



**Análisis de la diversidad genética de la colección de aguacate (*Persea americana* Mill.)
del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP.**

Albuja Yepez, Eskarle Monserratte

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Segovia Salcedo, María Claudia PhD

Sangolquí, 26 de enero de 2022



Documento de copleaks.docx

Scanned on: 22:10 January 27, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	41
Words with Minor Changes	5
Paraphrased Words	53
Ommited Words	0



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Análisis de la diversidad genética de la colección de aguacate (*Persea americana* Mill.) del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP**” fue realizado por la señorita **Albuja Yopez Eskarle Monserratte** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

 Firmado electrónicamente por:
**MARÍA CLAUDIA
SEGOVIA
SALCEDO**

Segovia Salcedo, María Claudia, PhD.

C. C.:1709055998



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Albuja Yepez Eskarle Monserratte**, con C.C. 1722248893, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Análisis de la diversidad genética de la colección de aguacate (*Persea americana* Mill.) del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

Albuja Yepez Eskarle Monserratte

C.C.: 1722248893



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Albuja Yepéz Eskarle Monserratte**, con C.C. 1722248893, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Análisis de la diversidad genética de la colección de aguacate (*Persea americana* Mill.) del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Monserratte', is written over a horizontal dotted line.

Albuja Yepéz Eskarle Monserratte

C.C.: 1722248893

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todas las personas que nunca perdieron la fe en mí. Que, con su apoyo constante y motivación desde un inicio hasta el final de esta etapa de mi vida, han estado a mi lado.

En especial a mis padres, abuelitos y hermanos que, con su aliento, su soporte y sobre todo su inmenso amor, han sabido brindarme las fuerzas necesarias para terminar este trabajo.

AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que forman parte de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP, por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento.

A mis tutores y guía de laboratorio por sus enseñanzas y pasión por la ciencia.

A todas las personas que han hecho mi vida universitaria más grata.

Y a aquella que sirvió de inspiración y compartió sus conocimientos, desde el comienzo hasta el final de este trabajo, gracias por ser mi apoyo.

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Listado de Abreviaturas	13
Resumen.....	14
Abstract	15
Capítulo 1: Introducción.....	16
Planteamiento del problema	16
Justificación del problema	17
Objetivos	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
Marco Teórico	19
<i>Persea americana</i> Mill. (aguacate)	19
Características botánicas	20
Ciclo biológico.....	20
Importancia del cultivo	21
Cultivo de <i>Persea americana</i> Mill. en el Ecuador	22
Diversidad genética	22
Marcadores moleculares	23
Microsatélites (SSR).....	24
Genotipaje mediante la técnica de M13-tailing	24

Hipótesis	25
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	25
Localización del estudio	25
Material vegetal	25
Toma de muestras	26
Extracción de ADN	26
Cuantificación del ADN por espectrofotometría	27
Validación del ADN y de marcadores microsatélites	28
Amplificación con Microsatélites SSR mediante la técnica M-13 <i>tailing</i> para genotipaje en el Analizador Genético LI-COR 4300S	30
Análisis de datos	33
Análisis de diversidad genética	33
Número de alelos por locus	33
Frecuencia alélica.....	34
Heterocigosidad observada.....	34
Heterocigosidad esperada.....	34
Contenido de información polimórfica (PIC)	34
Análisis de la estructura génica	35
Análisis de las relaciones genéticas entre individuos y poblaciones	35
Capítulo 3: Resultados	36
Validación de muestras de ADN	36

Identificación de poblaciones y descripción de la estructura genética de la colección de <i>Persea americana</i> Mill.	36
Diversidad genética entre las dos poblaciones formadas	38
Relación genética entre las accesiones de aguacate estudiadas	40
Análisis de varianza molecular y diferenciación poblacional	43
Capítulo 4: Discusión	44
Capítulo 5: Conclusiones	47
Capítulo 6: Recomendaciones	48
Capítulo 7: Bibliografía	49
Capítulo 8: Anexos.....	55

Índice de tablas

Tabla 1 Características de los diferentes marcadores moleculares	23
Tabla 2 Cantidad de reactivos para preparar soluciones tampones para la extracción de 24 muestras	27
Tabla 3 Master mix de amplificación de PCR a ser empleado para proceso de validación de ADN de <i>Persea americana</i> Mill	29
Tabla 4 Programa de amplificación a ser utilizado en el termociclador para amplificación de microsatélites específicos de <i>Persea americana</i> Mill	29
Tabla 5 Características de los 10 marcadores moleculares desarrollados para <i>Persea americana</i> Mill.....	30
Tabla 6 Master mix de amplificación de PCR empleado para genotipaje mediante la técnica de M13-tailing.....	31
Tabla 7 Programa de amplificación utilizado en el termociclador	32
Tabla 8 Estimaciones de diferentes parámetros de diversidad genética dentro de las dos poblaciones	39
Tabla 9 Estimaciones de diferentes parámetros de diversidad genética para cada uno de los cebadores utilizados	40
Tabla 10 Análisis de variación molecular con el software GenAlex para muestras de aguacate	43
Tabla 11 Índices de fijación de Wright para cada marcador	44

Índice de figuras

Figura 1 Muestras de ADN obtenidas de la colección de <i>Persea Americana</i> Mill. validadas mediante amplificación con el cebador SHRSPa-109.....	36
Figura 2 Valor de delta K vs K obtenido en el software Structure Harvester	37
Figura 3 Distribución de los individuos de la colección de <i>Persea americana</i> Mill. en las dos poblaciones predeterminadas	38
Figura 4 Análisis de coordenadas principales (PCoA) que demuestra las relaciones genéticas entre los individuos de las dos poblaciones identificadas.....	41
Figura 5 Dendograma de 151 muestras y 6 variedades pertenecientes a la especie <i>Persea americana</i> Mill	42

Listado de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMOVA	Análisis de Molecular de Varianza
EET	Estación Experimental Tropical
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
INIAP	Instituto Nacional Investigaciones Agropecuarias
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Contenido de información polimórfica
SSR	Secuencias Repetidas Simples
ul	Microlitros

Resumen

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol perenne cuyo fruto es uno de los más consumidos a nivel mundial, por ser fuente principal de potasio y ácidos grasos monoinsaturados. En el país, representa un rubro significativo para la exportación. Este estudio tiene como objetivo analizar la diversidad genética de la colección de aguacate de la Estación Experimental Tropical Pichilingue. Se realizó una caracterización molecular del banco de germoplasma del cultivo (155 individuos) usando 10 microsatélites, con un promedio de 13 alelos por locus. Todos los marcadores utilizados demostraron ser significativamente informativos. Por medio de un análisis bioinformático, se determinó que existe una diversidad genética baja ($H_o = 0.464$, $H_e = 0.743$ y $I = 1.844$) en comparación con otras poblaciones. La estructura poblacional está compuesta por 2 grupos que genéticamente son cercanos según el análisis de coordenadas principales (PCoA). El primer conglomerado está compuesto por muestras recolectadas en la Costa y el segundo en su mayoría por muestras de la Sierra. Para la visualización de los resultados se construyó un dendograma por el método de *Neighbor Joining* con las distancias de Nei obtenidas. Es relevante conocer la variación genotípica de los individuos, principalmente para el manejo y conservación del cultivo.

Palabras clave

- **DIVERSIDAD GENÉTICA**
- **GENOTIPADO**
- **AGUACATE**
- **MICROSATÉLITES**

Abstract

Avocado (*Persea americana* Mill.) is one of the most consumed fruits worldwide. It is a source of potassium and fatty acids. A national level represents a significant item for export. This study aims to analyze the genetic diversity of the avocado collection of the Pichilingue Tropical Experimental Station. Molecular characterization of the avocado germplasm collection) was made with 10 microsatellites and an average of 13 alleles per locus. All markers used proved to be significantly informative. In bioinformatics análisis, we concluded that the germplasm bank has a low genetic diversity ($H_o = 0.464$, $H_e = 0.743$ and $I = 1.844$) compared to other populations. The population structure is composed of two clusters. That is genetically close according to principal coordinate analysis (PCoA). The first conglomerate was formed by samples collected on the Coast. The second most by samples from the Sierra. The dendrogram was built using the Neighbor-Joining method with the Nei distances obtained. It is to visualize the results. It is relevant to know the genotypic variation of individuals, mainly for the management and conservation of the crop.

Keywords

- **GENETIC DIVERSITY**
- **GENOTYPING**
- **AVOCADO**
- **MICROSATELLITES**

Capítulo 1: Introducción

Planteamiento del problema

Persea americana Mill. (aguacate) es un árbol perenne que genéticamente está compuesto por un cariotipo $2n=24$ y es miembro de la familia Lauraceae (García, 1975). Y se conoce que es originario de México, Antillas y Guatemala. Hasta hoy han sido reportadas más de 20 variedades y cultivares, producto de la evolución natural y domesticación de la especie respectivamente, como por ejemplo las variedades: Fuerte, Hass, Nabal, entre otros (M. Galindo et al., 2007; Lahav & Lavi, 2009). Se conoce que *Persea americana* es una especie con alto grado de hibridación por lo que estudiar su filogenia se ha convertido en un gran reto (E. Galindo et al., 2011). Hoy en día se han creado bancos de germoplasma *ex situ* que permiten documentar, caracterizar y evaluar los perfiles genéticos de individuos recolectados de distintas zonas para obtener una visión más concisa de la filogenia, variabilidad y diversidad genética de la especie y de esta manera poder establecer programas de fitomejoramiento (Pérez et al., 2015).

En el Ecuador, en el año 2020 se produjeron 20 352 toneladas de aguacate (fruta fresca) de un total de 6 332 hectáreas sembradas (Sistema de Información Pública Agropecuaria, 2021). Así mismo Viera *et al.* (2016) señala que la superficie cultivada de aguacate destinada a exportación es de 430 hectáreas, distribuidas en las provincias de Imbabura, Carchi y Península de Santa Elena. Sumado a esto la Corporación Financiera Nacional reporta que en el año 2019 el aguacate abarcó el 3% de la producción nacional en el sector de “Otros cultivos de frutas tropicales y subtropicales” y se exportó 9 692.49 toneladas (Cooperación Financiera Nacional, 2020).

En el país existen al menos 11 instituciones que mantienen un banco de germoplasma de especies vegetales nativas y de interés agrícola, entre ellas: la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP y la Granja Experimental de Tumbaco INIAP. Siendo estas últimas las únicas que poseen una colección de *Persea americana* Mill. con 54 y 31 accesiones respectivamente (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 2000). En el caso específico, de la colección de aguacate de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, con un total de 155 individuos, se estima que pudiese estar representada una parte importante de la diversidad de este cultivo, o al contrario que esté limitada a unos cuantos materiales genéticos. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud la base genética existente. Esta pregunta de investigación que en realidad constituye el propósito de este estudio; se presenta justo en momentos en los cuales existe una demanda insatisfecha de aguacate en los mercados nacionales e internacionales (OCDE & FAO, 2021). Se conoce que esta colección es el resultado de sucesivas colectas de material en los diferentes cantones productores de la Costa ecuatoriana y material del banco de germoplasma de la Granja Experimental de Tumbaco INIAP.

Justificación del problema

Es ampliamente conocido que para optimizar el manejo de recursos genéticos se necesita una identificación precisa de los genotipos y fenotipos, así como una evaluación correcta de la cantidad y distribución de la diversidad genética dentro de una especie (Govindaraj et al., 2015). El país presenta condiciones ambientales altamente favorables para el cultivo y se han dispuesto algunos planes y políticas públicas orientadas al desarrollo del mismo (Ministerio Coordinador de Producción et al., 2020). En estas condiciones es necesario generar información que sirva de base para la selección de materiales potenciales que pudieran ser mejorados y constituirse en

nuevas opciones de tipo comercial. Por otra parte, estudios de esta naturaleza se tornan altamente importantes cuando se considera que la diversidad genética de un cultivo agrícola es limitada y que por lo tanto, se vuelve indispensable su conservación para evitar una erosión genética (Arias & Cano, 2009). Más aún cuando se conoce que, durante los últimos años, varias especies han sido catalogados como extintas o peligro crítico. Tal es el caso de *Ocotea pachypoda*, una especie endémica del Ecuador que pertenece a la familia Lauraceae y se encuentra en peligro crítico (Amorim et al., 2020). En este sentido, la disponibilidad de la información de los recursos genéticos se ha convertido en una herramienta para preservar los atributos de adaptación y disponer de genes importantes para el fitomejoramiento. Estos genes son la clave para la creación de nuevas variedades con un pool genético, que ayuden a satisfacer las demandas del crecimiento poblacional y superar limitantes producto de la presión de plagas, enfermedades y condiciones ambientales severas (Arias & Cano, 2009).

Objetivos

Objetivo general

Analizar la diversidad genética de la colección de aguacate (*Persea americana* Mill.) del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP.

Objetivos específicos

- Caracterizar molecularmente las accesiones de la colección de aguacate (*Persea americana* Mill) del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR).

- Determinar los grupos genéticos formados por los individuos de cada accesión pertenecientes a la colección del banco de germoplasma.
- Comparar las diferencias genéticas presentes a nivel de polimorfismo de los genotipos de aguacate caracterizados.

Marco Teórico

***Persea americana* Mill. (aguacate)**

Persea americana (Aguacate) es un árbol perenne, originario y domesticado en las partes altas de México, Guatemala y Antillas, su fruto es consumido hace aproximadamente 7 000 – 8 000 años A.C (Barrientos & López, 2001). Actualmente se cultiva desde Chile hasta México, entre las variedades comerciales más importantes están: Fuerte, Hass, Nabal, Booth, Lorena y Criollo.

El cultivo de aguacate se desarrolla mejor en suelos profundos, franco-arenosos, bien drenados, con una pendiente no superior al 70% y un pH entre 5.5 a 6.5. La temperatura ideal depende de la variedad sembrada, pero está en un rango de 20°C a 28°C para evitar contaminación fúngica, fructificación escasa y desprendimiento del fruto. Otros factores que deben ser controlados son la luminosidad y en especial la cantidad de agua, dado que el aguacate es muy sensible a las variaciones de concentraciones de la misma (Amórtegui et al., 2001). Por ejemplo, en climas de tipo mediterráneo se calcula que la tasa máxima de uso de agua debe estar entre 3 y 5 mm/d (Carr, 2013).

Características botánicas

Persea americana Mill. (aguacate) es un árbol perenne de tronco grueso y leñoso, puede alcanzar una altura de 20 m, pero en el campo se controla su altura hasta 5 m para poder controlar plagas y facilitar su cosecha. Las hojas de la planta de aguacate son alargadas, de jóvenes son rojizas y pubescentes, ya en su estado maduro se vuelven acartonadas y de color verde intenso. El tronco del árbol de aguacate tiene varias ramificaciones, flores hermafroditas de color verde amarillento y en forma de panícula, su fruto es una drupa de color verde claro a verde oscuro y tiene un pericarpio delgado y mesocarpio carnoso (Amórtegui et al., 2001; Pérez et al., 2015).

La información taxonómica de la especie *Persea americana* es la siguiente (Pérez et al., 2015):

Reino: Plantae

Familia: Lauraceae

División: Magnoliophyta

Género: *Persea*

Clase: Magnoliopsida

Especie: *Persea americana* Mill

Orden: Laurales

Ciclo biológico

Persea americana Mill. tiene un ciclo de vida prolongado hasta los 25 años dependiendo de la variedad, su ciclo se divide en 4 fases: vegetativa, floración, fructificación y maduración del fruto. En la fase vegetativa se forman y desarrollan las yemas por un periodo de 8 a 10 meses hasta formar brotes de hojas funcionales. La floración del aguacate ocurre una vez al año desde las yemas axilares de la rama. Y el desarrollo normal del fruto va en función de la división celular, engrosamiento y

maduración, los cuales dependen de factores abióticos como la cantidad de agua y nutrientes (Amórtegui et al., 2001).

Importancia del cultivo

Según el análisis de Montoya *et al.* (2018) plantea que: “Los países productores de aguacate, que esencialmente son latinoamericanos, se verán favorecidos por el auge de consumo de este fruto”. El mercado de aguacate en el contexto internacional va en aumento, producto de la fuerte demanda que se presenta en Estados Unidos y Europa. Se estima que el precio del producto suba en los últimos años y se logre expandir el mercado. El principal reto de la exportación de aguacate es la disminución de costos de producción y procesos logísticos (Montoya et al., 2018).

A nivel mundial la demanda de aguacate como alimento se debe a que es fuente de energía, vitaminas, proteínas y minerales. Su aceite es rico en ácidos grasos monoinsaturados y se usa para aplicaciones dermatológicas, contra la osteoartritis y como cicatrizante. El cultivo además de tener un papel importante en la economía de algunos países como producto de exportación, posee componentes farmacológicamente importantes con actividad anti-fúngica, anti-inflamatoria, antioxidante y anticonvulsivos (Chil et al., 2019).

Debido a esto, la demanda de este producto agrícola ha ido creciendo, no solo en el área de la industria alimenticia sino también en el área médica. La producción de aguacate es completamente viable, ya que se puede adaptar a zonas tropicales y producir durante todo el año, es decir que hay una disponibilidad constante de materia prima. Sin embargo, para obtener pulpa de aguacate, guacamole, salsa de aguacate y aceites para uso alimentario, cosmético y farmacéutico se requiere del fruto maduro. La maduración del aguacate es un proceso que lleva de 5 a 7 días, por esto varios

procesos biotecnológicos son usados para acelerar la maduración y conservar sus propiedades. Al contrario del proceso anterior, para obtener aguacates que se utilizan como frutas frescas se debe retrasar la maduración, para extender la vida útil del aguacate y preservar su calidad (Araújo et al., 2018).

El uso únicamente de la pulpa de aguacate (21-30% de la fruta), provoca una gran cantidad de residuos sólidos. Donde los constituyentes predominantes de estos residuos son carbohidratos, como fibras, hemicelulosa y almidón (semilla), que puede ser una fuente potencial de energía (bioetanol) y producir otros compuestos de valor agregado como: medios de cultivos para bacterias. Además, la extracción de aceites esenciales, fibras y metabolitos secundarios son propuestas viables para la minimización del impacto ambiental que provocan los residuos de aguacate (Páramos et al., 2020; Tzintzun et al., 2016).

Cultivo de *Persea americana* Mill. en el Ecuador

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2014) señala que “el cultivo de aguacate representa una gran alternativa de producción y exportación para el país”. Además, se menciona que la producción agrícola de aguacate en el Ecuador, a diferencia de otros países, es sostenible durante todo el año. Sumado a esto, INIAP plantea que los picos de producción y cosecha son de febrero a marzo y de agosto a septiembre al contrario de otros países que solo lo cosechan de 4 a 5 meses en el año.

Diversidad genética

La diversidad genética, es el componente básico de la biodiversidad, abarca las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. Para mantener la

biodiversidad de un ecosistema la diversidad genética debe mantenerse estable. En la actualidad las nuevas herramientas de biología molecular y genética molecular son usadas para aumentar la producción agrícola. Sin embargo, estas también toman importancia en la conservación de la biodiversidad de manera más eficiente. La determinación de la diversidad genética ayuda a detectar y conservar *in situ* o *ex situ* comunidades o poblaciones representativas. En la conservación *ex situ* del germoplasma permite definir las llamadas colecciones núcleo o *core collections* (Rimieri, 2017).

Marcadores moleculares

En los últimos años se han desarrollado diferentes marcadores moleculares como: Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD), microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR), análisis de Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs), Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLPs), Polimorfismos de Nucleótidos Simples (SNP), entre otros. Las ventajas y desventajas de estas técnicas están resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1

Características de los diferentes marcadores moleculares.

Características	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
ADN requerido (ug)	10	0.002	0.5-1	0.05	0.05
Calidad de ADN	Alto	Alto	Moderado	Moderado	Alto
Basado en PCR	No	Si	Si	Si	Si
Numero de loci polimórficos analizados	1-3	1.5-5	20-100	1-3	1
Facilidad de Uso	No fácil	Fácil	Fácil	Fácil	Fácil
Automatización	Bajo	Moderado	Moderado	Alto	Alto

Características	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
Reproducibilidad	Alto	No definido	Alto	Alto	Alto
Costo de desarrollo	Bajo	Bajo	Moderado	Alto	Alto
Costo del análisis	Alto	Bajo	Moderado	Bajo	Bajo

Nota. Adaptado de “Molecular markers and their applications” (p.140), por E. Karlik & H. Tombuloğlu, 2016, *Plant Omics: Trends and Applications*, 7.

Con la información obtenida de la Tabla 1, se puede concluir que los marcadores SSR poseen mejores características frente a otros marcadores, entre las más importantes la eficiencia para detectar polimorfismos y facilidad de uso. Además, los SSR pueden ser utilizados para la evaluación de la variabilidad y diversidad genética, caracterización del germoplasma e identificación y toma de huellas dactilares de genotipos (Karlik & Tombuloğlu, 2016) .

Microsatélites (SSR)

Según Carmen & Fulton (2003) los microsatélites son repeticiones de secuencias simples, su tamaño varía entre 1 a 10 pares de base, son muy variables y están distribuidos uniformemente por todo el genoma de eucariotas. También señala que estos polimorfismos se identifican por medio de cebadores de PCR que flanquea la región de microsatélites, las cuales tiende a conservarse dentro de la especie.

Genotipaje mediante la técnica de M13-tailing

Esta técnica consiste en secuenciar una cadena de ADN con la ayuda de cebadores que contienen una cola M13, a la cual se hibrida un marcador fluorescente. En el procedimiento para el etiquetado con fluorescencia a fragmentos de PCR en una reacción se utiliza: un cebador específico de secuencia con cola M13 en 5´, un cebador

inverso específico de la secuencia y el fluorómetro con cola M13. Se debe procurar que la hibridación directa sea mayor a la inversa. Las condiciones del termociclador aseguran que, durante los primeros ciclos, el cebador directo con su secuencia M13 se incorpore en los productos de PCR acumulados. Cuando se agota el cebador directo, la temperatura de hibridación se reduce para facilitar la unión del fluorómetro universal M13 y marcar el producto de PCR (Schuelke, 2000).

Hipótesis

Ho: La colección de *Persea americana* Mill cultivadas en la Estación Experimental Tropical Pichilingue no presentan una alta diversidad genética.

Hi: La colección de *Persea americana* Mill cultivadas en la Estación Experimental Tropical de Pichilingue presentan una alta diversidad genética.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Localización del estudio

Las muestras fueron obtenidas de la EET Pichilingue del INIAP, localizada en las coordenadas geográficas: 79° 27' longitud occidental y 1° 05' latitud Sur, con una altitud de 75 metros sobre el nivel del mar. Las características medioambientales de la localización son: Temperatura media de 25.03 °C, precipitación total anual 2706.6 mm, humedad relativa promedio anual 84.38 %, heliofanía 760.5 horas luz/ año, evaporación 755.7 mm/año y tiene un área ecológica de Bosque Húmedo Tropical (INAMHI, 2021).

Material vegetal

La colección *in situ* de aguacate (*Persea americana* Mill.) de la EET Pichilingue del INIAP consta de 155 individuos correspondientes a 58 accesiones, según registros

de campo del Departamento de Recursos Fitogenéticos de la EET Pichilingue, actualizado en el 2019.

Toma de muestras

Se tomaron muestras de cada uno de los 155 individuos correspondientes a las 58 accesiones de la colección. Se recolectaron 3 hojas jóvenes fotosintéticamente activas, con una coloración verde, buen estado fitosanitario y ubicadas en la parte media de las ramas (tercio medio de cada rama) y tercio medio de la planta. Luego las hojas fueron colocadas en bolsas de papel y llevadas de inmediato al laboratorio, en donde se dejaron secar por 20h a 40°C en una estufa.

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción establecido por Russell *et al.* (2010) con modificaciones por la autora. Se preparó en dos vasos de precipitación, el tampón de extracción y tampón de lavado, que se detallan en la Tabla 2. Se utilizó 1ml de tampón, para la extracción de cada muestra. El tampón se calentó en baño maría a 60 °C y se utilizó 1 ml de tampón sorbitol en aprox. un gramo de tejido seco macerado de cada muestra. Se homogenizó completamente con la ayuda de puntas y se aplicó un vortex. Finalmente, se centrifugó por 10 minutos a 5700 rpm y se descartó el sobrenadante, se repitió el proceso cinco veces para lavar el macerado.

Al precipitado, se añadió 1 ml del tampón de extracción Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) con Sarkosyl, se homogenizó completamente con puntas y se dio vortex. Luego, se incubó a 60 °C por una hora, dando inversión a los tubos por lo menos dos veces. Después se centrifugó a 5700 rpm por cinco minutos. Se transfirió 700 ul del sobrenadante a nuevos tubos de 2ml, se añadió 700 µl de

cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) 24:1 y se mezcló por inversión dando vortex por aprox. 10 min. Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se repitió este procedimiento dos veces.

Para finalizar, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y se adicionó: 460 µl de isopropanol (2/3 del volumen del sobrenadante) y 70 µl de Acetato de Sodio 3M. Se incubó a -20 °C durante una hora. Luego, se centrifugó por 30 min a 13000 rpm y se repitió el proceso de purificación dos veces. Después, se retiró el isopropanol y se lavó dos veces con 500 µl de etanol 70% y una vez con 500 µl de etanol absoluto. Por último, se dejó evaporar todo el alcohol durante 12 horas y el pellet se resuspendió en 100 µl de Tris-EDTA (TE) 0.1M con 2 µl de ARNasas.

Tabla 2

Cantidad de reactivos para preparar soluciones tampones para la extracción de 24 muestras

Buffer Sorbitol (121ml)		Buffer Sarkosyl (25 ml)	
Triss HCl 1M pH 8	12.1 ml	Triss HCl 1M pH 8	2.5 ml
Sorbitol	0.7936 g	Sarkosyl	0.05 g
EDTA 5M pH 8	1.21 ml	NaCl 5M	15 ml
PVP	1.24 g	CTAB	0.75 g
Mercaptoetanol	12.4 ml	EDTA 5M pH 8	1 ml
		PVP	0.25 g
		Mercaptoetanol	0.05 ml

Cuantificación del ADN por espectrofotometría

La cuantificación se realizó mediante un espectrofotómetro Hitachi U-2900 UV-VIS. Para encender el equipo, se utilizó una celda con 1980 µl de agua ultra pura. Luego se adicionó 20 µl de ADN, se homogenizó y se realizó la lectura. Se registró las

medidas de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm, para obtener valores de concentración y pureza. Para calcular la concentración de ADN obtenida se aplicó la ecuación 1, y para determinar la pureza se empleó la ecuación 2, como se detalla en el protocolo de DNA GENOTEK (2012).

Ecuación 1.

$$[ADN] = Abs_{260} \times f \times 50 \frac{ug}{ml}$$

Donde:

Abs_{260} = absorbancia a 260 nm

f = factor de dilución

50 ug/ml = factor de conversión

Ecuación 2.

$$[ADN] = \frac{Abs_{260}}{Abs_{280}}$$

Donde:

Abs_{260} = absorbancia a 260 nm

Abs_{280} = absorbancia a 280 nm

Validación del ADN y de marcadores microsatélites

Con la finalidad de verificar la validez del material genómico y correcto funcionamiento de los cebadores, se realizó una amplificación de las muestras con el marcador SHRSPa_109. Debido a que este fue diseñado para aumentar los microsatélites informativos disponibles, que amplifiquen en todas las variedades de *Persea americana* Mill (Borrone et al., 2007). El cóctel de mix PCR se detalla en la Tabla 3 y el programa de amplificación en la Tabla 4.

Tabla 3

Master mix de amplificación de PCR a ser empleado para proceso de validación de ADN de Persea americana Mill.

Reactivo	Concentración	Volumen 1Rx (ul)
ADN	5 ng/ul	2
MgCl ₂	25 mM	0.6
Green Buffer GoTaq	5X	1.5
dNTP's	5 mM	0.38
Cebador F	10 uM	0.38
Cebador R	10 uM	0.38
Taq	5 U/ul	0.10
Agua	Ultra pura	2.12
Volumen total		7.5

Tabla 4

Programa de amplificación a ser utilizado en el termociclador para amplificación de microsatélites específicos de Persea americana Mill.

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)	
Denaturación inicial	94	2	
Denaturación	94	0.3	5 ciclos
Anillamiento	60	0.75	
Elongación	72	1	
Denaturación	94	0.3	35 ciclos
Anillamiento	56	0.75	
Elongación	72	1	

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)
Elongación final	72	10

Nota. TA: Temperatura de annealing propia de cada cebador

Para visualizar los productos de PCR obtenidos, se cargaron 6 ul de cada muestra en un gel de agarosa al 2% teñidos con Syber Safe a una concentración de 1:100000. La corrida electroforética se realizó a 100V por un tiempo de 30 minutos.

Amplificación con Microsatélites SSR mediante la técnica M-13 tailing para genotipaje en el Analizador Genético LI-COR 4300S

Se usaron 10 microsatélites para amplificar las muestras de *Persea americana* Mill. diseñados por Ashworth *et al.* (2004), Borrone *et al.* (2007) y Gross-German & Viruel (2013) los cuales se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5

Características de los 10 marcadores moleculares desarrollados para Persea americana Mill.

Nombre	Secuencia F 5'-3'	Secuencia R 5'-3'	T °C	Tamaño (bp)
AVO.102 ^a	TTCGCCTTATCAGCGTTA G	TCTTGGAAGCCCTACTC C	53	154-201
AVD.001 ^a	GTTTCCAAGCGACTCAC GAG	GATTCCATGCTGAATTGC CG	52	208-267
SHRSPa _109 ^b	TTCCAGCTACTACTCCTC CAGT	AAGGAGGTGAGCCGAATG	56	132-162
SHRSPa _056 ^b	GGTTTTCCAATTCTCTCT ATCCCC	TTGATGCCTGCTTCCGTG TG	56	86-122
SHRSPa _089 ^b	GCAGAAGCCACCTCAGA AC	CAAACAACAGATGAGCGG A	56	288-321

Nombre	Secuencia F 5'-3'	Secuencia R 5'-3'	T °C	Tamaño (bp)
SHRSPa _111 ^b	ACCTTTCAATCTCTTCCC AAAC	CCGCTCCAATCCAACCA	56	142-171
LMAV.07 ^c	AACTTATCCTTACCGGT GCT	TATGTAATCACAGCCCCA TC	52	162- 217
LMAY.33 ^c	TACTTCAACCCCATTTGA TG	AGAGCACCTTCCTCTCTC AT	52	204-251
LMAY.31 ^c	CAGGATTAGGGAGATTT TCA	CTCAAGGTCCCCTTTTAA CT	52	132- 175
AVT.386 ^a	ACAACCCAAACATAAAT GCT	AATAGAAGTGACATCCGA CC	56	230-255

Nota. ^a Ashworth, V., Kobayashi, M., De La Cruz, M., & Clegg, M. (2004) ^b Borrone, J., Schnell, R., Violi, H., & Ploetz, R. (2007) ^c Gross, E., & Viruel, M. (2013).

La amplificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Morillo & Miño (2011) con modificaciones. A la secuencia forward de cada cebador se le añadió un fragmento de 19 nucleótidos, conocido como cola M13. El cóctel de mix PCR se detalla en la Tabla 6 y el programa de amplificación en la Tabla 7.

Tabla 6

Master mix de amplificación de PCR empleado para genotipaje mediante la técnica de M13-tailing.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1Rx (ul)
ADN	10 ng/ul	4 ng/ul	2
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	0.5
Green Buffer	5X	1X	1
GoTaq			

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1Rx (ul)
dNTP's	5 mM	0.2 mM	0.20
M13-700/800	1 uM	0.16 uM	0.80
Cebador F- M13	1 uM	0.01 uM	0.05
Cebador R	10 uM	0.016 uM	0.08
Taq	5 U/ul	2 U/ul	0.05
Agua	Ultra pura	Ultra pura	0.32
Volumen total			5

Tabla 7

Programa de amplificación utilizado en el termociclador.

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)	
Ciclo inicial de denaturación	94	2	
Denaturación	95	4	
Denaturación cíclica	95	1	25 ciclos
Anillamiento	TA*	2	
Elongación	72	2	
Elongación final	72	10	
Estabilización	4		

Nota. TA: Temperatura de annealing propia de cada cebador

Al finalizar la amplificación, la placa se protegió de la luz, se agregó 5 ul de solución de parada (blue stop) en cada pocillo, luego se quitó el aceite de los pocillos

donde van las escaleras y se desnaturalizó la placa por 4 min a 95°C. Finalmente, la placa se colocó en hielo.

Para el genotipaje, se usó un analizador ADN LI-COR 4300. Para armar el gel se usó: 20ml un Gel Matrix KB Plus al 6.5%, 150 ul de persulfato de amonio al 10% y 15 ul de TEMED. Después de que el gel este polimerizado (aprox. dos horas), se ensambló la placa en el genotipador y se utilizó el buffer de electroforesis TBE 1X (Li-cor Technical Support, 2012). Se realizó una pre-corrída del gel para eliminar la posibilidad de error. Finalmente, se corrieron las muestras por un tiempo de alrededor de 1.5 horas a 1200 voltios (Li-cor Technical Support, 2012).

Análisis de datos

Como producto del genotipaje, se obtuvo una matriz con el número de alelos y tamaño de bandas en el analizador SAGA GT-SSR™ (LI-COR Biosciences). Los datos fueron transferidos a una matriz M en el programa Microsoft Office Excel, los cuales fueron depurados de acuerdo a la información alélica reportada en anteriores estudios.

Análisis de diversidad genética

La matriz M depurada, fue importada al software Power Marker V 3.25 donde se determinó los siguientes parámetros: número de alelos por locus, frecuencia alélica, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, contenido de información polimórfica y la matriz de distancias genéticas de Nei 1973.

Número de alelos por locus

Número de variaciones de un gen o cada una de las versiones de un gen (National Human Genome Research Institute, 2021).

Frecuencia alélica

La frecuencia génica o alélica es la medida de la proporción relativa de alelos de una población dada, expresándose en porcentaje o en la unidad. Se estima contando el número de veces que es observado el alelo de un locus y dividiéndolo entre el número total de alelos estudiados (Hernández & Trejo, 2014).

$$\text{frecuencia del } (A) = \frac{\text{número de copias del alelo } A \text{ en la población}}{\text{número total de copias del gen en la población}}$$

Heterocigosidad observada

Es la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci (Hernández & Trejo, 2014). Se obtiene de:

$$H(\text{obs}) = 1 - \sum \text{frecuencias}$$

Heterocigosidad esperada

Es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Hernández & Trejo, 2014). Obteniéndose a partir de la siguiente fórmula:

$$H(\text{esp}) = 1 - \sum \text{frecuencias}^2$$

Contenido de información polimórfica (PIC)

Es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Se obtiene de multiplicar la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir

de las frecuencias alélicas) por la probabilidad de que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede los alelos (Hernández & Trejo, 2014).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Análisis de la estructura génica

La matriz M se importó en el software STRUCTURE vs. 2. 3.4 para la evaluación de la estructura genética. Los datos se corrieron con los siguientes parámetros: frecuencia alélica correlacionada, duración del período de quemado de 10 000, un número de repeticiones de MCMC (Método de Monte Carlo basado en cadenas de Markov) de 10 000, 10 iteraciones y el modelo Admixture. Se obtuvo un archivo run.zip y fue analizado en el programa de visualización en línea Structure Harvester. Se determinó el número real de poblaciones que se debe asignar a nuestra muestra, en base al valor de delta K.

Finalmente, se ejecutó el software CLUMPP 1.1 para encontrar las alineaciones óptimas de corridas independientes pertenecientes a nuestro valor de K. Los archivos generados se visualizaron en el software Microsoft Excel.

Análisis de las relaciones genéticas entre individuos y poblaciones

Se preparó un archivo de entrada para el software GenAlex 6.5, donde se realizó el análisis de varianza molecular AMOVA, estadística F y de coordenadas principales. Se desarrolló un diagrama de puntos con las dos primeras coordenadas para ilustrar la relación entre accesiones. Con la matriz de distancias de Nei basado en el método *Neighbor-joining* (NJ), se construyó un dendrograma que fue visualizado en MEGA X y

editado con la herramienta en línea iTOL v5. La identificación de genotipos duplicados se realizó con la ayuda de la extensión de Microsoft Excel Toolkit.

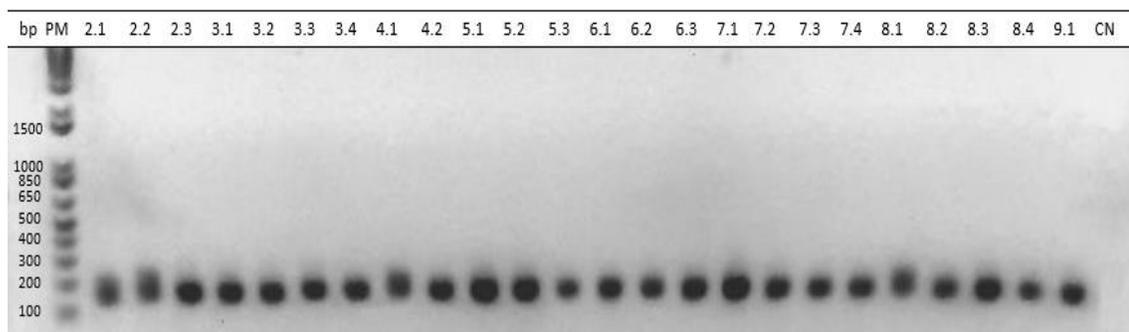
Capítulo 3: Resultados

Validación de muestras de ADN

Se logró extraer ADN entre 1.55 a 2 de pureza y una concentración entre 95 mg/ul a 803 mg/ul en todos los individuos. Como producto de la amplificación de todas las muestras con el primer SHRSPa_109 se obtuvieron bandas de aproximadamente 170 pb como se muestra en la Figura 1.

Figura 1

Muestras de ADN obtenidas de la colección de Persea Americana Mill. validadas mediante amplificación con el cebador SHRSPa-109.



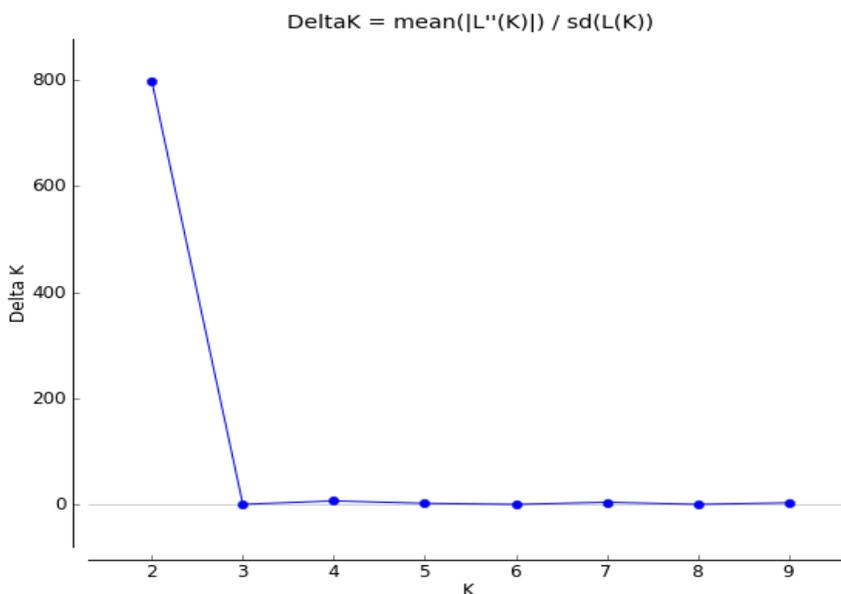
Identificación de poblaciones y descripción de la estructura genética de la colección de *Persea americana* Mill.

Para la designación de poblaciones, se empleó el análisis por el método desarrollado por Pritchard *et al.* (2000), con la ayuda del software STRUCTURE. En el cual se asumió un intervalo de poblaciones de 1 a 10, para obtener un conjunto de datos que muestran las probabilidades que tiene cada individuo de pertenecer a una

población. Estos datos se pudieron visualizar con el análisis de valores promedio de K en el software STRUCTURE HARVESTER. La función "Harvest" detectó el valor de delta K más alto (798.06), asociado al valor de K igual a 2, como se muestra en la Figura 2. El valor de K representa el número de poblaciones que más se ajusta a nuestro estudio, es decir que las accesiones del banco de germoplasma se distribuyen en dos poblaciones.

Figura 2

Valor de delta K vs K obtenido en el software Structure Harvester.

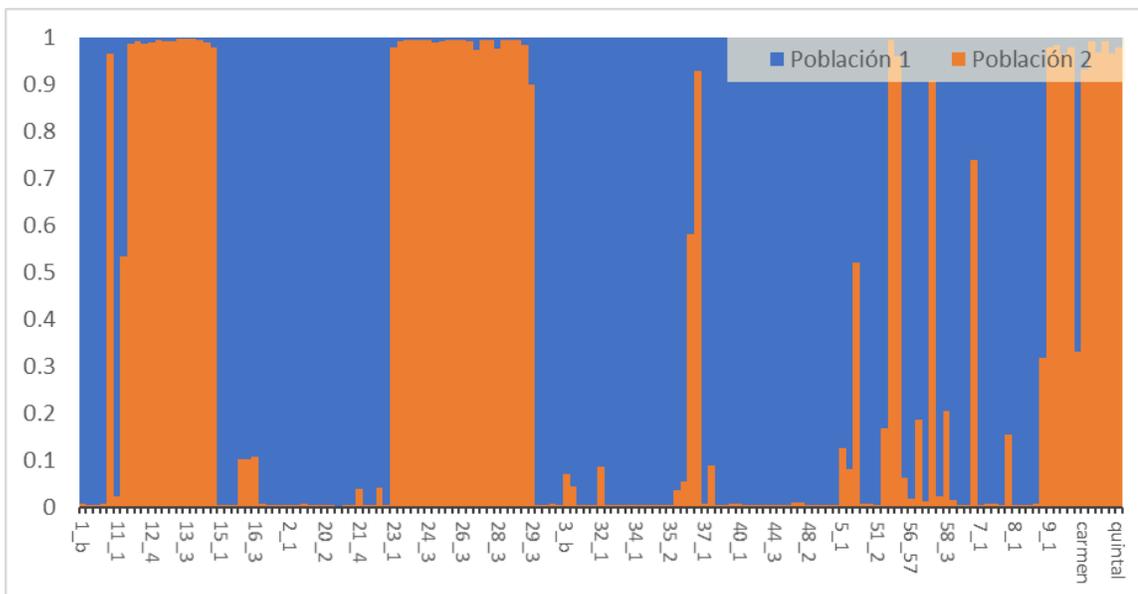


Mediante el análisis de conglomerados realizado en CLUMPP, se determinó que la población 1 es la más grande con 98 individuos, mientras que la población 2 está formada por 53 individuos. Esta distribución se puede observar en la Figura 3, donde el eje y representa la probabilidad de pertenencia a una población y el eje x los individuos. Los clones de la accesión 36 y 58, no se agrupan en la misma población. Además, existen individuos (5_3, 9_b, 36_2, 8_b y 11_b) que tienen una probabilidad de

pertenencia a una población entre el 40% y 60%. Las variedades Carmen, Choquete, Hass, Long hass, Lorena y Quintal pertenecen a la misma población.

Figura 3

Distribución de los individuos de la colección de Persea americana Mill. en las dos poblaciones predeterminadas.



Diversidad genética entre las dos poblaciones formadas

Como se muestra en la Tabla 8 el valor medio de individuos que amplificaron con los SSR utilizados es de 92 y 49 en la población 1 y 2, respectivamente. Esto se debe a que existieron individuos con valores nulos para ciertos SSR (Anexo 1). De la misma forma, el promedio de alelos por población es de 14 para la población 1 y 11 para la población 2. Los valores de heterocigosidad esperada y observada más altos están en la población 1, los que equivalen a 0.764 y 0.473, respectivamente. Es decir que, entre las dos poblaciones, la población 1 es la que abarca una mayor diversidad genética. Finalmente, el índice de fijación mayor es de 0.381 que corresponde a la población 2.

Tabla 8

Estimaciones de diferentes parámetros de diversidad genética dentro de las dos poblaciones.

Medición de diversidad	POP1	POP2
N	92	49
Na	14	11
Ne	6	5
I	1.963	1.725
Ho	0.473	0.455
He	0.764	0.721
F	0.376	0.381

Nota. N: número de individuos, Na: número de alelos, Ne: número efectivos de alelos, I: información Index, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, F: índice de fijación.

El análisis de los parámetros de diversidad genética de cada loci o cebador reveló que el número de alelos más bajo pertenece a LMAV_07 con 7 alelos y el más alto a SHRSPa_089 con 17 alelos. El cebador con mayor número de observaciones es el SHRSPa_056 con 150, es decir que únicamente 1 individuo no amplificó en el proceso. La heterocigosidad observada y esperada más bajas son de 0.231 y 0.396 respectivamente, y están asociadas con los cebadores SHRSPa_111 y LMAV_33. Esto indica que son cebadores moderadamente informativos y que la presencia de heterocigotos es relativamente baja en comparación con los otros cebadores, como se indica en la Tabla 9. De la misma forma, el cebador que mayor información nos brinda

de acuerdo al número más alto de contenido de información polimórfica es el SHRSPa_089 con un PIC igual a 0.887.

Tabla 9

Estimaciones de diferentes parámetros de diversidad genética para cada uno de los cebadores utilizados.

Cebador	N	No. of obs.	Na	Fa	Ho	He	PIC
SHRSPa_056	151	150	16	0.157	0.673	0.882	0.884
SHRSPa_089	151	145	17	0.224	0.428	0.867	0.887
SHRSPa_109	151	147	16	0.320	0.605	0.839	0.843
SHRSPa_111	151	130	11	0.500	0.231	0.696	0.687
AVT_386	151	147	9	0.660	0.299	0.506	0.515
LMAV_07	151	126	15	0.302	0.492	0.840	0.832
LMAV_31	151	139	9	0.259	0.712	0.819	0.804
LMAV_33	151	141	7	0.773	0.262	0.396	0.376
AVD_001	151	138	13	0.384	0.536	0.773	0.781
AVO_102	151	145	15	0.317	0.428	0.804	0.824

Nota. N: número de individuos, No. of obs: número de observaciones, Na: número de alelos, Fa: mayor frecuencia alélica, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, PIC: contenido de información polimórfica.

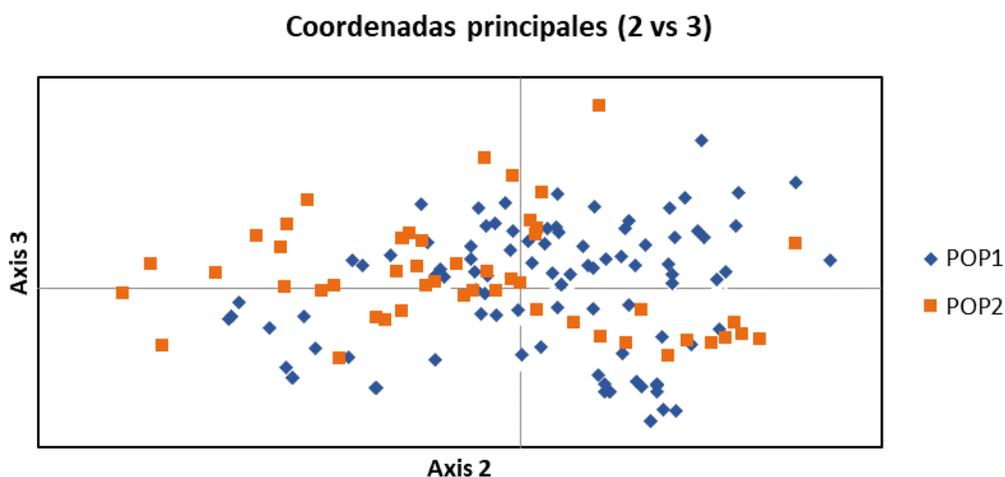
Relación genética entre las accesiones de aguacate estudiadas

En el análisis de coordenadas principales (PCoA) que se utilizó para estudiar la similitud genética entre individuos y poblaciones, se pudo evidenciar que no existe una diferencia notable entre individuos de las dos poblaciones, como se puede observar en

la Figura 4. Existe un número limitado de individuos en la población 1 que se agrupan en el eje 3 (parte superior derecha). Sin embargo, en el dendograma derivado del método NJ, se puede apreciar dos clados que parten de la raíz del árbol, los cuales se asumen que corresponden a las dos poblaciones determinadas. A excepción de algunos individuos (quintal, 58_1, 16_1, entre otros) que no se encuentran en la población a la que fueron asignados (Figura 5).

Figura 4

Análisis de coordenadas principales (PCoA) que demuestra las relaciones genéticas entre los individuos de las dos poblaciones identificadas.



En el dendograma también se puede observar que los clones de una accesión se agrupan en el mismo clado con excepciones, que se encuentran totalmente alejados de su grupo como por el ejemplo los individuos 36_4 y 16_3. Cabe recalcar que, existen accesiones donde ninguno de sus clones se agrupa en el mismo clado, como la accesión 49 y 44; corroborando la información obtenida de probabilidad de pertenencia a una población en el software STRUCTRE. Por otro lado, se logró asignar a los individuos nombrados con el sufijo “_b” a una posible accesión, debido a que estos no tienen registro de pertenencia en el diario de campo. Todas las variedades comerciales

Análisis de varianza molecular y diferenciación poblacional

El análisis de varianza molecular mostró un mayor porcentaje de varianza entre los individuos dentro de una población (98 %) que entre poblaciones (2 %), lo que da soporte al análisis PCoA (Tabla 10).

Tabla 10

Análisis de variación molecular con el software GenAlex para muestras de aguacate

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre poblaciones	1	13.615	13.615	0.071	2%
Dentro de la población	300	1169.206	3.897	3.897	98%
Total	301	1182.821		3.968	100%

Nota. df: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: variación estándar, %: porcentaje de varianza

Los índices de fijación de Wright obtenidos por cada cebador se muestran en la Tabla 11. Donde todos los valores de F_{st} son cercanos a 0, lo que indica que existe una divergencia genética producto de la reducción de heterocigosidad de acuerdo a Weir & Cockerham (1984). De la misma forma los índices de F_{is} positivos nos indica que hay una deficiencia de heterocigotos. El cebador SHRSPa_111 tiene un valor de 0.694, lo que podría indicar una mayor disminución de heterocigotos para este marcador. Por último, el valor medio de F_{it} es de 0.014, lo que indica una posible deficiencia de heterocigotos a nivel metapoblacional.

Tabla 11

Índices de fijación de Wright para cada marcador.

Cebador	Fis	Fit	Fst
SHRSPa_056	0.240	0.248	0.010
SHRSPa_089	0.516	0.526	0.020
SHRSPa_109	0.261	0.268	0.009
SHRSPa_111	0.694	0.703	0.030
AVT_386	0.420	0.429	0.015
LMAV_07	0.401	0.405	0.007
LMAV_31	0.121	0.128	0.009
LMAV_33	0.383	0.388	0.007
AVD_001	0.296	0.305	0.012
AVO_102	0.485	0.498	0.025
Mean	0.382	0.390	0.014
SE	0.051	0.052	0.003

Nota. Fis: coeficiente de endogamia, Fst: coeficiente del coancestro o coeficiente de fijación, Fit: coeficiente general de consanguinidad o índice de fijación en la metapoblación.

Capítulo 4: Discusión

El aguacate es un fruto de suma importancia en el área alimenticia, farmacéutica y comercial. En el Ecuador se lo cultiva desde zonas altas como el Carchi hasta zonas bajas como Santa Elena. Además, es uno de los productos agrícolas de exportación con gran potencial para el país. El objetivo principal del banco de germoplasma de *Persea americana* Mill. de la Estación Experimental Tropical Pichilingue es garantizar la

conservación de la diversidad genética de aguacate. En el presente estudio, se realizó la caracterización molecular de las accesiones de la colección, para el análisis de la diversidad genética. Para lo que se utilizó marcadores moleculares conocidos como microsatélites.

Según Botstein *et al.* (1980) un marcador SSR resulta altamente informativo si el PIC es mayor a 0.5. Por lo tanto, todos los microsatélites que utilizamos en este estudio sirven para, determinar de manera clara y óptima la diversidad genética de la especie. Con excepción del primer LMAV_33 que presenta una heterocigosidad esperada baja (0.396). Lo cual no concuerda con el análisis de Sandoval *et al.* (2021) donde la H_e (0.81) y H_o (0.41) fueron más altas. Posiblemente se deba a la presencia de alelos nulos por falla del operador, ya que se contaba con una cantidad y calidad de ADN adecuada para trabajar. También puede ser debido a que existen genomas que no amplifican con ciertos marcadores como lo afirma Ashworth *et al.* (2004), Borrone *et al.* (2007) y Gross-German & Viruel (2013).

Por otro lado, el cebador SHRSPa_089 es el SSR que mayor información nos brinda, para determinar parámetros de diversidad genética y caracterizar molecularmente cada accesión. Mediante un análisis bioinformático, se determinó que el marcador con mayor número de alelos (17) es el SHRSPa_089 lo que concuerda con el estudio de Borrone *et al.* (2007). El cebador con el valor de heterocigosidad más alta es SHRSPa_056, esto lo afirma Galindo *et al.* (2011), quien en su estudio compara 7 cebadores, donde SHRSPa_56 formó parte de los 4 cebadores que presentaron el mayor grado de heterocigosidad y polimorfismo.

Para determinar los grupos genéticos de la colección de aguacate se realizó el análisis de estructura génica. Se determinó que los individuos están distribuidos en 2 poblaciones. Las accesiones recolectadas en la Costa conforman la población 1 y las

accesiones recolectadas en la Sierra la población 2. De igual forma sucede en las investigaciones de Cañas *et al.* (2019) y Juma *et al.* (2020) en donde las muestras se agrupan de acuerdo a su origen geográfico. Al generar el dendograma se pudo observar que sigue un patrón de agrupamiento similar (2 poblaciones). Sin embargo, existen accesiones que pertenecen a la misma zona geográfica y están distribuidas en distintos nodos. Esto se justifica con en el análisis de PCoA y genotipos duplicados, que muestran claramente la estrecha similitud genética entre las dos poblaciones. Además, el número de poblaciones existentes no solo depende de la procedencia de los individuos, sino también del tamaño de muestra. Por ejemplo, en el estudio de Boza *et al.* (2018) se identificaron 4 poblaciones en un número de 350 accesiones, a diferencia de nuestro estudio que únicamente se analizaron 54 accesiones.

Por otro lado, la mayoría de los clones de una accesión se agruparon en el mismo nodo, mostrando una relación positiva a nivel genético. Las accesiones no se dividieron de acuerdo a su centro de origen como lo afirman Gross-German & Viruel (2013) y Juma *et al.* (2020). Debido a que existe un flujo constante de germoplasma de aguacate dentro de las regiones del país, lo que ocasionó a la generación de antecedentes genéticos similares en las accesiones, como lo menciona Liu *et al.* (2020).

En cuanto a las variedades comerciales analizadas en este estudio, todas pertenecen a la misma población, a excepción de la variedad quintal. El porcentaje de parentesco entre ellas (Carmen, Choquete, Long hass y Lorena) es del 50% al 60%. Debido a que, según Amórtegui *et al.* (2001) y Salazar *et al.* (1971), son cultivares híbridos provenientes de programas de mejoramiento entre las razas guatemalteca y antillana. Estas razas están estrechamente relacionadas entre sí. De la misma forma, se justifica la pertenencia de las accesiones 12, 13, 14, 24, 25, 26, 28 y 29 a la población 2. Dado a que corresponden a las variedades: Farchild, Collinred, Cooke, Collison,

Simpson, Choquette y Booth que también son híbridos entre las razas guatemalteca y antillana.

La poca diversidad genética entre poblaciones de la colección de *Persea americana* Mill, se muestra con los índices de fijación (F_{st} : 0.014, F_{is} :0.38 y F_{it} :0.39). Estos valores positivos y cercanos a cero nos indican el bajo nivel de estructura o aislamiento genético que existe entre las dos poblaciones, del mismo modo que sucede en los estudios de Cañas *et al.* (2019) y Ruiz *et al.* (2020). Al comparar los valores F_{is} y F_{it} podemos determinar que la variación genética intrapoblacional es mayor que la variación a nivel interpoblacional. Lo que concuerda con el análisis AMOVA e indica el flujo de materiales entre las poblaciones analizadas. Sin embargo, a nivel global el 97.44 % de déficit de heterocigosidad se debe a que los individuos en cada población, comparten alelos entre ellos y han ido acumulando frecuencias alélicas similares. Posiblemente causado por patrones complejos de reproducción sexual, selección de idiotipos o adaptabilidad de los árboles (Juma *et al.*, 2020; Sandoval *et al.*, 2021).

Con el análisis de la diversidad genética de la colección de aguacate de la EET Pichilingue, se evidencia la necesidad de recolectar accesiones nativas y no comerciales, para garantizar que el pool genético dentro de la colección crezca. Y de esta manera poder tener una alta diversidad genética. Para que, en un futuro, la estación disponga de material útil que sirvan a programas de fitomejoramiento y a su vez ser un centro de acopio para la conservación de la biodiversidad de la especie.

Capítulo 5: Conclusiones

Los marcadores utilizados en este estudio, nos permiten analizar de manera óptima y eficiente la diversidad genética existente entre individuos. Puesto que, son

altamente polimórficos e informativos y nos ayudan a establecer las relaciones genéticas.

Todas las accesiones de la colección del banco de germoplasma presentan por lo menos un alelo privado y frecuencias alélicas bajas, por lo que definir genotipos que abarquen un grupo de accesiones no es viable debido al alto grado de hibridación que posee la especie de aguacate.

Existen dos conglomerados bien definidos, pero la distancia genética entre ellos es muy baja, a causa de que comparten alelos entre sí.

A nivel estructural de la colección se puede determinar que a excepción de las accesiones 45,30 y 49 todos los individuos de una accesión son clones.

La diversidad genética a nivel global de la población es baja, dado que la heterocigosidad observada se desvía de manera evidente de la heterocigosidad esperada. Sin embargo, entre accesiones existe una variabilidad genética alta.

Capítulo 6: Recomendaciones

Debido a que el material genético de aguacate que se tiene en el banco de germoplasma, es la base de los programas de mejoramiento. Comprender y preservar la diversidad genética es de suma importancia, por lo tanto, se recomienda ampliar el número de marcadores utilizados para aumentar la información genética que se tiene de las accesiones y de esta forma reforzar la información obtenida en este estudio.

Se recomienda que haya la inclusión de nuevos materiales genéticos en la colección, previamente caracterizados molecularmente para garantizar una variabilidad genética entre individuos.

Capítulo 7: Bibliografía

- Amorim, E., Gomes, M., Jordão, L., Martinelli, G., & Quinet, A. (2020). *Ocotea hypoglauca*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2020*.
<https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T180256180A180256182.pt>
- Amórtegui, I., Capera, E., & Godoy, J. (2001). EL cultivo del Aguacate. In *Prohaciendo*.
[http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/jspui/bitstream/11348/4911/1/El cultivo del aguacate.pdf](http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/jspui/bitstream/11348/4911/1/El%20cultivo%20del%20aguacate.pdf)
- Araújo, R., Rodriguez, R., Ruiz, H., Pintado, M., & Aguilar, C. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 80(August), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Arias, M. L., & Cano, C. I. M. (2009). Conservación de recursos genéticos de la agrobiodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 33.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num1_art:126
- Ashworth, V., Kobayashi, M., De La Cruz, M., & Clegg, M. (2004). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae*, 101(3), 255–267.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.008>
- Barrientos, A., & López, L. (2001). Historia y genética del aguacate. *Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín*, 6, 100–121.
www.avocadosource.com/.../CICTAMEX_1998-2001_PG_100-121.pdf
- Borrone, J., Schnell, R., Violi, H., & Ploetz, R. (2007). Seventy microsatellite markers

from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequence tags: Primer note. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 439–444. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01611.x>

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. In *Am J Hum Genet* (Vol. 32).

Boza, E., Tondo, C., Ledesma, N., Campbell, R., Bost, G., Schnell, R., & Gutiérrez, O. (2018). Genetic differentiation, races and interracial admixture in avocado (*Persea americana* Mill.), and *Persea* spp. evaluated using SSR markers. *Genet Resour Crop Evol*, 65, 1195–1215.

Cañas, G., Arango, R., & Saldamando, C. (2019). Microsatellites revealed genetic diversity and population structure in Colombian avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm collection and its natural populations. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 11(4), 106–119. <https://doi.org/10.5897/jpbcs2018.0792>

Carmen, D. V., & Fulton, T. (2003). Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. *International Plant Genetic Resources Institut*.

Carr, M. K. V. (2013). The water relations and irrigation requirements of avocado (*Persea americana* Mill.): A REVIEW. *Experimental Agriculture*, 49(2), 256–278. <https://doi.org/10.1017/S0014479712001317>

Chil, I., Molina, S., Ortiz, L., Dutok, C. M. S., & Souto, R. N. P. (2019). State of the Art of the specie *Persea americana* Mill (avocado). *Amazonia Investiga*, 8(21), 73–86.

Cooperacion Financiera Nacional. (2020). *FICHA SECTORIAL: OTROS CULTIVOS DE FRUTAS TROPICALES Y SUBTROPICALES*. <https://www.cfn.fin.ec/wp->

content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-4-trimestre-2020/FS-Otros-Cultivos-de-Frutas-Tropicales-y-Subtropicales-4T2020.pdf

DNA GENOTEK. (2012). *Protocolo de laboratorio para purificación manual de ADN a partir de una muestra de 0,5 mL* (Vol. 1, Issue 1). www.dnagenotek.com

Galindo, E., Arnulfo, P., Alejandre, J., Leyva, O., Torres, I., Hilda, L., & Murguía, J. (2011). Relaciones genéticas del aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios del centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3), 339–346. www.redalyc.org/articulo.oa?id=93920942010

Galindo, M., Ogata, N., & Arzate, A. (2007). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 441–450. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9250-5>

García, A. (1975). Cytogenetic Studies in the Genus *Persea* (Lauraceae). I. Karyology of Seven Species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17(2), 173–180. <https://doi.org/10.1139/g75-023>

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/431487>

Gross-German, E., & Viruel, M. (2013). Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity, population structure, and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 539–555. <https://doi.org/10.1007/s1295-012-0577-5>

- Hernández, A., & Trejo, F. de M. (2014). Estudio genético poblacional de frecuencias alélicas para 15 marcadores str presentes en la población del estado de zacatecas aplicado a la práctica forense. *Archivos de Medicina*, 10(1), 1–24.
<https://doi.org/10.3823/1209>
- Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. (2000). *Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe* (H. Knudsen (ed.); Primera).
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2014). *Aguacate*. Cultivos.
<http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/raguacate#:~:text=El cultivo de aguacate se,picos de producción y cosecha>
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2021). *Información meteo e hidro | PRODUCTOS Y SERVICIOS INAMHI*.
<https://inamhi.wixsite.com/inamhi/novedades>
- Juma, I., Geleta, M., Nyomora, A., Saripella, G., Hovmalm, H., Carlsson, A., Fatih, M., & Ortiz, R. (2020). Genetic diversity of avocado from the southern highlands of Tanzania as revealed by microsatellite markers. *Hereditas*, 157(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s41065-020-00150-0>
- Karlik, E., & Tombuloğlu, H. (2016). Molecular Markers and Their Applications. *Plant Omics: Trends and Applications*, 7, 137–157. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8_6
- Lahav, E., & Lavi, U. (2009). Avocado genetics and breeding. *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, 247–285. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7_8
- Li-cor Technical Support. (2012). *Applications Manual Model 4300 DNA Analyzer*.
<http://licor.com/bio/distributors>

Liu, Y., Ge, Y., Zhan, R., Lin, X., Zang, X., Li, Y., Yang, Y., & Ma, W. (2020). Molecular markers and a quality trait evaluation for assessing the genetic diversity of avocado landraces from china. *Agriculture (Switzerland)*, 10(4).

<https://doi.org/10.3390/agriculture10040102>

Ministerio Coordinador de Producción, E. y C., Pro ecuador, & Ministerio del Comercio Exterior. (2020). *Proyectos del Sector Agroindustrial*.

Montoya, C., Arias, F., & Velasquez, O. (2018). Dinámica Mundial de aguacate. *Revista Virtual*, 22–35.

<https://revistavirtual.ucn.edu.co/index.php/RevistaUCN/article/view/994/1442>

National Human Genome Research Institute. (2021). *Alelo*.

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Alelo>

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2021-2030*. OECD. <https://doi.org/10.1787/22184376>

Páramos, P., Granjo, J., Corazza, M., & Matos, H. (2020). Extraction of high value products from avocado waste biomass. *Journal of Supercritical Fluids*, 165.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104988>

Pérez, S., Ávila, G., & Coto, O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36(2), 111–123. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19879.55200>

Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.

<https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

Rimieri, P. (2017). La diversidad genética y la variabilidad genética: Dos conceptos

- diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *Journal of Basic and Applied Genetics*, XXVIII(2), 7–13. https://sag.org.ar/jbag/wp-content/uploads/2019/11/A1_7-13-2.pdf
- Ruiz, J. A., Berdúo, J. E., Kalousova, M., Lojka, B., Fernández, E., Žiarovská, J., & Sánchez-Pérez, A. (2020). Diversidad genética de materiales nativos de aguacate guatemalteco a través del marcador molecular AFLP. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 7(2), 155–169. <https://doi.org/10.36829/63cts.v7i2.746>
- Russell, A., Samuel, R., Rupp, B., Barfuss, M. H. J., Šafran, M., Besendorfer, V., & Chase, M. W. (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, 59(2), 389–404. <https://doi.org/10.1002/tax.592005>
- Salazar, R., Rios, D., & Torres, R. (1971). SELECCION DE VARIEDADES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.) EN COLOMBIA. *Instituto Colombiano Agropecuario*, 6, 357–377. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/23165>
- Sandoval, E., Peraza, A., Dodd, R., Ashworth, V., Cruz, A., & Calderón, C. (2021). Exploring genetic diversity of lowland avocado (*Persea americana* Mill.) as a genetic reservoir for breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01238-w>
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *PRISM*, 18(February), 1–2.
- Sistema de Información Pública Agropecuaria. (2021). *Informe de cifras agroproductivas*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Tzintzun, O., Sánchez, L., Minchaca, A., Rosales, L. M., Hernández, A., & Martínez, A.

(2016). Development of bacterial culture medium from avocado seed waste.

Revista Mexicana de Ingeniera Quimica, 15(3), 831–842.

<https://doi.org/10.24275/rmiq/alim1046>

Viera, W., Ponce, L., Morillo, E., & Vasquez, W. (2016). Genetic Variability of Avocado

Germplasm for Plant Breeding. *International Journal of Clinical and Biological*

Sciences, 1(1), 23–24.

<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>

Weir, B., & Cockerham, C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population

Structure. *Evolution*, 38(6), 1358. <https://doi.org/10.2307/2408641>

Capítulo 8: Anexos