el propósito de identificación de variedades (Tessier *et al.*, 1999; Dettori y Palombi, 2000; Aranzana *et al.*, 2001; Balaj *et al.*, 2003), pero en el presente, los AFLP y los microsatélites son preferidos para la identificación varietal debido a que se discute sobre la reproducibilidad de los marcadores RADP entre diferentes laboratorios (Donini *et al.*, 2000). Además, las secuencias de retrotransposones (ISTR) han mostrado un alto grado de polimorfismo en genotipos estrechamente relacionados de cebada (*Hordeum vulgare* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Rohde, 1996) y plantas ornamentales (Donini *et al.*, 2000).

Los tres marcadores de ADN utilizados en este estudio discriminaron de forma efectiva todos los genotipos, y además, se ha demostrado su reproducibilidad (Janssen *et al.*, 1996; Rohde, 1996; Jones *et al.*, 1997), pero el alto nivel de loci polimórficos detectado en las accesiones de aguacatero con los marcadores dominantes destaca la capacidad discriminatoria de los mismos. Con una simple pareja de cebadores AFLP o ISTR todos los genotipos fueron identificados por un patrón específico de bandas, mientras que los mejores resultados obtenidos con SSR (AM8 y AM15) encierran confusiones en cada uno, incluyendo individuos de diferentes razas ecológicas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ramírez *et al.* (2002), mediante el uso de marcadores ISTR.

Powell *et al.* (1996) definieron la utilidad de un marcador dado por el balance del nivel de polimorfismo y su capacidad de identificar múltiples polimorfismos. Los valores más altos del índice del marcador ( $M_i$ ) de los marcadores dominantes (ISTR y AFLP) dependieron más del número de bandas derivadas de las reacciones con cada pareja de cebadores que de la heterocigosidad alélica encontrada entre accesiones. Sin embargo, se observó el valor más bajo de este índice en SSR a pesar del alto nivel de heterocigosidad determinado con este marcador, resultados que concuerdan con los obtenidos en olivo (Balaj *et al.*, 2003).

El valor tan bajo de  $M_i$  detectado con microsatélites en comparación con isoenzimas y los marcadores dominantes contrasta con la información que ofrecen los primeros. Los SSR son marcadores genéticos versátiles que combinan propiedades útiles de alta variabilidad, herencia codominante y buena reproducibilidad y su codomonancia lo hacen apropiados para determinar la paternidad y la trayectoria del movimiento del polen (Ashworth y Clegg (2003). Este hecho, y que  $M_i$  y  $A_i$  tienen el mismo comportamiento que  $D$  (ISTR > AFLP > isoenzima > SSR), sugiere que el índice del marcador y el índice de eficiencia del ensayo reflejan más sobre la capacidad de discriminación que sobre la informatividad de estos marcadores genéticos.

## 5. Literatura Citada

Aguirre, A; M. Bellon and M. Smale. 2000. A regional analysis of maize biological diversity in Southeastern Guanajuato, Mexico. *Econ. Bot.* 54:60-72.

Aranzana, M. J; J. Ballester; J. Carbó and P. Arús. 2001. Microsatélites: marcadores de alta eficiencia para la identificación varietal en melocotonero. *Fruticultura Profesional.* 118:35-40.

Ashworth V.E.T.M. and M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *J Hered.* 94:404-415.

Belaj, A; Z. Zatovic; G. Cipriani; L. Baldoni; R. Testolin; L. Rallo and I. Trujillo. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. *Theoretical and Applied Genetics,* 107: 736-744.

Chang, T. L; M. T. Lu; C. A. Liu and I. Z. Chen. 2003. Genetic diversity analysis of Taiwan avocado accessions. In: *Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Avocado Congress, Malaga, Spain.* 1, 55-59.

Chávez, J. L. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica. En: Franco, T. L. e Hidalgo, R. Eds. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. *Boletín Técnico No. 8.* (IPGRI), Cali, Colombia, 89 p.

Dettori, M. T. and M. A. Palombi. 2000. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg. by RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 86:279-290.

Donini, P; R. J. Cooke and J. C. Reves. 2000. Molecular markers in variety and seed testing. In: *Plant Genetic Engineering Towards the Third Millennium. Developments in Plant Genetic and Breeding,* 5, pp:27-34.

González, G; V. R. Fuentes; N. N; M. Torres; M. Capote; J. Cañizares; H. Lima and P. Orozco. 1996-97. Colecciones y recursos filogenéticos en la Estación Nacional de Frutales. *Rev. Jardín Botánico Nacional* 12-13:123-134.

González, C; M. I. Román; X. Xiquéz; J. Dueñas; R. Jiménez and N. N. Rodríguez. 2002. Caracterización genética-bioquímica de 20 cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Cuba. *Revista Biología.* 6(1):49-55.

IPGRI, 1995: Descriptors for Avocado (*Persea* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Janssen, P; R. Coopman; G. Huys; J. Swings; M. Blecker; P. Vos; M. Zabeau and K. Kersters. 1996. Evaluation of DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142:1881-1893.

Jones, C. J; K. J. Edwards; S. Castaglione; M. O. Winfield; F. Sala; C. van de Wiel; G. Bredemeijer; B. Vosman; A. Matthes; A. Daly; R. Brettschneider; P. Bettini; M. Buiatti; E. Maestri; A. Malcevschi; N. Marmioli; R. Aert; G. Volckaert; J. Rueda; R. Linacero; A. Vázquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3:381–390.

Lima, H; O. L. Rodríguez and H. Acosta. 1982. Enzymatic polymorphism as genetic markers in avocado. I. Peroxidases. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y otros Frutales.* 5(3):123-132.

Litt, M. and J. A. Luty. 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.

Louette, D; A. Charrier and J. Berthaud. 1997. In situ conservation of maize in Mexico; Genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Econ. Bot.* 51:20-38.

Powell, W; M. Morgante; C. Andre; C. Hanafey, M; J. Vogel; S. Tingey and A. Rafalaski. 1996. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.

Ramírez, I. M; J. L. Fuentes; N. N. Rodríguez; J. Cueto and W. Rohde. 2002. DNA polymorphisms in Cuban varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) analysis. *Cultivos Tropicales*, 23: 85-88.

Ramírez, I. M; N. N. Rodríguez; J. Valdés-Infante; M. Capote; D. Becker and W. Rohde. 2004. Isolation of genomic DNA<sub>s</sub> from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for PCR-based DNA marker application. *Cultivos Tropicales.* 25(1):33-38.

Ramírez I.M., J.L. Fuentes, N.N. Rodríguez, O. Coto, J. Cueto, D. Becker and W. Rhode. 2005. Diversity analysis of Cuban avocado varieties based on agromorphological traits and DNA polymorphisms. *Journal of Genet and Breeding*, Vol. 59, 241-252

Rodríguez, N. N; W. Rohde; C. González; I. M. Ramírez; J. L. Fuentes; M. A. Román; X Xiquéz; D. Becker and B. Velázquez. 2003. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de cultivares de aguacateros (*Persea americana* Mill.) en Cuba. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Avocado Congress, Malaga, Spain, 1:47-53.

Rohde, W.; Kullaya, A.; Rodríguez, J. and Ritter, E., 1995. Genetic analysis of *Coco nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of copialike *EcoRI* repetitive elements. *J. Genet. & Breed.*, 49:179-186.

Rohde, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis: a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *J. Genet & Breed*, 50: 249-261.

Sánchez-Romero, C., M.L. García-Gómez, F. Pliego-Alfaro, and A. Heredia. 1993. Peroxidase activities and isoenzyme profiles associated with development of avocado (*Persea americana* Mill.) leaves at different ontogenetic stages. *J. Plant Growth Regul.* 12: 95-100.

Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163:688.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.

Tessier, C; David, J; This, P; Boursiquot, J. M. and Charrier, A. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetic*, 98: 171-177.

Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker, M. Reijans; T. van der Lee; M. Hornes; A. Frijters; J. Pot; J. Peleman; M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

Weber, J. K. and P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396

Tabla 1. Clave realizada con cuatro variables reproductivas para la identificación de las accesiones de aguacatero (*Persea americana* Mill.).

Variables				
Forma del fruto	Color de la corteza del fruto <sup>1</sup>	Época de cosecha	Grosor de la corteza	Accesiones
Oblata				California
Esferoide				Suardía Estación
Claviforme	Verde			Casimiro
				Soledad
	Amarillo-verdoso			José Antonio
Obovado	Verde			Jaruco No. 1
	Amarillo-verdoso			Catalina
	Negro			Hass
Piriforme	Verde			Itzamná
	Amarillo-verdoso			Sicilia No. 6
Obovado angosto	Púrpura			Los Moros
	Verde	Temprana (Mar-May)		Duke 7
		Tardía (Sep-Nov)		Lula La Pepilla
		Muy tardía (Dic-Feb)		Centro América No. 3
Esferoide alto	Amarillo-verdoso	Media (Jun-Ago)		Amado Gómez No. 1
		Tardía (Sep-Nov)		Monroe Estación
	Verde	Tardía (Sep-Nov)	Media	CH 1 No. 3
			Gruesa	Choquette

<sup>1</sup> En frutos maduros

Tabla 1. Comparación del polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad de marcadores moleculares y caracteres morfológicos en accesiones de aguacatero (*Persea americana* Mill.).

Índices y sus abreviaciones		Isoenzimas	SSR	AFLP	ISTR	Caracteres morfológicos
Número de unidades de ensayo	$U$	3	15	10	1	14
Número de bandas polimórficas (o estados)	$n_p$	24	124	132	157	47
Número de bandas no polimórficas (o estados)	$n_{np}$	1	0	275	0	0
Número total de bandas (o estados)	$n$	25	124	407	157	47
Número promedio de bandas polimórficas (o estados) por unidad de ensayo	$n_p/U$	8	8,27	13,20	157	3,36
Número de loci	$L$	13	15	407	157	Desconocido
Número promedio de loci por unidad de ensayo	$n_u$	4,03	1	40,7	157	Desconocido
Número de patrones de bandas (o estados)	$T_p$	40	168	144	17	51
Número de patrones únicos de bandas (o estados)	$T_{up}$	33	116	132	17	15
Número promedio de patrones de bandas (o estados) por unidad de ensayo	$I$	13,30	11,20	14,40	17,00	3,64
Número promedio de patrones de bandas únicos (o estados) por unidad de ensayo	$I_u$	11,00	7,73	13,20	17,00	1,07
Probabilidad de confusión media	$C_j$	0,05	0,07	0,04	0,00	0,47
Poder de discriminación medio	$D_j$	0,95	0,93	0,96	1,00	0,52
Límite del poder de discriminación medio	$D_L$	0,89	0,87	0,91	0,94	0,49
Número efectivo de patrones por unidad de ensayo	$P$	9,32	7,75	10,78	17,00	1,96
Número promedio de alelos por locus	$n_{av}$	1,93	8,27	2,00	2,00	-
Heterocigosidad esperada del loci polimórfico <sup>1</sup> /Índice de diversidad morfológica <sup>2</sup> /índice de diversidad de Simpson <sup>3</sup>	$H_{ep} \cdot D_M / D_S$	0,41 <sup>1</sup>	0,81 <sup>1</sup>	0,31 <sup>1</sup>	0,29 <sup>1</sup>	0,29 <sup>2</sup> /0,52 <sup>3</sup>
Fracción del loci polimórfico	$\beta/\beta_M$	0,96	1,00	0,32	1,00	-
Heterocigosidad esperada	$H_e$	0,39	0,81	0,10	0,29	-
Número efectivo de alelos por locus	$n_e$	1,82	4,65	1,42	1,39	-
Índice de eficiencia del ensayo	$A_i$	7,35	5,05	19,55	224,65	-
Radio múltiple efectivo	$E/E_M$	4,15	1,00	13,20	157,00	-
Índice del marcador	$MI/MI_M$	1,73	0,81	4,04	45,13	-