

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.) DE LOS VALLES INTERANDINOS DEL ECUADOR.

Ponce, L. Morillo, E¹. Viera, W². Jadán, M³. Romero, P⁴.

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* M.) debido a sus valiosas características como sabor, alto rendimiento, calidad y demanda se ha convertido en un producto con alto interés. Por esta razón, en la presente investigación se realizó un estudio de la variabilidad genética en este frutal. Se caracterizó molecularmente 18 muestras de aguacate de tipo Nacional recolectadas en los valles Interandinos del Sur del Ecuador y 182 de la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, determinándose la diversidad y estructura genética. Además, se efectuó el análisis global con 48 materiales de tipo Nacional de los Valles del Centro-Norte. Se utilizó 10 microsatélites mediante la técnica M13-Tailing. Las muestras fueron genotipadas en el analizador de ADN LI-COR 4300.

Se determinó la falta de estructura genética en aguacate con el análisis de similitud UPGMA y un análisis de coordenadas principales PCO. El análisis global reveló que las colectas de materiales de tipo Nacional en 6 provincias de los Valles Interandinos del Ecuador, muestran una diferencia genética de 4%, mientras que en comparación con los materiales introducidos de la colección de trabajo del INIAP presentan una diferencia genética del 17%.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, la producción de aguacate (*Persea americana* M.) ha dejado de ser un cultivo de producción netamente nacional para convertirse en un producto con alto potencial de exportación (CORPEI, 2009) debido a sus valiosas características, como son sabor, alto rendimiento, calidad y capacidad de producción en todo el año (Silva & Sánchez, 2009). Las zonas productoras en los Valles Interandinos se encuentran en las

provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay y Loja (Vásquez & Viteri, 2012). Casi la totalidad de la producción ecuatoriana tiene como destino Colombia, que el 2005 captó el 93.27% del total exportado, mientras que Estados Unidos es el segundo destino para la exportación con un mercado inferior (6.62%) y finalmente, Italia y España con 0.10 y 0.01% respectivamente, completan el portafolio de destinos de exportación del aguacate por parte de Ecuador (Silva & Sánchez, 2009).

¹ Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) – Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

² Programa de Fruticultura (Granja Experimental Tumbaco) - Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

³ Laboratorio de Cultivo de Tejidos - Universidad de las fuerzas Armadas – ESPE

⁴ Docente de la Carrera de Biotecnología – Universidad de las fuerzas Armadas – ESPE

Actualmente se tiene una creciente preocupación por la conservación de la diversidad biológica y la sustentabilidad agrícola, por lo tanto, la preservación y utilización de los recursos fitogenéticos han sido aspectos importantes para mantener esta diversidad. En el Ecuador existe una buena variedad de cultivares de aguacate (nacionales y comerciales), que podría ser aprovechados para realizar selección en cuanto a tolerancia en varios aspectos fitosanitarios y de calidad de fruta. Sin embargo la deforestación y los cambios de copa, están causando erosión genética adicionalmente a la influencia de nuevas variedades (Vásquez, 2012. Comunicación personal). En las últimas décadas en los huertos de la sierra ecuatoriana, los cultivares Nacionales han sido remplazados por variedades comerciales de mayor rendimiento, como el cultivar Hass y Fuerte/Guatemalteco debido a su alta demanda en el mercado nacional e internacional. La producción de dichos cultivares comerciales ha aumentado de 0 ha a 500 ha aproximadamente los últimos 4 años (Vásquez, 2012. Comunicación personal).

Esta variabilidad existente en las plantaciones de aguacate se debe a que son monoico hermafrodita dicogámicos, es decir, posee flores macho y hembra a la vez pero no maduran al mismo tiempo. Cada flor se abre en diferente estado, los órganos femeninos y masculinos son funcionales en diferentes tiempos, de manera que no pueden fecundarse a sí mismas (Food and Agriculture Organization of the United Nations (F.A.O), 1990). Por esta razón, es necesario que tengan cerca otro aguacate de una variedad distinta, cuyas floraciones no coincidan, sino que sean complementarias. El uno un día florece como hembra y el otro como macho, de esta manera no hay autofecundación y el intercambio genético se produce por fecundación cruzada (Vásquez, Rodas, & Gonzalo, 2005).

Las relaciones genéticas del aguacate han sido analizadas con diversos marcadores moleculares: RFLPs (Furrier, Cummings, & Clegg, 1990), minisatélites y microsátélites (Ashworth, Kobayashi, De la Cruz, & Clegg, 2004); (Schnell, Brown, & Olano, 2003) y RAPDs (Fielder, Buffer, & Bangerth, 1998). Estos estudios han

mostrado una complejidad genética, debido a que el aguacate al ser una especie con polinización abierta facilita la segregación genética y por ende una gran variabilidad (Sánchez, 1999), a su vez la selección y los múltiples cruzamientos entre las distintas variedades no han permitido la formación de grupos definidos con material genético semejante sino que las diferencias entre estos sean mayores. (Galindo & Milagro, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron (50 gr) hojas jóvenes de cada árbol, de 20 materiales de la zona austral de Ecuador (los mismos que fueron colectados para la conservación en el banco de germoplasma del INIAP) y de 214 árboles de los 32 ecotipos presentes en colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco.

Las hojas jóvenes de aguacate fueron recolectadas con pinzas y tijeras previamente desinfectadas con alcohol 75%. Se guardaron y deshidrataron en fundas plásticas Ziploc con sílica gel (100 gramos).

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de biología molecular del Departamento Nacional de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Para la extracción del ADN a partir de las muestras secas, se utilizó el protocolo de extracción de ADN de Ferreira & Grattapaglia (1998), modificado por Morillo & Miño (2011). La integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, y se visualizó en un transiluminador ultravioleta. La cuantificación del ADN se realizó en el espectrofotómetro Epoch™ de BioTek. Las muestras de ADN se diluyeron a 5 ng/μL, para la amplificación del ADN. Para la validación se empleó el primer AV1 (Ashwort *et al.*, 2004), con el coctel de reacción de PCR detallado en la tabla 1.1, utilizando el programa de la tabla 1.2 en el termociclador PTC-200.

Tabla 1.1: Coctel de amplificación de PCR de microsatélites empleado para el proceso de validación (Morillo & Miño, 2011)

Reactivo	Volumen
DNA (5 ng/μl)	2,00 μl
MgCl ₂ (25 mM)	0,60 μl
Buffer Gotaq (5X)	1,50 μl
dNTP's (5 mM)	0,38 μl
Primers F (10 μM)	0,375 μl
Primer R (10 μM)	0,375 μl
Taq polimerasa 5 U/μl	0,10 μl
Agua ultrapura	2,17 μl
Total	7,5 μl

Tabla 1.2: Programa de amplificación utilizado en el termociclador (Morillo & Miño, 2011).

	Temperatura °C	Tiempo	
<i>Ciclo inicial de denaturación</i>	94	5 min	30 ciclos
<i>Denaturación cíclica</i>	94	45 seg	
<i>Anillamiento</i>	De acuerdo al primer	1 min	
<i>Elongación cíclica</i>	72	2 min	
<i>Ciclo final de elongación</i>	72	7 min	
<i>Estabilización</i>	10	5 min	

Para la amplificación de todas las muestras con los 10 primer con el método M13-tailing los cuales fueron reportados por Ashworth *et al.* (2004), se utilizó el coctel de reacción para PCR que se detalla en la tabla 1.3, utilizando el programa de la tabla 1.5 en el termociclador PTC-200.

Tabla 1.3: Coctel para amplificación de microsatélites-M13 individuales (Morillo & Miño, 2011)

Reactivo	Volumen
DNA (5 ng/μl)	2,00 μl
MgCl ₂ (25 mM)	0,50 μl
Buffer Gotaq (5X)	1,00 μl
dNTP's (5 mM)	0,20 μl
M13 -700/800 (1 μM)	0,80 μl
Primers F-M13 (1 μM)	0,05 μl
Primer R (10 μM)	0,08 μl
Taq polimerasa 5 U/μl	0,05 μl
Agua ultrapura	0,32 μl
Volumen final	5,00 μl

Tabla 1.3: Programa de amplificación con microsatélites mediante la técnica M-13 tailing (Morillo & Miño,

	Temperatura °C	Tiempo	
<i>Ciclo inicial de denaturación</i>	94	2 min	25 ciclos
<i>Denaturación</i>	95	4 min	
<i>Denaturación cíclica</i>	95	1 min	
<i>Anillamiento</i>	50-68	2 min	
<i>Elongación cíclica</i>	72	2 min	
<i>Ciclo final de elongación</i>	72	10 min	
<i>Estabilización</i>	4	min	

2011)

Para el genotipaje primero se creó un proyecto en el software SAGA-GT Microsatellite llamado Aguacate, en este se detalló la información de cada primer como la talla, el canal en el que amplifican (700-800 nm), el rango del tamaño de bandas, los dúplex formados y se ubicó de

antemano la posición que tuvo cada pocillo del gel con la muestra de aguacate.

El gel de acrilamida compuesto de 20 ml de KB Gel Matriz Plus 6.5%, 150 µl de APS (Persulfato de amonio) al 10 % y 15 µl de Temmed (Tetramethylethylene- dianime al 99%) se colocó entre las placas de vidrio del LI-COR 4300 y se ubicó el peine, después de 1 hora de polimerización del gel se colocó en el LI- COR 4300 con el buffer TBE 1X (Tris-Borate-EDTA) KB Plus LI-COR. Antes de empezar a cargar se realizó una pre-corrída de 25 min a 1500 V para enfocar el focus del láser a 700 y 800 nm. Por último se cargó 0.8 µl de los productos amplificados los cuales fueron previamente diluidos con Blue Stop Solution LI-COR en una relación 1:1 y denaturados a 94 °C por 5 min, se inició la corrida a 1500 V por 1 hora y media. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el IRDye 30-350 bp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de diversidad genética revelaron un total 110 alelos en los 10 locus, con un promedio de 11 alelos/locus. El locus AV5 fue el más polimórfico. El PIC reportado fue de 0,73, la heterocigosidad esperada de 0,77 y la Heterocigosidad observada de 0,65, siendo indicadores de la alta diversidad genética.

La heterocigosidad observada (H_0) para los materiales caracterizados de los valles interandinos del centro-sur fue de 0,64 mientras que la heterocigosidad esperada (H_e) fue de 0,74; resultados que concuerdan con los datos obtenidos de la caracterización de los valles interandinos del centro-norte (Urgilez, 2012); en el cual se obtuvo una heterocigosidad observada de 0.65 y una heterocigosidad esperada de 0.77; valores que nos indican una alta diversidad genética entre las muestras de aguacate, y de lo cual podemos decir que existe mayor variabilidad en los valles interandinos del norte, debido a que se colectó en más provincias (Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua), respecto al centro-sur (Azuay, Pichincha y Loja).

El contenido de información polimórfica (PIC) promedio para los 10 marcadores microsatélites utilizados fue de 0.70, este valor depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias, el valor promedio para la caracterización de los valles interandinos del centro-norte fue de 0,73. El locus con mayor polimorfismo tanto para el centro-norte como para el centro-sur fue el AV2 con un valor de 0,90; mientras que en el presente estudio el Locus AV10 no fue muy informativo presentando un PIC 0.37, para el estudio de diversidad genética del norte el locus AV4 con un PIC de 0.52 fue el menor valor. Los locus con un PIC mayor 0,5 revela que existe heterocigosidad, y estos locus son muy polimórficos e informativos para detectar variabilidad genética.

De acuerdo al análisis de agrupamiento UPGMA detallado por cultivares podemos decir que debido a la polinización cruzada que posee el aguacate no se estructuraron genéticamente (Figura 1.1), es decir no se conformaron grupos claramente definidos pero se puede observar que los materiales colectados (AG) se agrupan con los materiales nacionales (origen mexicano); por lo cual se puede deducir que los árboles colectados son materiales nacionales. Asworth y Clegg (2003) citado por (Galindo & Milagro (2011) mencionan que debido a la gran variabilidad fenotípica y a los híbridos entre las diferentes variedades de aguacate, la identificación de genotipos mediante microsatélites ha resultado ambigua, por lo que ha sido difícil designar la composición racial.

De acuerdo con Ashworth y Clegg (2003), las condiciones de agrupamiento de los materiales de aguacate, se explica por la complejidad del estado híbrido de los aguacates, debida a la hibridación de la especie de los diferentes ecotipos raciales, la domesticación del mismo (Galindo & Milagro, 2011), la dicogamia y el flujo genético; lo que ha dado como resultado una gran diversidad de genotipos, visible por los individuos de esta investigación.

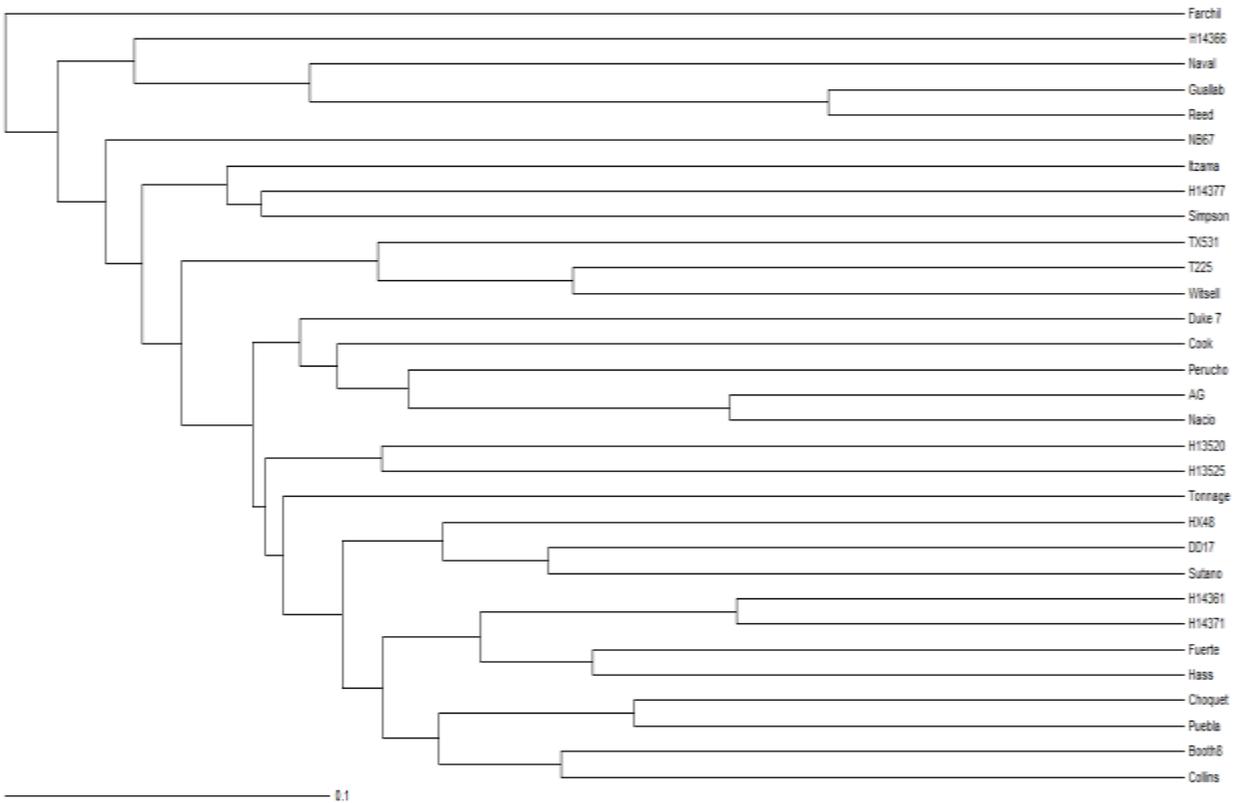


Figura 1.1: El dendograma formado a partir de la matriz de distancia de Jaccard las diferentes variedades de aguacate obtenido del software PowerMarker, en color verde se distinguen los dos grupos formados.

En la figura 3.21 se representa el análisis de coordenadas principales de la colección, donde se puede distinguir que los materiales de tipo Nacional colectados están agrupados en la coordenada 1, mientras que los materiales de la colección de trabajo con materiales introducidos, que se encuentra en Pichincha (Granja Experimental Tumbaco - INIAP), se encuentran formando un pool genético con la mayor parte de la diversidad genética.

En análisis de componentes principales global de las 6 provincias de los valles interandinos se distingue un agrupamiento de las provincias donde se realizó las colectas de materiales de tipo Nacional, mientras que los materiales que se encuentran en la colección de germoplasma de aguacate del INIAP (Pichincha) difieren de los colectados, esto es debido a que en la colección se encuentran materiales introducidos, los cuales difieren genéticamente (**Figura 1.2**).

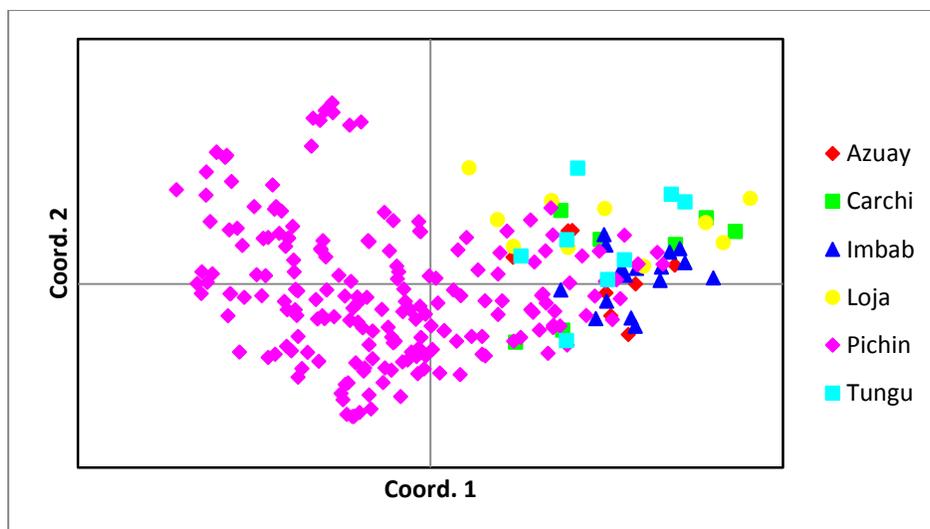


Figura 1.1: Analisis de conglomerados por provincias

La identificación de las localidades es útil para desarrollar los programas de mejoramiento genético y manejo de recursos genéticos. Las poblaciones que mostraron el mayor distanciamiento genético fueron Pichincha y Tungurahua, considerándose candidatas convenientes en cruza dirigidas.

Los datos obtenidos del AMOVA se resumen en la tabla 3.15 mostrando una diferenciación de 17% procedentes de las diferentes provincias, y el 83% de la variación observada entre individuos (Figura 3.22). Estos resultados se deben a las diferencias genéticas que hay en la colección de trabajo de aguacate debido a materiales introducidos de otros países.

Tabla 1.1: Resultados del análisis molecular de varianza global

Origen	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Est. Var.	% de variación genética
Entre provincias	5	201.188	40.238	1.806	17%
En las provincias	242	2204.606	9.110	9.110	83%
Total	247	2405.794		10.916	100%

CONCLUSIONES

La caracterización molecular de 200 muestras de aguacate mediante la utilización de diez microsatélites, reveló una riqueza alélica de 111 locus de lo que se obtiene un promedio de 11 alelos/locus.

La diversidad genética o heterocigosidad esperada 0.74, indican que los microsatélites seleccionados forman un conjunto de gran

utilidad informativa para la caracterización de germoplasma de aguacate.

El AMOVA para los materiales colectados de tipo Nacional de la región Centro-Norte y Sur dieron un 4% de variabilidad genética. Por otro lado AMOVA el valor de variación entre provincias fue del 17% siendo este un valor alto, por lo tanto la diversidad genética del aguacate es debida a los

31 ecotipos presentes en la Colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco.

El análisis de similitud para la elaboración del dendograma UPGMA detecto la presencia de duplicados (clones) en la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco del INIAP, los cuales son materiales injertos de la misma planta.

BIBLIOGRAFÍA

Alcaraz, M., & Hormaza, J. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*, (p. 144: 244_253). Lund, Sweden.

Alfonso, J. (2008). Manual técnico del aguacate Hass (*Persea americana* L.). Fundación hondureña de investigación agrícola, 9.

Ashworth, V., & Clegg, M. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. (J. L. Hamrick, Ed.) *The journal of heredity*, 410.

Ashworth, V., Kobayashi, M., De la Cruz, M., & Clegg, M. (2004). Microsatellites markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horti*, 101:255-267.

Barrientos, A., & López, L. (1998). Historia y genética del Aguacate. Obtenido de http://www.avocadosource.com/Journals/CICTA_MEX/CICTAMEX_1998/cictamex_1998_33-51.pdf

Berg, B., & Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the avocado. (Y. 70, Ed.) 135-146.

Bonilla, V. (2010). Caracterización molecular de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) conservada en el banco nacional de germoplasma del INIAP-Ecuador. Quito: Escuela Politécnica del Ejército.

Casaca, A. (2005). El cultivo de Aguacate. Recuperado el 01 de Mayo de 2012, de <http://www.zamorano.edu/gamis/frutas/aguacate.pdf>

Colombo, C., Second, G., Losada, T., & Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*manihot esculenta* Crantz) RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 21, 105-113.

CORPEI. (2009). Perfil de aguacate. En *Perfiles de producto* (pág. 3). Ecuador.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). (2008). *Tecnología para el Cultivo del Aguacate*. Colombia: Produmedios.

Coto, O., Fuentes, J., Machado, M., Álvarez, A., Rodríguez, N., Santiago, L., . . . Valdés, Y. (2007). Aplicación de biotecnologías al mejoramiento del aguacatero en Cuba. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate*, (pp. 12-16). Viña del Mar-Chile. Retrieved from <http://www.avocadosource.com/WAC6/es/Extension/1c-44.pdf>

Crane, J., Balerdi, C., & Maguire, I. (2006). *Cultivo del aguacate en los jardines de Florida*. University of Florida, 11.

Del Villar, J., & Reynoso, G. (2010). Caracterización molecular mediante la técnica de microsatélites de dos materiales genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivados en la República Dominicana. República Dominicana: Universidad ISA.

Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas. *Agronomía Mesoamericana*(17), 221-234.

Díaz, J. (1997). *Historia del Aguacate*. España: Ediciones Eilea.

Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético*. (N. J. Fernández, A. Sánchez, & L. Rodríguez, Trans.) Brasilia: EMBRAPA-CERNAGEN.

Fielder, J., Buffer, G., & Bangerth, F. (1998). Genetic relations of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphítica*, 249-255.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (F.A.O). (1990). *Producción Postcosecha y comercialización de Paltas*. En P. Undurraga, A. De Kartzow, H. Soto, & X. Feito (Ed.), *Curso Internacional*. Chile.

Furier, G., Cummings, M., & Clegg, M. (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction site variation. *Hered*.

Galindo, M., & Milagro, P. (2011). GENETIC RELATIONSHIPS WITHIN AVOCADO (*Persea americana* Mill.) IN SEVEN MUNICIPALITIES OF CENTRAL VERACRUZ, CHARACTERIZED USING

MICROSATELLITE MARKERS. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 4.

Gentry, A. (1979). Taxonomic implications of Bignoniaceae palynology. *Missouri Bot*, 756-777.

Gutiérrez, A., Martínez, J., Gracia, E., & Iracheta, L. (2009). Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 9-18.

Hajeer, A. (2000). SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. (J. Worthington, & S. John, Edits.) *Biotechniques: Molecular laboratory methods series*.

Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). (1995). *Descriptores para aguacate (Persea spp.)*. Roma, Italia.

Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). (2003). *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. En T. Franco, & R. Hidalgo (Edits.). Cali, Colombia.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2007). *Estudio de la Cadena Agroalimentaria de Aguacate en la República Dominicana*. Secretaría de Estado de Agricultura (SEA), 59.

Larios, A., I, V., Tapia Vargas, L., Gillén, H., Villaseñor, M., & M, M. (2011). *Avances en la Caracterización Morfológica de Progenies de Aguacate Criollo en Michoacán*. VII Congreso Mundial del Aguacate, 2.

Lemus, G., Ferreira, R., Gil, P., Sepúlveda, R., Maldonado, P., Toledo, C., Cledón, J. (2010). *El Cultivo del palto*. Instituto de investigaciones agropecuarias, 80.

León, J. (1999). *Manual del cultivo de aguacate (Persea americana) para los valles interandinos del Ecuador*. INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, 9-13.

LI-COR Biosciences. (12 de 05 de 2012). *Biotechnology, Advanced Discovery with*. Obtenido de www.licor.com/bio/applications/applications.jsp

Lira, A. (2003). *Fisiología Vegetal*. México: Trillas.

Litt, M., & Luty, J. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the

cardiac muscle actin gene. *Human Genetic*(44), 398-401.

Liu, J., & Muse, S. (2005). *PowerMarker V3.0 Manual*. 2128-2129.

Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, E., Lahav, J., Hillel, C., & Degani, U. (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical Applied Genetics*, 94:279-286.

Montañez, B. (2009). *Efecto de la micorrización en plantas de aguacate (Persea americana L.) durante la fase de vivero en suelos provenientes de los Llanos Orientales*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Morillo, E., & Miño, G. (2011). *Marcadores moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP*. In E. E. Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:3321-3323.

Nei, M. (1987). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.

Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. (2012). *FAOSTAT*. Obtenido de <http://faostat.fao.org/>

Peakall, R., & Smouse, P. (2005). *GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population*.

Pérez de Castro, A. M. (2010). *Reacción en cadena de la polimeraza (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

Piñero, D. (2008). *La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México*. Conocimiento actual de la biodiversidad. I, págs. 437-494. México: Conabio.

Pita, S., & Pértega, S. (2001). *Relación entre variables cuantitativas. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística*, 6-8.

Rodríguez, N., Rohde, W., González, C., Ramírez, I., Fuentes, J., Román, M., Velázquez, J. (2003). *Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de*

cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. V Congreso Mundial del Aguacate, (pp. 47-53). La Habana.

Sánchez Collín, S., Mijares Oviedo, P., López, L., & Barrietos, A. (2001). Historia del aguacate en México. México.

Sánchez, J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo*, 7-18.

Schnell, R., Brown, C., & Olano, E. (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellites markers. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 881-889.

Silva, V., & Sánchez, A. (2009). Estudio de la factibilidad, producción y comercialización del aguacate y sus derivados. Tesis, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ciencias Humanísticas y Económicas, Guayaquil.

Urgilez, A. (2012). "Análisis de la diversidad genética del aguacate (*Persea americana*), cultivado en las zonas productoras de los Valles del Norte de la Sierra Ecuatoriana mediante marcadores moleculares Microsatélites". Tesis por publicar, Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Sangolquí- Ecuador.

Vásquez, J., Rodas, L., & Gonzalo, L. (2005). Identificación de aguacate nativo y formación de jardines clonales con aguacate nativo seleccionado. Quito-Ecuador.

Vásquez, W., & Viteri, P. (2012). Situación de aguacate en la Sierra del Ecuador. Quito-Ecuador: Programa de Fruticultura – Granja Exp. Tumbaco.

Velasco, R. (10 de Febrero de 2005). Marcadores moleculares y extracción de ADN. Obtenido de Unicauca: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art32.pdf>

Velásquez, J. (2006). Identificación del aguacate como un rubro importante de grande oportunidades comerciales, según los acuerdos de integración, los nuevos tratados comerciales y el comercio mundial globalizado. Secretaria de la productividad y competitividad-Gobernación de Antioquia, 5-102.

Vizcaíno, D. (2011). Propagación clonal de aguacate duke 7 (*persea americana* mill.) mediante la técnica de etiología de brotes o cultivo in vitro. Tesis, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí-Ecuador.

Wu, H., Chou, C., Chang, T., & Chen, I. (2007). Estimación de la relación genética de cultivares de aguacate de Taiwán por los componentes volátiles de las hojas. VI Congreso Mundial del Aguacate, (pp. 1-14). Viña del Mar-Chile.

Yáñez, V. O. (2002). Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote. (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Departamento de Ciencias Biológicas, Lima-Perú.

Zentmyer. (1998). Avocado. (R. Ploetz, G. Zentmyer, W. Nishijima, k. Rohrbach, & H. Ohr, Edits.) *Compendium of Tropical Fruit Diseases*, 71.