

■ Caracterización molecular y análisis filogenético de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Lauraceae)

A. Gutiérrez-Díez¹, A.F. Barrientos-Priego², E. Campos-Rojas²

¹. Universidad Autónoma de Nuevo León. General Escobedo. Nuevo León. México.

². Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco. Estado de México. México.

RESUMEN

El género *Persea* (Lauraceae) tiene cerca de 90 especies, la delimitación dentro del mismo siempre ha sido controversial. Estudios han confirmado que el grupo *Persea* es monofilético; sin embargo el reconocimiento de dos clados a través del análisis filogenético de características morfológicas, sugiere que el género no es un grupo monofilético y que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* pueden ser reconocidos como géneros independientes. El análisis de regiones ITS indicó que el origen del subgénero *Persea* no es monofilético, los resultados agruparon las especies analizadas en clados diferentes correspondientes a los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, apoyando la hipótesis del origen no monofilético del género. Con el fin de ayudar a resolver las controversias del origen no monofilético del género *Persea*, se analizaron 107 genotipos de *Persea* con 15 SSR. Trece de los quince SSR probados amplificaron alelos dentro de los intervalos de tamaño indicados en estudios previos, sin embargo en dos de los genotipos estudiados no se produjeron fragmentos de amplificación. Se analizaron un total de 206 alelos, los parámetros de variabilidad genética demostraron que los SSR presentan un alto nivel de polimorfismo y son altamente informativos (heterocigosidad esperada mayor a 0.5). El índice de fijación de Wright indicó deficiencia de alelos heterocigotos. El análisis de agrupamiento UPGMA mostró un valor de 0.937 de correlación cofenética, sin embargo no se definió un patrón de agrupamiento de los genotipos con base a su origen racial o subgénero (*Persea* y *Eriodaphne*). Se recomienda incrementar el número de SSR para estudios de caracterización de diversidad genética considerando las razas y especies.

Palabras clave: SSR, Heterocigosidad esperada, Heterocigosidad observada, Polimorfismo.

INTRODUCCIÓN

El género *Persea* (Lauraceae) fue descrito por Miller en 1754 (van der Werff, 2002); consiste de aproximadamente 85 especies distribuidas en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Chile, con una especie en Islas Canarias y probablemente algunos representantes en el sur de Asia (Barrientos-Priego & López-López, 2002; Ferrer-Pereira, 2012). Las especies americanas fueron revisadas por Kopp en 1966, reconociendo dos subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Campos-Rojas *et al.*, 2007). El subgénero *Persea* se reconoce por tener tépalos iguales a subiguales, reflexos en la antes y caducos durante la fructificación, glándulas estipitadas en la base del tercer verticilo estaminal y pistilo pubescente; este subgénero incluye la especie *Persea americana* Mill. y otras especies centroamericanas (Campos-Rojas *et al.*, 2007; Ferrer-Pereira, 2012). El subgénero *Eriodaphne* se caracteriza por tener tépalos fuertemente desiguales y persistentes en la fructificación, tépalos externos glabros en la cara adaxial, glándulas sésiles en la base de los filamentos del tercer verticilo y ovario glabro o pubescente; comprende más de 70 especies neotropicales (Campos-Rojas *et al.*, 2007; Ferrer-Pereira, 2012). En lo que se refiere a los frutos, *Persea* se caracteriza por tener frutos grandes con un intervalo de tamaño entre 7 y 20 cm, sus frutos son conocidos como aguacates verdaderos; *Eriodaphne* se caracteriza por tener frutos pequeños con capuchón, su tamaño es menor a 2 cm y se conocen como aguacatillos.

Dentro del subgénero *Persea*, la mayoría de sus miembros reconocidos crecen desde la parte central de México y Guatemala hasta Centroamérica, lo que sustenta la teoría del género *Persea* y probablemente de todo el subgénero *Persea* (Campos-Rojas *et al.*, 2007). *Persea americana* Mill., es la especie de mayor importancia económica, se utiliza principalmente en la alimentación siendo una fuente rica de aceites, proteínas y minerales que permiten su utilización en la industria farmacéutica y cosmética. La importancia del subgénero *Eriodaphne* es que algunas de sus especies son inmunes a la pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands., sin embargo sus genes no son compatibles con los de *P. americana* Mill. (Campos-Rojas *et al.*, 2007; Litz, 2001; Zentmyer & Schieber, 1992), por lo que los intentos de hidridación o injertación de *P. americana* Mill. sobre especies de *Eriodaphne* han fracasado (Sánchez-Pérez, 1999). Genes candidatos de resistencia a *P. cinnamomi* podrían ser aislados y clonados de especies del subgénero *Eriodaphne* (Litz *et al.*, 2009).

La delimitación dentro del género *Persea* siempre ha sido controversial (Rohwer *et al.*, 2009), el hallazgo de la compatibilidad entre algunas especies del subgénero *Persea* y lo antes mencionado han generado la controversia con respecto al origen monofilético del género sugiriendo que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, pueden ser reconocidos como géneros independientes. El análisis filogenético a través de caracteres morfológicos sugiere que el género *Persea* no es un grupo monofilético al reconocer dos clados, este análisis debe ser complementado por un análisis de caracteres moleculares, por ejemplo ITS (Campos-Rojas *et al.*, 2007). El estudio de regiones ITS realizado por Rohwer *et al.* (2009), indicó que el origen del género *Persea* no es monofilético. Los resultados de sus estudios agruparon las especies analizadas en clados diferentes correspondientes a los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, apoyando la hipótesis del origen no monofilético del género y proporcionando una explicación a la incompatibilidad entre ambos subgéneros.

En los estudios moleculares relacionados con el origen del género *Persea* deben analizarse un número mayor de fragmentos de ADN así como de especies que representen a ambos subgéneros. Las secuencias flanqueadoras de los microsatélites o SSR (simple sequence repeat) son generalmente conservadas dentro de los individuos de la misma especie y permiten la selección de iniciadores que los amplifican. Los polimorfismos de los loci, resultan de la variación en el número de repeticiones tándem entre los individuos. De manera similar que en otras especies, en aguacate se encuentran SSR en forma abundante y polimórfica a pesar de ser locus simple. La frecuencia de repeticiones AG/TC es más alta que la encontrada

en otras especies, tienen herencia mendeliana aunque en algunas ocasiones han demostrado tener comportamiento complejo (Lavi *et al.*, 1994); por sus características los SSR se han utilizado en mapeo genético, genotipificación y agrupamiento genético de accesiones dentro de razas (Lavi *et al.*, 1994; Mahmeed *et al.*, 1996; Sharon *et al.*, 1997; Schnell *et al.*, 2003; Alcaraz & Hormaza, 2007; Acheampong *et al.*, 2008; Abraham & Takrama, 2014). En su estudio de caracterización molecular y diversidad genética en aguacate, Alcaraz & Hormaza (2007) trabajaron con 16 SSR desarrollados por Sharon *et al.* (1997) y Ashworth *et al.* (2004), los genotipos estudiados se agruparon en 3 clados diferenciados por su origen racial sin embargo los valores de remuestreo (bootstrap) fueron bajos; los SSR utilizados fueron altamente informativos y mostraron una heterocigosidad más alta que 0.5 y una probabilidad de identificación debajo de 0.36, por lo que pueden utilizarse en colecciones de germoplasma para su caracterización y manejo.

La utilización de marcadores moleculares de cloroplastos para estudios de filogenia en plantas se basa en el principio de que los genes de cloroplastos tienen intervalos relativamente bajos de evolución, sus secuencias contienen regiones altamente variables que son la primera consideración cuando se buscan loci disponibles para resolver especies estrechamente relacionadas o géneros en análisis filogenético y códigos de ADN; las regiones codificantes, intrones y espaciadores se han utilizado para reconstrucciones filogenéticas a varios niveles taxonómicos (Dong *et al.*, 2012). Con el fin de enriquecer los resultados obtenidos con los SSR se están generando regiones espaciadoras para el análisis de los genotipos. El objetivo de este estudio fue analizar 107 genotipos de *Persea* del Banco de Germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. y Universidad Autónoma Chapingo con 16 SSR con el fin de ayudar a dilucidar la teoría del origen no monofilético del género *Persea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El listado de genotipos analizados se encuentra en la Tabla 1. Para la extracción de ADN se colectaron hojas jóvenes y sanas. La extracción se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Hormaza (2002), la cuantificación de las muestras se realizó por espectrofotometría y la calidad se verificó en geles de agarosa al 0.8%. Para la generación de los SSR se mandaron sintetizar los iniciadores correspondientes a los 16 microsátélites reportados por Alcaraz & Hormaza (2007) de acuerdo con la información de Sharon *et al.* (1997) y Ashworth *et al.* (2004). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 15 μ l, la mezcla de reacción consistió de Buffer Taq 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.4 mM, iniciador "forward" y "reverse" 0.4 μ M de cada uno, Taq DNA polimerasa 0.5 U y ADN 25 ng. El programa térmico consistió de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de alineación de acuerdo a cada SSR por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, se dieron un ciclo inicial de 94°C por 60 segundos y uno final de 72°C por 5 minutos. Las temperaturas de alineación utilizadas fueron las indicadas por Sharon *et al.* (1997) y Ashworth *et al.* (2004). El análisis de los productos de amplificación se realizó con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®). Para cada locus (SSR) se calculó el porcentaje de loci polimórficos, número de alelos, número de alelos efectivos, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada y frecuencias alélicas relativas, estas determinaciones se realizaron por medio del programa InfoGen 2013 (Balzarini & Di Renzio, 2013) y fueron corroboradas a través del programa POGENE 1.31; este mismo programa se utilizó para la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg y el índice de fijación de Wright. Se obtuvieron estimadores puntuales por Bootstrap con 2000 repeticiones para los parámetros de variabilidad genética.

Tabla 1. Identificación de los genotipos analizados con SSR, 101 del subgénero *Persea* y 6 del subgénero *Eriodaphne* (subrayados)

Id. Genotipo	Raza o especie	Id. Genotipo	Raza o especie
1 <i>P. floccosa</i>	<i>Persea floccosa</i>	59 Aquila S1	Mexicana
2 Freddy 4	Posible raza antillana	60 Motozintla Chis 15	Guatemalteca
3 <i>P. chamissonis</i>	<i>Persea chamissonis</i>	61 ComCar 1	Guatemalteca
5 Las Nubes 6	Costaricensis	62 Baltazar	Mexicana
6 <i>P. steyermarkii</i>	<i>Persea steyermarkii</i>	63 Aspiroz	Mexicana
8 Tochimilco 1S2	Mexicana	64 La Mesita	Mexicana
9 Tetiz 1	Antillana	65 Negrito	Mexicana
10 Ixtapan del Oro	Mexicana	66 Veloz 3	Mexicana
12 <i>Persea meyeniana</i>	<i>Persea meyeniana</i>	67 Zar 1	Mexicana
14 <i>P. parvifolia</i>	<i>Persea parvifolia</i>	68 Yucatan 1	Antillana
15 Hass	Guatemalteca x Mexicana	69 Yucatan 10	Antillana
17 Nocham 3	Guatemalteca	71 Quintana Roo 1	Antillana
18 Hunucmá 1	Antillana	72 Quintana Roo 16	Antillana
20 Chinini de Altura	<i>Persea shiedeana</i>	73 Quintana Roo 86	Antillana
22 Derrumbe	Mexicana	74 Quintana Roo 83	Antillana
23 <i>P. cinerascens</i>	<i>Persea cinerascens</i>	75 Ecatlan 1	Mexicana
24 Tepetl	Mexicana	76 Lechero	Mexicana
25 Marichal 1	Antillana	77 Libres 1	Mexicana

Id. Genotipo	Raza o especie	Id. Genotipo	Raza o especie
26 Palestre	Guatemalteca	78 Libres 5	Mexicana
27 Tantima 3	<i>Persea longipes</i>	79 Libres 10	Mexicano
28 <i>Persea</i>	<i>Persea</i> sp.	80 Texacapan 2	Mexicana
29 Antigua	Antillana	81 Pital 4	Antillana
30 <i>Persea hintonii</i>	<i>Persea hintonii</i>	82 Luna 2	Mexicana
31 Yaruche 4	<i>Persea schiedeana</i>	83 Oloroso Palma Rafael	Mexicana
32 Martín Grande	<i>P. schiedeana</i> x <i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	84 Guamuchil	Antillana
34 Olanca	Guatemalteca	85 Guatemalteco Tenajapa	Guatemalteco
35 San Cristobal	Guatemalteca	86 <i>P. donell-smithii</i>	<i>P. donell-smithii</i>
36 Lino Ixtapan	<i>Persea schiedeana</i>	87 Tlacolula	Mexicana
37 Aguacate de Montaña	Desconocida	88 Gro-10	Híbrido o guatemalteca
39 Rodeo 2	<i>Persea nubigena</i>	89 AG4	Híbrido o guatemalteca
41 <i>P. tolimanensis</i>	<i>Persea tolimanensis</i>	90 Chiapas 16	Antillana
42 <i>P. cinerascens</i>	<i>Persea cinerascens</i>	91 Criollo 11 Nay	Antillana
43 Aceitoso Villa Guerrero	Mexicana	92 Criollo 24 Nay	Antillana
44 Guerrero 6	Híbrido o guatemalteca	93 Criollo 3 Nay	Antillana
45 Chiapas 13	Antillana	94 Especial Doble Cosecha	Antillana
46 Oaxaca 1	Mexicana	95 S-Aguila	Mexicana
47 Oaxaca 32	Mexicana	96 Tenejapa Mex	Mexicana
48 Oaxaca 14	Mexicana	97 Zongo 8	Mexicana
49 Belem	Mexicana	98 Velvick	<i>Persea americana</i>
50 Tototla 1	Mexicana	99 ASM	Mexicana
51 Triste	Mexicana	100 Antigua 12	Antillano
52 Mixtla 108	Mexicana	101 Antigua 2	Antillano
53 Juanita M39	Mexicana	102 Payasito	<i>Persea steyermarkii</i>
54 Tototla 4	Mexicana	103 Nayarit 8	Antillano
55 Puebla 1	Mexicana	104 Plátano Temprano	Mexicana
56 Puebla 2	Mexicana	105 Campeón	Mexicana
57 Puebla 3	Mexicana	106 Plátano Delgado	Mexicana
58 Aquila 3	Mexicana	107 María Elena	Mexicana
108 Huevo de Paloma	Mexicana	114 Salvador	Mexicana
109 Leonor	Mexicana	115 Pagua	Mexicana
110 Hule	Mexicana	116 Silvestre	Mexicana
111 Amarillo	Mexicana	117 <i>P. steyermarkii</i>	<i>Persea steyermarkii</i>
112 Mantequilla	Mexicana	118 Rio Negro	Mexicana
113 Cuerno	Mexicana		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se encuentra la identificación de los SSR analizados así como su referencia bibliográfica, a la fecha se han analizado 15 de los 16 SSR seleccionados. El SSR AVD013 no amplificó fragmentos mientras que AVD018 amplificó fragmentos de 65 pb en 14 genotipos y fragmentos de 229, 242 y 261 pb en un genotipo; el intervalo de amplificación de acuerdo con Ashworth *et al.* (2004) y Alcaraz & Hormaza (2007) para AVD018 debe ser de 189-235 pb, por lo que estos SSR no se consideraron para el análisis de diversidad. Para la estimación y selección del tamaño de alelos se consideró el intervalo publicado por Alcaraz & Hormaza (2007), alelos fuera de este intervalo no se consideraron para el estudio. Se produjeron 219 fragmentos amplificados considerando el total de alelos en toda la población, todos los SSR amplificaron más de dos fragmentos con algunos de los genotipos. Considerando a los microsatélites como locus simple (uno o dos fragmentos amplificados por genotipo) se produjeron 209 alelos. La descripción del tamaño en pb (pares de bases) y los parámetros de variabilidad genética (número de alelos, porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada, número de alelos efectivos, índice de fijación de Wright y significancia de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg), se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Identificación y referencia de los SSR, número de alelos (A), loci polimórficos (%), heterocigosidad esperada y observada (He, Ho), índice de fijación de Wright (F), número de alelos efectivos (Ne), significancia del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).

Locus y referencia	A	Tamaño (pb)	Loci polimórficos (%)	He	Ho	F	Ne	HWE
AVMIX03 (Sharon <i>et al.</i> , 1997)	19	145-190	93.1	0.94	0.77	0.17	14.52	**
AVMIX04 (Sharon <i>et al.</i> , 1997)	15	160-196	91.5	0.92	0.71	0.22	11.70	**
AVAG21 (Sharon <i>et al.</i> , 1997)	18	172-225	91.3	0.93	0.67	0.27	11.52	**
AVAG22 (Sharon <i>et al.</i> , 1997)	18	102-140	90.7	0.91	0.81	0.10	10.77	**
AVA12 (Sharon <i>et al.</i> , 1997)	10	122-144	85.5	0.86	0.64	0.25	6.91	**
AVT226 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	17	271-334	86.5	0.87	0.30	0.65	7.39	**
AVT372 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	10	163-185	81.9	0.82	0.57	0.31	5.53	**
AVT386 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	12	215-247	82.2	0.83	0.32	0.62	5.62	**
AVO102 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	22	152-204	92.6	0.93	0.81	0.12	13.52	**
AVD001 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	21	208-265	92.6	0.93	0.88	0.05	13.53	**
AVD003 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	15	183-219	90.3	0.91	0.86	0.04	10.27	**
AVD006 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	17	300-360	91.2	0.92	0.69	0.21	11.36	**
AVD017 (Ashworth <i>et al.</i> , 2004)	15	173-233	81.4	0.82	0.19	0.79	5.38	**
Promedio	16.07		88.5	0.89	0.63	0.29	9.85	

El número de alelos por locus fue de 10 (AVA12 y AVT372) a 22 (AVO102) con un promedio de 16.07, este valor es superior a 11.5, 9.75 y 10.4, valores indicados por Abraham & Takrana (2014), Alcaraz & Hormaza (2004), y Ashworth & Clegg (2003) quienes analizaron 71, 75 y 37 genotipos con 10, 16 y 25 SSR, respectivamente. El valor obtenido fue aproximado al valor de 18.8 indicado por Schnell *et al.* (2003) en su análisis de 224 genotipos con 14 SSR, estos valores superiores al igual a los que se obtuvieron en este estudio, son debido probablemente al número alto de genotipos analizados y a la diversidad de los genotipos estudiados (Alcaraz & Hormaza, 2007). AVD017 presentó el número más bajo de alelos efectivos mientras que el número más alto correspondió a AVMIX03 con 14.52, el valor promedio fue de 9.85, valor superior al 4.55 reportado por Alcaraz & Hormaza (2007).

El intervalo del tamaño de alelos para cada SSR fue igual o cercano a los publicados por Sharon *et al.* (1997), Ashworth & Clegg (2003), Schnell *et al.* (2003), Ashworth *et al.* (2004), Alcaraz & Hormaza (2007) y Abraham & Takrana (2014). El porcentaje de loci polimórficos más bajo lo presentó AVD017 con 81.4% mientras que el porcentaje más alto lo presentó AVMIX03 con 93.1%. Los porcentajes de loci polimórficos obtenidos para AVMIX04 (91.5%) y AVAG21 (91.3%) son cercanos a los reportados por Abraham & Takrana (2014) de 88.4% y 89.07%, respectivamente. El porcentaje de loci polimórficos promedio fue de 88.5%, Schnell *et al.* (2003) reportaron un porcentaje de 83%. El intervalo de frecuencia de alelos fue de 0.005 a 0.34. El nivel de polimorfismo obtenido con los SSR seleccionados fue alto ya que todos los locus tuvieron más de 10 alelos amplificados con los genotipos estudiados, los 13 SSR tuvieron una heterocigosidad esperada mayor de 0.5 por lo que se consideran altamente informativos (Alcaraz & Hormaza, 2007; Abraham & Takrana, 2014).

El intervalo de heterocigosidad observada fue de 0.19 (AVD017) a 0.88 (AVD001), la media fue de 0.63 coincidiendo con lo reportado por Alcaraz & Hormaza (2007). El rango de heterocigosidad esperada fue de 0.82 (AVT372, AVD017) a 0.94 (AVMIX03) con una media de 0.89, todos los valores fueron superiores a 0.7 por lo que los SSR utilizados son marcadores altamente polimórficos (Ott, 1992). Los índices de fijación de Wright fueron positivos para todos los SSR, el valor más alto lo presentó AVD017 con 0.79 que presentó el valor más bajo de heterocigosidad observada (0.19), el índice más bajo correspondió a AVD001 con 0.04, el índice de fijación promedio fue de 0.29; la comparación entre heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada a través del índice de fijación de Wright indicó un efecto moderado de apareamiento no aleatorio de los genotipos estudiados (deficiencia de alelos heterocigotos). Resultados parecidos fueron indicados por Borrone *et al.* (2007) y Alcaraz & Hormaza (2007). En este estudio los genotipos analizados corresponden a muestras foliares de ejemplares injertados (muestras clonales) con varetas colectadas en diferentes partes de México y Sudamérica por lo que la deficiencia de alelos heterocigotos debido a la endogamia, no aplica para los genotipos aquí evaluados.

La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg fue significativa para los SSR ($P < 0.01$), sin embargo debido a la naturaleza de los genotipos que son colecta de varias zonas del México en su mayoría, estos resultados no son los esperados. La frecuencia relativa más baja de alelos se presentó en AVMIX04 (160 pb), AVAG22 (104 pb), AVT226 (303 y 334 pb), AVT386 215 pb), AVO102 (181, 183 y 190 pb) y AVD006 (300 pb), la frecuencia relativa más alta fue de 0.333 para el alelo de 175 pb de AVD017. El número de genotipos amplificados por cada SSR fue de 92 para AVMIX03 y AVMIX04, 33 para AVAG21, 96 para AVAG22, 91 para AVA12 y AVD006, 99 para AVT226, 86 para AVT372, 97 para AVT386, 102 para AVO102, 88 para AVD001, 94 para AVD003 y 78 para AVD017. Los SSR utilizados no produjeron fragmentos amplificados con los genotipos 44 Guerrero 6 (híbrido o raza guatemalteca) y 60 Motozintla Chis 15 (raza guatemalteca).

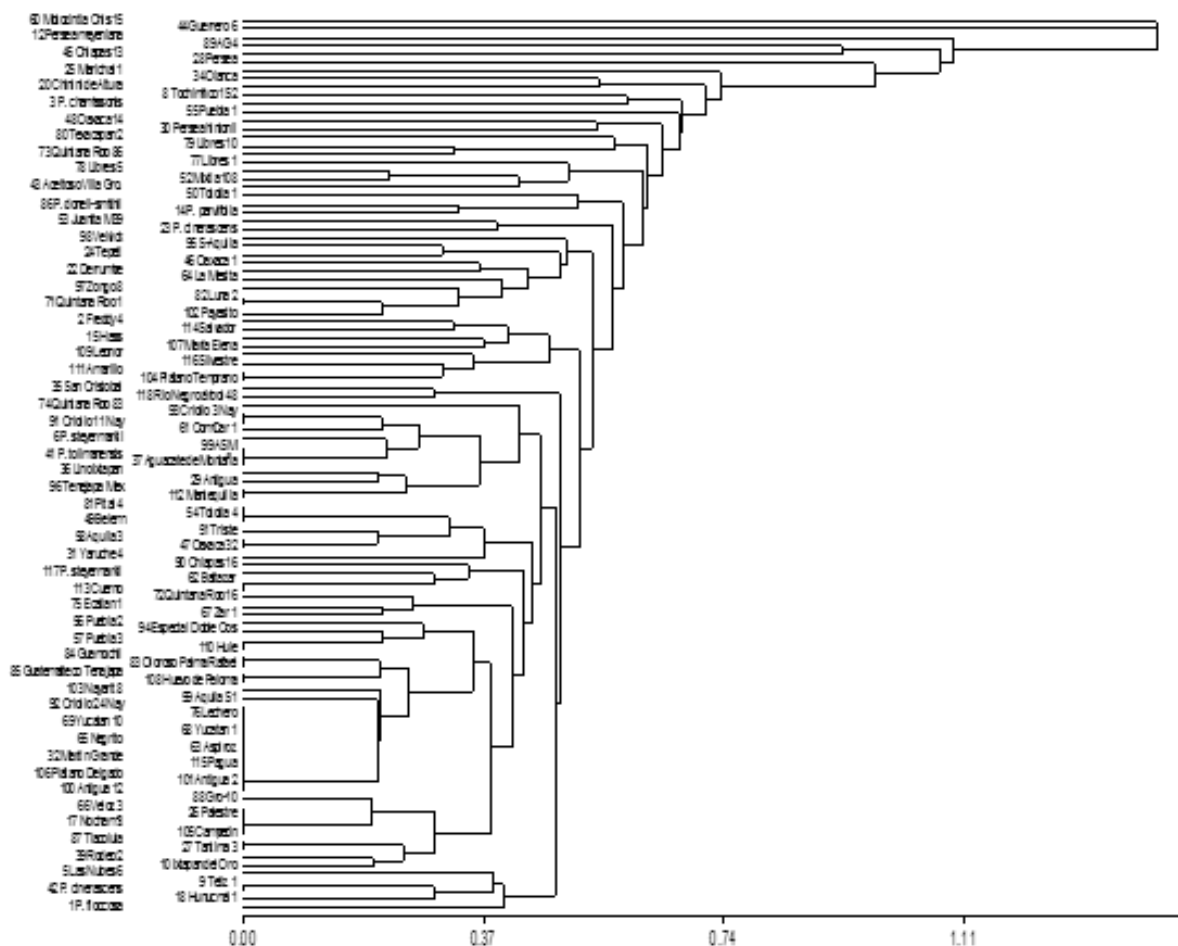
En la Figura 1 se encuentra el dendrograma generado por el método UPGMA con el índice de similaridad de Nei y Li y correlación cofenética de 0.937, lo que significa que las distancias del dendrograma reflejan la distancia entre los genotipos analizados. Los genotipos más distantes fueron 60 Motozintla Chis 15 y 44 Guerrero 6, lo cual era de esperarse ya que no presentaron fragmentos amplificados. A una distancia de 0.55 se definen 7 agrupamientos, sin embargo no se define separación entre razas. Los grupos 1 y 3 quedaron conformados por genotipos en su mayoría de la raza mexicana, el grupo 2 quedó conformado por genotipos de la raza mexicana del estado de Nuevo León, 2 Freddy 4 (posible Antillano) y el genotipo 15 Hass. De los 6 genotipos del subgénero *Eriodaphne*, sólo 23 *P. cinerascens* y 86 *P. donell-smithii* se agruparon en clados diferentes con 53 Juanita M39 (raza mexicana) (grupo 4) y *Persea parvifolia* (grupo 5), respectivamente. En el primer caso el origen de ambos genotipos es el estado de Michoacán (México), en el segundo caso el origen de los genotipos son los estados de Chiapas y Veracruz (México). El grupo 6 quedó conformado por 43 Aceitoso Villa Guerrero, 52 Mixtla 108, 77 Libres 1 y 78 Libres 8; en el grupo 7 se integraron los genotipos 73 Quintana Roo 86 y 79 Libres 10. Catorce de los genotipos no quedaron agrupados. Al igual que en este estudio Alcaraz & Hormaza (2007) utilizando los mismos SSR, no pudieron diferenciar de manera contundente los genotipos (cultivares) con base a su origen racial y en nuestro caso además no fue posible agrupar o separar a los genotipos de *Eriodaphne*.

No se descartan errores durante la generación de los alelos, sin embargo las amplificaciones se realizaron por triplicado con genotipos seleccionados al azar con todos los SSR. El análisis de los fragmentos a través de un sistema automatizado mostró diferencias de 2-4 pb entre bandas del mismo tamaño aún y cuando los genotipos se analizaron en la misma corrida, fue necesario corroborar de manera manual los pesos de los fragmentos en las imágenes obtenidas,

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Para fines de caracterización de diversidad genética de *Persea* considerando las razas y especies, es necesario incrementar el número de SSR a utilizar. El uso de los 16 SSR propuestos por Alcaraz & Hormaza (2007) no definió la agrupación de los genotipos estudiados en clados de acuerdo a su raza y subgénero, los resultados obtenidos no respaldan la teoría de especiación del subgénero *Persea*. De acuerdo con Ashworth *et al.* (2004) la utilización de un solo cultivar como fuente de ADN genómico para el desarrollo de genotecas de SSR, reduce el margen para generar una gran cantidad de SSR (si se considera la amplia diversidad genética presente en el aguacate), por lo que la utilización de mayor cantidad de ellos para estos fines se justifica. Es necesario asumir con cuidado la asignación de las razas y origen geográfico de los genotipos de *Persea* dado que las descripciones no son claras, estudios de Ashworth & Clegg (2003) no han sugerido que se pueda asumir una diferenciación botánica como tal. La utilización de caracteres morfológicos combinados con marcadores moleculares ha favorecido la agrupación de materiales de aguacate en base a su raza (Fiedler *et al.*, 1998; Mhameed *et al.*, 1997) por lo que su integración en futuros estudios ayudaría a la clasificación de los materiales de *Persea* con base a su raza y subgénero.

Es necesario reforzar los esfuerzos para la publicación de datos generados por SSR en *Persea*, algunos de los resultados obtenidos en este estudio son parecidos a los publicados por Abraham & Takrama (2014). Las diferencias mostradas con los resultados de Alcaraz & Hormaza (2007) se debe entre otras cosas a la estructura de la población y al número de genotipos analizados. El hecho de que dos de los SSR no hayan amplificado con los genotipos estudiados y de que en dos genotipos no hubo amplificación con los SSR, refuerza la necesidad de probar mayor cantidad de SSR. Debido a la diferencia de pb en bandas del mismo peso molecular del sistema automatizado de análisis de los fragmentos amplificados se recomienda estandarizar una técnica o procedimiento para la separación y análisis de los productos de amplificación. Actualmente se está trabajando con el análisis de los alelos del último SSR (AVD022) y la generación de regiones espaciadoras para la determinación de las relaciones filogenéticas (Dong *et al.*, 2012) entre los 107 genotipos y determinar si *Persea* y *Eriodaphne* son subgéneros de *Persea* o géneros separados.



LITERATURA CITADA

- Abraham, J.D. & Takrama, J.F. 2014. Genetic characterisation of avocado (*Persea americana* Mill.) in two regions of Ghana. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 13, no. 51, pp.4620-4627.
- Alcaraz, M.L. & Hormaza, J.I. 2007. Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*. No. 144, pp. 244-253.
- Acheampong, A.K., Aromah, R., Ofori, F.A., Takrama, J.F., Saada, D., Bitton, I. & Lavi, U. 2008. Genetic characterization of Ghanaian avocados using microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 131, no. 6, pp. 801-809.
- Ashworth, V.E.T.M. & Clegg, M.T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity*. Vol. 94, no. 5, pp. 407-415.
- Ashworth, V.E.T.M., Kobayashi, M.C., De La Cruz, M. & Clegg, M.T. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae*. No. 101, pp. 255-267.
- Balzarini, M.G. & Di Rienzo, J.A. 2013. InfoGen versión 2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Barrientos-Priego, A.F. & López-López, L. 2002. Historia y genética del aguacate. In: Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. pp. 100-121.
- Borrone, J.W., Schnell, R.J., Violi, H.A. & Ploetz, R.C. 2007. Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes*. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.011611.x
- Campos-Rojas, E., Terrazas, T. & López-Mata, L. 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution*. No. 54, pp. 249-258.
- Dong, W., Ling, J., Yu, J., Wang, L. & Zhou, Sh. 2012. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS ONE*. 7(4): e35071. Doi:10.1371/journal.pone.0035071.
- Ferrer-Pereira, H. 2012. Aportes del conocimiento del género *Persea* (Lauraceae) en Venezuela. *Hoehnea*. Vol. 39, no. 3, pp. 435-478.

- Fiedler, J., Bufler, G. & Bangerth, F. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica* no. 101, pp. 249-255.
- Hormaza, J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequences repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. No. 104, pp. 321-328.
- Lavi, U., Akkava M., Bhagwat A., Lahav E. & Cregan P.B. 1994. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* M.). *Euphytica*. No. 80, pp. 171-177.
- Litz, R. 2001. Fusión de protoplastos en aguacate. In: *Memorias Primer Congreso Mexicano-Latinoamericano de Aguacate*. Uruapan. Michoacán. México. pp. 145-150.
- Litz, R.E., Perea-Arango, I. & Suárez-Padrón, I. 2009. Mejoramiento de aguacate en el siglo XXI. In: *Memorias III Congreso Latinoamericano del Aguacate*. Medellín, Colombia. pp. 2-13.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. & Lavi, U. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics*. No. 94, pp. 279-286.
- Ott, J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *The American Journal of Human Genetics*. No. 51, pp. 283-290.
- Rohwer, J.G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S.A., van der Werff, H. & Li, H-W. 2009. Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *Taxon*. No. 58, pp. 1153-1167
- Sánchez-Pérez, J.L. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. No. 5, pp. 7-18.
- Sharon, D., Cregan, P.B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav, E. & Lavi, U. 1997. An integrated genetic linkage map of avocado. *Theoretical and Applied Genetics*. No. 95, pp. 911-921.
- Schnell, R.J., Brown, J.S., Olano, C.T., Power, E.J. & Krol, C.A. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 128, no. 6, pp. 881-889.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon*. No. 12, pp. 575-586.
- Zentmyer, G.A. & Schieber, E. 1992. *Persea* and *Phytophthora* in Latin America. *Proceedings of the Second World Avocado Congress*. pp. 61-66.



ACTAS • PROCEEDINGS

VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

www.wacperu2015.com

