

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA
DEL AGUACATE (*PERSEA AMERICANA* MILL.) DE LOS
VALLES INTERANDINOS DEL ECUADOR**

PREVIA LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

LIZ ALEJANDRA PONCE MORALES

SANGOLQUÍ, 09 DE OCTUBRE DEL 2013

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

LIZ ALEJANDRA PONCE MORALES

DIRECTORA DE LA CARRERA EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

MSc. María Augusta Chávez

SECRETARIO ACADÉMICO

AB. Carlos Orozco

Sangolquí, 09 de octubre del 2013

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. LIZ ALEJANDRA PONCE MORALES como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí,

DIRECTOR
MSc. Mónica Jadán

CODIRECTOR
Ing.-Mat Pedro Romero

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Caracterización de la variabilidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill.)”, realizado por la egresada Liz Alejandra Ponce Morales, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el proyecto Senescyt PT-11-EESC-034: “Fortalecimiento de la investigación y producción de aguacate para la seguridad alimentaria de las familias de la sierra ecuatoriana” y el proyecto 527-025: “Fortalecimiento Institucional” del INIAP, se deja en libertad de la autora y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Liz Alejandra Ponce Morales que lo entregue a la Ing. Grace Tatiana Páez. M. C, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

María Augusta Chávez MSc.
COORDINADOR DE CARRERA

Dr. Eduardo Morillo
DIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Liz Alejandra Ponce Morales

Declaro que:

El proyecto de grado **CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.) DE LOS VALLES INTERANDINOS DEL ECUADOR**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí,.

LIZ ALEJANDRA PONCE MORALES

AUTORIZACIÓN

Yo, Liz Alejandra Ponce Morales

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.) DE LOS VALLES INTERANDINOS DEL ECUADOR**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí,

LIZ ALEJANDRA PONCE MORALES

DEDICATORIA

“La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante”.
Paulo Coelho

Porque ese sueño sembraron ustedes, dedico todo mi trabajo y esfuerzo a mis padres, Martha y Arturo, les amo.

Liz

AGRADECIMIENTO

A mi Dios, mi creador, Jehová, que me ha dado todo y jamás me ha desamparado.

A mis padres que con su apoyo, amor y confianza han logrado que llegue a cumplir mis metas, gracias Marthy porque me has enseñado a ser perseverante, luchar por lo que anhelo, porque gracias a tu sabiduría has levantado todas mis caídas, gracias Arturo, mi cariñoso, mi amigo, mi apoyo, gracias por confiar en mí y ser el impulso de todas mis luchas.

A mi hermana Kossy, que has sido mi compañía y mi apoyo, mi complice, porque aunque eres la menor me has enseñado tanto, gracias por llorar y reír conmigo, por disfrutar conmigo tu vida, y estar presente a lo largo de esta carrera.

Expreso mis sinceros agradecimientos al Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias -INIAP, el cual por medio del proyecto 527-025: “Fortalecimiento Institucional” facilitaron la ejecución y el financiamiento en contraparte de este estudio.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación – SENESCYT, el cual financió el proyecto PT-11-EESC-034: “Fortalecimiento de la investigación y producción de aguacate para la seguridad alimentaria de las familias de la sierra ecuatoriana”, motivo de esta investigación.

Al Departamento Nacional de Biotecnología (DNB), por medio del Dr. Eduardo Morillo, jefe del Departamento, por permitirme la ejecución de esta tesis, por su guía y ayuda en todo momento.

Al Programa de Fruticultura de la Granja Experimental Tumbaco, al Dr. Wilson Vásquez, jefe del Departamento, por la confianza depositada en mí para este proyecto, por su ayuda y paciencia.

Al Ing. William Viera que a lo largo de la realización de esta tesis me brindó su apoyo incondicional, por su guía y por ser parte importante de la realización de este trabajo.

A los colaboradores de departamento de Recursos Fitogenéticos del INIAP por su guía, al Ing. Álvaro Montero y al Ing. Ricardo Andrade.

A mi querida Escuela Politécnica del Ejército, a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

A mi estimada Directora Msc. Mónica Jadán quien fue la persona, por la cual inicie y finalice este trabajo, muchísimas gracias por todo.

A mi Codirector de tesis Ing. Pedrito Romero gracias por su guía, su apoyo y todo el aporte para el desarrollo de esta investigación.

A Zule y Santy, por su apoyo, estuvieron ahí en las buenas y en las malas, gracias por su compañía, por su bondad y su cariño, son una parte importante de mi vida. A mi muñeca Emi que con sus locuras alegro mis días de estrés.

Como no agradecerte Sole, si eres como una hermana para mí, gracias por tus consejos, por tus palabras de aliento, por ti también estoy aquí muchas gracias.

Quiero agradecer a mis amigas, mis compañeras, mis princesas hermanas incondicionales, les adoro, gracias por ayudarme en todo momento Mire (mi churona), Vero (mi debora), Jess (la madre), Alex (la negra), Danny (la reinita).

A Gabo que con su cariño formo parte de esta carrera, parte de mi vida y ahora parte de mis recuerdos, gracias en donde estés.

A mis compañeros del labo Jose, Migue, Andreita, Elenita, Dianita, Danny, seño Marisita, seño Geito, gracias por sus consejos, el apoyo y las risas. Con mucho cariño; gracias Sory por su amistad, Katty por sus consejos, Joha por ser nuestra maestra y ayudarme en todo momento, Naty muchísimas gracias porque me enseñaste tantas cosas, pero más que eso por tu linda amistad, porque esas largas conversaciones hicieron que todo el trabajo sea más fácil.

A mis compañeros del departamento de fruticultura Vivi, Anita, Andre, Paúl, David.

A mis queridos amigos de la U, gracias Pacito, Marmotito, Hopis, Mabelita, Solcito, Marlon, Lobo, en realidad han sido personas muy importantes en mi paso por la universidad, les agradezco por su ayuda.

Finalmente quiero agradecer a la persona que estuvo al final de esta carrera pero fue un pilar muy importante para su culminación, gracias por apoyarme, insistirme, por guiarme, por compartir conmigo tu sabiduría, por brindarme tu amor, tu apoyo, por ser mi compañía y mi alegría, Emiliano.

A todas las personas que pusieron su granito de arena o de alegría en el trascurso de mi carrera. Gracias les llevaré siempre en mi corazón.

Liz

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INIAP:	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
g:	Gramos.
ml:	Mili litro.
µl:	Micro litro.
pb:	Pares de bases.
°C:	Grados centígrados.
pH:	Potencial hidrógeno.
min:	Minutos.
s:	Segundos.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
TAE:	Tris-Acetato EDTA
TE:	Tris-EDTA
TRIS:	Tris-Borate-EDTA
CIA:	Cloroformo-alcohol isoamílico
SSRs:	Secuencias simples repetidas, del inglés <i>Simple Sequence Repeat microsatellites</i>
PCR:	Reacción en cadena polimerasa.
PIC:	Contenido de información polimórfica

UPGMA: Agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas, de inglés *Unweighted Paired Grouping Method with Arithmetic Averages*.

PCO: Análisis de coordenadas principales

AMOVA: Análisis molecular de varianza.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	II
CERTIFICACIÓN	III
CERTIFICACIÓN	IV
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	V
AUTORIZACIÓN	VI
DEDICATORIA.....	VII
AGRADECIMIENTO	VIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	XIII
LISTADO DE TABLAS	XVI
LISTADO DE FIGURAS.....	XVIII
LISTADO DE ANEXOS.....	XXI
RESUMEN	XXII
ABSTRACT	XXIII
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL AGUACATE (<i>PERSEA AMERICANA</i> MILL.)DE LOS VALLES INTERANDINOS DEL ECUADOR	
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación	4
1.3 Objetivos de la investigación	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Marco teórico.....	5
1.4.1 Aguacate	5
1.4.2 Origen y distribución del aguacate	5
1.4.3 Producción mundial	6
1.4.4 El aguacate en el Ecuador.....	6
1.4.5 Taxonomía.....	7
1.4.6 Descripción morfológica del árbol del aguacate	8
1.4.7 Valor nutritivo.....	11
1.4.8 Razas y variedades	12

1.4.9 Caracterización morfológica	16
1.4.10 Caracterización molecular.....	16
1.4.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
1.4.12 Analizador de ADN LI-COR 4300	19
1.5 Hipótesis de investigación	20
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1 Participantes.....	21
2.2 Fase I: Recolecta de material vegetal.....	21
2.3 Fase II: Caracterización molecular	22
2.3.1 Características del laboratorio	22
2.3.2 Recolección de muestras	22
2.3.3 Procesamiento de muestras	23
2.3.4 Extracción de ADN	23
2.3.5 Cuantificación de ADN en gel de agarosa	24
2.3.6 Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTek.....	24
2.3.7 Validación de ADN	25
2.3.8 Amplificación con microsatélites mediante la técnica M-13 tailing para genotipaje de las muestras de aguacate en el analizador LI-COR 4300	26
2.3.9 Genotipaje de las muestras de aguacate en el analizador genético LI-COR 4300	29
2.3.10 Análisis estadístico	30
2.3.11 Identificación de duplicados	35
2.4 Fase III: Caracterización morfológica	35
2.4.1 Características de la zona de estudio.....	35
2.4.2 Descriptores cualitativos y cuantitativos	36
2.4.3 Registro de Datos.....	36
2.4.4 Matriz básica de datos.....	36
2.4.5 Análisis estadístico	36

CAPÍTULO III: RESULTADOS	40
3.1 Colecta de material vegetal	40
3.2 Caracterización Molecular	41
3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN	41
3.2.2. Validación de ADN con el primer AV1	42
3.2.3 Pruebas de amplificación y “duplexaje” de SSR con la técnica M13 “ <i>tailing</i> ” para el analizador LI-COR 4300.	42
3.2.4 Genotipaje en el equipo LI-COR.....	44
3.2.5 Análisis Estadísticos	45
3.3 Caracterización Morfológica	68
3.3.1 Frecuencias de cada descriptor.....	71
3.3.2 Análisis de agrupamiento	88
3.3.3 Análisis de componentes principales.....	89
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	91
4.1 Caracterización molecular	91
4.1.1 Extracción de ADN	92
4.1.2 Cuantificación de ADN.....	92
4.1.3 Pruebas de amplificación y “duplexaje” de SSR con la técnica M13 “ <i>tailing</i> ” para el analizador LI-COR 4300.	92
4.1.4 Genotipaje en el analizador Licor 4300	93
4.1.5 Diversidad genética de aguacate	94
4.1.6 Estructura genética.....	96
4.1.7 Análisis global.....	98
4.2 Caracterización morfológica	100
4.2.1 Análisis de agrupamiento	101
4.2.2 Análisis de componentes principales.....	102
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	103
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	106
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	107
ANEXOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Diferencias morfológicas en las tres razas de aguacate.....	13
Tabla 2.1: Microsatélites empleado para el proceso de validación.....	25
Tabla 2.2: Coctel de amplificación de PCR de microsatélites empleado para el proceso de validación (Morillo & Miño, 2011)	25
Tabla 2.3: Programa de amplificación utilizado en el termociclador (Morillo & Miño, 2011).	26
Tabla 2.4: Microsatélites para el estudio de variabilidad genética de Aguacate (Ashworth & Clegg, 2004)	27
Tabla 2.5: Coctel para amplificación de microsatélites-M13 individuales (Morillo & Miño, 2011)	28
Tabla 2.6: Coctel de amplificación dúplex de microsatélites-M13 (Morillo & Miño, 2011)	28
Tabla 2.7: Programa de amplificación con microsatélites mediante la técnica M-13 tailing (Morillo & Miño, 2011).....	29
Tabla 3.1: Descripción de las localidades donde se colectaron accesiones aguacate Nacional en la Sierra Sur del Ecuador, 2012.	40
Tabla 3.2: Respuesta de los 10 primers a temperatura, peso molecular y fluorescencia en 9 muestras de aguacate.	44
Tabla 3.3: Frecuencias alélicas para el locus AV1	47
Tabla 3.4: Frecuencias alélicas para el locus AV2	48
Tabla 3.5: Frecuencias alélicas para el locus AV11	49
Tabla 3.6: Frecuencias alélicas para el locus AV3	50
Tabla 3.7: Frecuencias alélicas para el locus AV4	51
Tabla 3.8: Frecuencias alélicas para el locus AV9	52
Tabla 3.9: Frecuencias alélicas para el locus AV5	53
Tabla 3.10: Frecuencias alélicas para el locus AV7	55
Tabla 3.11: Frecuencias alélicas para el locus AV10	56
Tabla 3.12: Frecuencias alélicas para el locus AV12	57
Tabla 3.13: Parámetros de diversidad genética de las 200 accesiones de aguacate amplificadas.....	58

Tabla 3.14: Valores eigen obtenidos a partir del análisis de coordenadas principales de 200 materiales de aguacate analizados con 10 primers SSRs.....	63
Tabla 3.15: Resultados del análisis molecular de varianza global.....	65
Tabla 3.16: Resultados del análisis molecular de varianza entre la región centro-norte y sur.....	66
Tabla 3.17: Cálculo de parámetros F para 248 materiales de aguacate obtenidas del análisis de polimorfismo de 10 locus SSR.....	67
Tabla 3.18: Cálculos de distancia de Nei entre las seis provincias donde fueron recolectadas las muestras de aguacate.	67
Tabla 3.19: Representación de los clones determinados en el estudio.....	68
Tabla 3.20: Parámetros estadístico resumen de las 10 variables cuantitativas evaluadas en 32 ecotipos de aguacate en la Granja Experimental Tumbaco-INIAP.....	69
Tabla 3.21: Parámetros estadísticos de las 36 variables cualitativas evaluadas en 32 ecotipos de aguacate en la Granja Experimental Tumbaco-INIAP.	70
Tabla 3.22: Valores de los componentes principales (CP1 y CP2)	89

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Evolución de las exportaciones ecuatorianas de aguacate en los últimos años	7
Figura 1.2: Árbol de aguacate	8
Figura 1.3: Raíz de aguacate	9
Figura 1.4: Tallo cilíndrico del árbol de aguacate.....	9
Figura 1.5: Hojas de aguacate	10
Figura 1.6: Flores de aguacate	10
Figura 1.7: Fruto de aguacate “Duke 7”	11
Figura 1.8: Centros de origen de las 3 razas de aguacate.....	12
Figura 1.9: Esquema muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud.....	18
Figura 1.10: Ciclos de una reacción en cadena polimerasa.....	19
Figura 1.11: Ilustración de la detección de bandas en LI-COR 4300	20
Figura 3.1: Cuantificación ADN genómico de aguacate en geles de agarosa al 1% (carril inicial: marcador de peso molecular Low Mass Ladder).....	41
Figura 3.2: Muestras de ADN de aguacate validado, amplificados con el primer AV1, en geles de agarosa al 2% (Carril inicial: 100bp).....	42
Figura 3.3: Pruebas de duplexaje en 700 nm (arriba) y 800 nm (abajo), en el LI-COR 4300.....	43
Figura 3.4: Arriba: Genotipaje del SSR AV5, siendo el más polimórfico; abajo: genotipaje del SSR AV10, el locus menos polimórfico.	45
Figura 3.5: Número de alélos de 10 microsatélites utilizados en el genotipaje, para conocer la diversidad genética de aguacate.	46
Figura 3.6: Frecuencias alélicas para el locus AV1.....	47
Figura 3.7: Frecuencias alélicas para el locus AV2.....	49
Figura 3.8: Frecuencias alélicas para el locus AV11.....	50
Figura 3.9: Frecuencias alélicas para el locus AV3.....	51
Figura 3.10: Frecuencias alélicas para el locus AV4.....	52
Figura 3.11: Frecuencias alélicas para el locus AV9.....	53
Figura 3.12: Frecuencias alélicas para el locus AV5.....	54

Figura 3.13: Frecuencias alélicas para el locus AV7.....	55
Figura 3.14: Frecuencias alélicas para el locus AV10.....	56
Figura 3.15: Frecuencias alélicas para el locus AV12.....	57
Figura 3.16: Número de genotipos de cada locus.....	58
Figura 3.17: 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.	60
Figura 3.18: 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.	61
Figura 3.19: Análisis de coordenadas principales (PCO) de 200 muestras de aguacates analizados con 10 primers SSRs, en las dos primeras coordenadas.	62
Figura 3.20: Análisis de coordenadas principales de 200 muestras de aguacate analizados con 10 primers SSRs, visto en tres coordenadas.	63
Figura 3.21: Analisis de conglomerados por provincias.....	64
Figura 3.22: Porcentajes obtenidos del AMOVA.....	65
Figura 3.23: Representación de la variación del peso del fruto de cada ecotipo con valor mínimo, máximo y promedio.	72
Figura 3.24: Representación de la variación del peso de la semilla de cada ecotipo con valor mínimo, máximo y promedio.	72
Figura 3.25: Ángulo de inserción de las ramas principales.	73
Figura 3.26: Color de la rama joven.	73
Figura 3.27: Color de las lenticelas del vástago joven.	74
Figura 3.28: Frecuencias de la forma de la hoja.	74
Figura 3.29: Frecuencias observadas de la forma de la base de la hoja.	75
Figura 3.30: Color de las hojas maduras.	75
Figura 3.31: Frecuencias observadas del margen de la hoja.....	76
Figura 3.32: Forma del ápice de la hoja.....	76
Figura 3.33: Textura de la hoja.	77

Figura 3.34: Olor a anís.	77
Figura 3.35: Época de floración por meses.....	78
Figura 3.36: Tipo de floración.....	78
Figura 3.37: Época de Fructificación por meses.	79
Figura 3.38: Hábito de fructificación.....	79
Figura 3.39: Frecuencia observada por la forma del fruto.....	80
Figura 3.40: Forma de la base del fruto.	80
Figura 3.41: Aristas en el fruto.	81
Figura 3.42: Brillantes de la cáscara del fruto.	81
Figura 3.43: Posición del pedicelo en el fruto.....	82
Figura 3.44: Forma del pedicelo.....	82
Figura 3.45: Color del pedicelo.	83
Figura 3.46: Superficie de la cáscara del fruto.	83
Figura 3.47: Color de la cáscara del fruto.	84
Figura 3.48: Grosor de la cáscara del fruto.	84
Figura 3.49: Color de la carne cercana a la semilla.	85
Figura 3.50: Textura de la pulpa.	85
Figura 3.51: Fibra en la pulpa.	86
Figura 3.52: Forma de la semilla.....	86
Figura 3.53: Posición de la semilla en la fruta.....	87
Figura 3.54: Número de días de floración a madurez de fruto.	87
Figura 3.55: Análisis de agrupamiento de la caracterización morfológica de 32 ecotipos de la Colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco- INIAP.....	88
Figura 3.56: Análisis de Componentes principales	89

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo A:** Buffer de extracción 2X CTAB (Morillo & Miño, 2011)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo B:** Acciones presentes en la Granja Tumbaco y colectadas en el Austro **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo C:** Listado de descriptores de aguacate.. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo D:** Detalle de los descriptores propuestos por IPGRI (1995). **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo E:** Resultados de la cuantificación en el espectrofotómetro EPOCH **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo F:** Listado e información de los 10 primers utilizados (Ashworth & Clegg, 2003). **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo G:** Imágenes genotipadas obtenidas del software SAGA GT de los dúplex formados y primers individuales en el canal 700 u 800 de las 214 muestras de aguacate y 3 controles positivos. **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo H:** Datos del genotipaje con 10 microsatélites SSR de los 200 materiales de aguacate **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo I:** Mapa de la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco-INIAP..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Anexo J:** Coeficiente de correlación de Spearman con 30 variables. En amarillo se muestran los valores mayores a 0.95 **¡Error! Marcador no definido.**

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 Austro Ecuatoriano 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. Adicionalmente, 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. Además, se caracterizaron morfológicamente 32 ecotipos de aguacate de la colección de germoplasma del INIAP. 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. El análisis de similitud UPGMA y el análisis de coordenadas principales PCO determinaron la falta de estructura genética en las muestras estudiadas. 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%. La identificación de las localidades es útil para desarrollar los programas de mejoramiento y manejo de recursos genéticos. Las poblaciones que mostraron el mayor distanciamiento genético fueron Pichincha y Tungurahua, considerándose candidatas convenientes para realizar cruza dirigidas.

Palabras clave: Aguacate, microsatélites, variabilidad, molecular, morfológico.

ABSTRACT

Because of its valuable characteristics such as flavor, high yield, quality and demand, avocado (*Persea americana* M.) has become a product with high interest for the agriculture sector. A study of genetic variability in this fruit was done in this research. It was carried out a molecular characterization of 18 samples of avocado "National", which were collected in the Austro, and 182 avocado trees from the working collection of Tumbaco (INIAP), determining the genetic diversity and structure. Additionally, a global analysis was performed with 48 materials of avocado "National" from the north and central valleys. Ten microsatellites was used using by the M13- Tailing technique. The samples were genotyped using the DNA analyzer LI-COR 4300. Moreover, 32 avocado ecotypes from the working collection of INIAP were characterized morphologically. Genetic diversity analysis revealed a total 110 alleles in the 10 locus, showing an average of 11 alleles/locus. The locus AV5 was the most polymorphic. The PIC reported was 0.73, the expected heterozygosity was 0,77 and the observed heterozygosity was 0.65, being indicators of high genetic diversity. The UPGMA similarity analysis and the principal coordinate analysis (PCO) identified the lack of genetic structure in the samples studied. The global analysis revealed that the samples of avocado "National" showed a genetic difference of 4% in 6 provinces from the Andean valleys of Ecuador; while compared to the introduced materials from INIAP's working collection have a genetic difference of 17%. The identification of the locations is useful for developing breeding programs and genetic resource management. The populations which showed the highest genetic distance were Pichincha and Tungurahua, being good candidates to carry out breeding crosses.

Key words: Avocado, microsatellites, genetic diversity, molecular, morphologica.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE AGUACATE (*PERSEA AMERICANA* MILL.) DE LOS VALLES INTERANDINOS DEL ECUADOR

1.1 Formulación del problema

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).

Andrade (citado por Redacción Uno, 2010) menciona que el aguacate de tipo nacional no es demandado en los mercados, lo que está provocando la disminución de este cultivo y por ende su origen genético, como resultado la pérdida de una fuente potencial de posibles genes de resistencia a plagas y enfermedades, de ahí la gran importancia de actividades de exploración, colecta, conservación, evaluación de genotipos en peligro de extinción y programas de mantenimiento de germoplasma (Larios, *et al.*, 2011); de no hacerlo probablemente se corre el riesgo de perder dichos genes con características sobresalientes, y que suceda lo mismo que con *P. theobromifolia*, que prácticamente ha desaparecido en el Ecuador (Gentry, 1979).

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, comunicación personal, 2012). 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).

De acuerdo a Vásquez (2012), en los Valles Interandinos de la zona centro y norte, se puede decir que existe mayor erosión genética, por cuanto existe mayor superficie de huertos comerciales de aguacate. Mientras que en los valles de la Sierra sur (Austro), se asume que tienen una menor erosión debido a la menor área de huertos comerciales. Sin embargo, se ha demostrado que todavía existe gran variabilidad genética en las plantaciones de aguacate en los valles del centro y norte de la Serranía de Ecuador, donde se realizó la caracterización molecular de 57 materiales nacionales mediante la utilización de diez microsatélites, revelándose una riqueza alélica de 10,7 alelos/locus y un valor de contenido de información polimórfica (PIC) de 0,73; demostrando un gran polimorfismo y diversidad genética en las muestras de aguacate analizadas (Urgilez, comunicación personal, 2012).

La variabilidad proveniente de los procesos evolutivos se almacena en el genoma, es decir, entre los miembros de la población que conforman la especie y puede o no expresarse en características fenotípicas que permitan ser identificadas (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), 2003). Los procesos fisiológicos del aguacate como en cualquier ser vivo están

determinados, por su código genético y el ambiente en el cual se desarrolla (Lira, 2003).

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 filogenéticas del aguacate han sido estudiadas con diversos marcadores moleculares: RFLPs (Furier, 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).

El uso de marcadores moleculares microsátélites ha demostrado ser eficientes para caracterizar la variabilidad genética de aguacate. Además, han demostrado una fácil detección por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y una alta reproducibilidad. Debido a su codominancia, y al alto grado de polimorfismo, estos microsátélites son apropiados para analizar la diversidad genética de aguacate con los cuales se pudo identificar

heterocigosidad en las muestras de aguacate, y distancias genéticas entre los diferentes cultivares de este frutal (Urgilez, 2012).

1.2 Justificación

Debido a que el cultivo del aguacate es económicamente rentable y representa óptimas perspectivas de desarrollo agronómico para el país, la finalidad de este proyecto es determinar la variabilidad genética del aguacate, con el uso de microsátélites. La información obtenida permitirá la identificación, clasificación y aprovechamiento de la diversidad genética existente en los genomas de las plantas de aguacate que será implementada en programas del mejoramiento genético, así como para manejo agronómico de este frutal.

La información obtenida permitirá determinar si los cultivares de aguacate de los Valles de la Sierra Ecuatoriana aportan diversidad genética ya que en estudios anteriores se pudo comprobar que los cultivares de aguacate de los Valles Interandinos del centro y norte del Ecuador presentan una gran variabilidad, por esta razón se pretende completar la caracterización y realizar un análisis global de diversidad genética de aguacate del Ecuador, en consecuencia, se podrá concluir el estudio de la variabilidad genética, con los materiales nacionales que fueron colectados en el Austro y los materiales nacionales e introducidos de la colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco. Esta investigación a su vez se orienta a la eliminación de duplicados de la colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco por medio de la caracterización molecular, lo que permitirá formar una colección de trabajo núcleo que represente toda la variabilidad, para su conservación y uso.

La clasificación y conservación del germoplasma vegetal debe verse como una actividad que permite preservar este patrimonio nacional de biodiversidad, lo cual requiere de un esfuerzo importante para conservar los genotipos de plantas cultivadas y silvestres que actualmente son amenazadas al ser sustituidas por variedades mejoradas (Gutiérrez, Martínez, Gracia, & Iracheta, 2009).

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar la variabilidad genética de aguacate de los Valles Interandinos del Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

- Colectar materiales de aguacate faltantes (*Persea americana*) tipo nacional.
- Caracterizar molecularmente las accesiones de aguacate colectadas en el Austro Ecuatoriano.
- Caracterizar molecularmente y morfológicamente la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco.
- Realizar un análisis global de diversidad genética de los valles interandinos del sur y del norte del Ecuador.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un frutal cuyo nombre en México proviene de la palabra nativa "aoacatl" o "ahuacatl" y se lo conoce con otros nombres como "palta" en Latinoamérica, "avocado" en inglés, "evocatier" en francés y "abacate" en portugués (Silva & Sánchez, 2009).

1.4.2 Origen y distribución del aguacate

Smith (1969) citado por (Vizcaíno, 2011) menciona que el aguacate tiene como su centro de origen a América en las partes altas del centro y este de México, y partes altas de Guatemala. Debido a estudios y pruebas arqueológicas encontradas con una antigüedad de 12.000 años, se ha determinado

específicamente a en Tehuacán (Puebla, México) como su centro de origen (CORPOICA, 2008).

Su distribución natural va desde México hasta Perú, pasando por Centro América, Colombia, Venezuela y Ecuador (CORPOICA, 2008).

1.4.3 Producción mundial

En el continente Asiático, Indonesia es el principal productor de aguacate, en África lo es Sudáfrica, estos continentes contribuyen entre un 15 y 17% de la superficie cultivada a nivel mundial respectivamente. En América, los principales países productores y exportadores son México, Estados Unidos y Chile. Otros países productores importantes son Israel, España y Sudáfrica (IICA, 2007).

Según los datos de la Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, 2012, México es el mayor productor mundial de aguacate, manteniendo un 33% de la producción total (1.022 millones de TM). El siguiente productor más grande es Indonesia, con el 8% (264 mil TM). Estados Unidos y Colombia presentan el 7% y 6% de la producción total mundial respectivamente. Seguido por la República Dominicana con una participación del 4% de la producción (114 mil TM).

1.4.4 El aguacate en el Ecuador

El Ecuador es uno de los países más ricos a nivel mundial en flora, fauna y productos agrícolas. En los últimos años se ha registrado un aumento en la demanda internacional del aguacate ecuatoriano (Figura 1.1), por su sabor, textura, calidad y las propiedades nutricionales, que han cautivado a innumerables consumidores de varios países, como Colombia, Francia y Rusia (CORPEI, 2009).



Fuente: (CORPEI, 2009)

Figura 1.1: Evolución de las exportaciones ecuatorianas de aguacate en los últimos años

1.4.5 Taxonomía

El aguacate tiene la siguiente clasificación taxonómica (IICA, 2007):

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Dipétala

Orden: Ranales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana* Mill.

1.4.6 Descripción morfológica del árbol del aguacate

Los árboles de aguacate (Figura 1.2) son comúnmente vigorosos y de gran altura, pudiendo alcanzar hasta 30 m de en condiciones naturales (IICA, 2007), presentan una amplia copa, cuyo diámetro puede sobrepasar 25 m en un árbol de 5 a 6 años (Díaz, 1997), presentan una amplia copa que puede variar de densa y simétrica a vertical y asimétrica (Crane, Balerdi, & Maguire, 2006). Es una árbol polimórfico, con diferentes formas entre las cuales están columnar, piramidal, obovado, rectangular, circular, semicircular, semielíptico e irregular (CORPOICA, 2008).



Figura 1.2: Árbol de aguacate

1.4.6.1 Raíz

La raíz principal es pivotante, muy ramificada y de distribución radial. Las raíces secundarias y terciarias se distribuyen superficialmente, en los primeros 60 cm, aunque la raíz principal puede superar 1,0 m de profundidad. Posee un sistema radicular relativamente superficial (Montañez, 2009) (Figura 1.3).



Fuente: (CORPOICA, 2008)

Figura 1.3: Raíz de aguacate

1.4.6.2 Tallo

Los árboles de aguacate poseen tallos gruesos cilíndrico, erecto, leñoso, ramificado, con una corteza áspera y con ramificaciones vigorosas extendidas (IICA, 2007) de forma globosa y acampanada (CORPOICA, 2008) (Figura 1.4)



Figura 1.4: Tallo cilíndrico del árbol de aguacate

1.4.6.3 Hojas

Las hojas del aguacate son perenne, pecioladas y alternas (Figura 1.5). Su forma es diversa, entre las cuales están ovada, obovada, obovada angosta,

oval, redondeada, cordiforme, lanceolada, oblonga y oblongo-lanceolada. Su margen puede ser entero u ondulado; la base puede ser aguda, obtusa o truncada; la forma del ápice puede ser muy agudo, agudo, intermedio, obtuso o muy obtuso, con unas dimensiones de 8 a 40 cm de longitud y de 3 a 10 cm de ancho aproximadamente (IPGRI, 2003).



Figura 1.5: Hojas de aguacate

1.4.6.4 Flores

Son flores pequeñas, agrupadas en una panícula, hermafroditas, pubescentes con pedicelos cortos (Figura 1.6). Presentan un cáliz de tres sépalos y una corola tripétala, con 12 estambres, nueve funcionales y tres estaminoides; el pistilo posee un solo carpelo y el ovario un solo óvulo. Su color puede ser crema, amarillo, verde, café o rojo. Las flores permanecen en el árbol dos días aproximadamente, antes de ser fecundadas o caer (CORPOICA, 2008).



Figura 1.6: Flores de aguacate

1.4.6.5 Fruto

El fruto es una baya (Figura 1.7) que presenta varias formas como oblata, esferoide, esferoide alto, elipsoide, obovado angosto, obovado, piriforme, claviforme o romboide. Cuando este está maduro el color de la cascara puede ser verde, verde claro, verde oscuro, amarillo, anaranjado claro, rojo, púrpura o negro, la misma que puede ser muy lisa, papilada, muy papilada. El color de la pulpa puede ser marfil, amarillo, amarillo claro, amarillo intenso, verde claro, verde (IPGRI, 2003).

El peso de los frutos de aguacate al ser este muy polimórfico puede variar entre los 100 gramos en variedades con frutos pequeños a los 3.000 gramos en variedades con frutos muy grandes. El hábito de fructificación puede ser de frutos individuales o en racimos (CORPOICA, 2008).



Figura 1.7: Fruto de aguacate “Duke 7”

1.4.7 Valor nutritivo

Este frutal posee buenos atributos nutricionales de América al mundo, contiene todas las vitaminas presentes en el reino vegetal (Zentmyer, 1998), tanto vitaminas liposolubles como hidrosolubles. El aguacate es fuente

importante de vitaminas A, C, E, tiamina (vitamina B1), calcio, hierro, magnesio, zinc y otros minerales (Velásquez, 2006).

1.4.8 Razas y variedades

El aguacate comprende tres grupos definidos: Raza mexicana: *P. americana* var. *drymifolia*, Raza guatemalteca: *P. nubigena* var. *guatemalis* y Raza antillana: *P. americana* var. *americana*. Las dos primeras son originarias de los altiplanos mexicanos y guatemaltecos, y la última de Centroamérica (Casaca, 2005) (Figura 1.8).

Con la ayuda de marcadores moleculares se ha identificado una sola especie de aguacate, la *Persea americana*, las tres razas conocidas son subespecies o variedades botánicas de ella (Berg & Ellstrand, 1986).



Fuente: (Sánchez Collín, Mijares Oviedo, López, & Barrietos, 2001)

Figura 1.8: Centros de origen de las 3 razas de aguacate

Las razas de aguacate se diferencian por sus diferentes características morfológicas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Diferencias morfológicas en las tres razas de aguacate

Carácter	Raza mexicana	Raza guatemalteca	Raza antillana
Clima	Semitropical a templado	Subtropical	Tropical
Altitud	Sobre 2000 msnm	Entre 1000 y 2000 msnm	Menor a 1000 msnm
Resistencia al frío	Mayor	Intermedia	Menor
Resistencia a salinidad	Menor	Menor	Mayor
Brotos jóvenes	Verde pálido	Rojizos	Verde pálido
Tamaño de las hojas	Menor	Intermedio	Mayor
Color de las hojas	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde pálido
Olor de las hojas	Olor anís	Sin olor	Sin olor
Tamaño del fruto	Tendiente a pequeño	Intermedio	Tendiente a grandes
Pedicelo	Cilíndricos de grosor mediano	Cónico de grosor voluminoso	Forma de cabeza de clavo con poco grosor, también existen tipos con mayor grosor
Cáscara	Delgada, lisa y suave	Gruesa, quebradiza y rugosa	Grosor mediano, flexible y suave
Aceite	Alto contenido	Mediano contenido	Bajo contenido
Sabor	A especia y por lo general a anís	Ligero y en ocasiones nogada	Ligero y frecuentemente dulce
Fibra en la pulpa	Común	No común	No común
Tiempo de flor a fruto	6 a 9 meses	10 a 16 meses	5 a 9 meses

1.4.8.1 Razas

1.4.8.1.1 Raza antillana

La raza antillana se caracteriza por sus frutos grandes, y con corteza fina flexible, no granular, el pedicelo cilíndrico en casi toda su longitud que se

ensancha en la unión al fruto, la pulpa es baja en aceite (10%). Las hojas no son aromáticas. El período entre la floración y la recolección variable de 5 a 8 meses, relativamente corto. Estos árboles presentan un tronco acanalado (Barrientos & López, 1998).

1.4.8.1.2 Raza guatemalteca

Su origen está en Guatemala, se caracterizan por los fruto de tamaño pequeño y forma redonda, con cáscara gruesa (2 mm). Se cultiva en zonas que van de 500 a 2400 msnm. El árbol es de gran tamaño, sus hojas son grandes (15 a 18 cm de largo), de color verde oscuro y carecen de olor a anís. El peso del fruto varía entre 125 a 1500 g, la cáscara es gruesa (2 mm), de consistencia rugosa. La pulpa es poco fibrosa y el contenido de aceite es aproximadamente de 18 a 20% de, la semilla es de gran tamaño (León, 1999).

1.4.8.1.3 Raza mexicana

La raza mexicana es originaria de México, se caracteriza por su resistencia a bajas temperaturas. Se cultivan en zonas altas que van de 1500 a 2500 msnm. Los árboles son altos con ramas delgadas. Sus hojas son verdes oscuras, pequeñas de 8 a 10 cm de largo, con intenso olor a anís. Los frutos son piriformes, de tamaño pequeño con un peso que varía de 90 a 180 g, de cáscara delgada, lisa y suave. Su pulpa presenta alto contenido de aceite (20 a 25%) y gran cantidad de fibra, su semilla es pequeña, puede estar adherida o suelta (Alfonso, 2008).

1.4.8.2 Variedades

Existen más de 500 variedades mejoradas de aguacate (IICA, 2007). De las cuales en la colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco del INIAP, se encuentran 32 cultivares procedentes de Estados Unidos (Florida y California), Honduras y Ecuador. De previas evaluaciones se ha determinado 5

variedades con características sobresalientes, entre los cuales tenemos a la variedad Fuerte, Hass, DD-17, HX-48 y el híbrido 14371 (León, 1999).

1.4.8.2.1 Fuerte

Esta variedad es originaria de México y es un híbrido natural entre la raza mexicana y guatemalteca. Este es el cultivar comercial más importante por la calidad de la fruta, sabor, tamaño y resistencia al transporte. Su árbol es vigoroso de copa abierta. Tiene floración tipo B. El fruto es piriforme, de peso medio con un rango de 180 a 420 g, su largo varía de 10 a 12 cm, y su ancho va de 6 a 7 cm; semilla de tamaño mediano. Su corteza es de aproximadamente 1 mm de espesor y de color verde. La pulpa carece de fibra y el contenido de aceite oscila de 18 a 22%. El periodo de producción en Ecuador se encuentra en los meses de febrero a julio (León, 1999).

1.4.8.2.2 Hass

Presenta una copa achaparrada. Las hojas son lanceoladas y largas. Posee floración tipo A. El fruto es oval o piriforme, con un peso entre 150 a 300 gramos, la cáscara es gruesa y rugosa, resistente al transporte, su color es de color verde y en su estado de maduración morado oscuro. Esta variedad es muy demandada por su excelente sabor, su pulpa no posee fibra y contiene del 18 a 22% de aceite (Alfonso, 2008).

1.4.8.2.3 Duke 7

Es el primer portainjerto clonal comercial, de origen mexicano. Posee una gran resistencia a salinidad, la mayor de los portainjertos de semilla mexicanos. Tiene una tendencia a mantenerse verde en situaciones de suelos calcáreos, donde se producen grandes clorosis por deficiencias de hierro. Es un árbol muy vigoroso, de brotación temprana, pero posee baja tolerancia a la pudrición radicular (Lemus, *et al.*, 2010).

1.4.8.2.4 Nacional

Esta variedad se caracteriza por tener un fruto pequeño, corteza delgada, de color negro o verde oscuro brillante. Su cantidad de pulpa es escasa, de color verde intenso y de semilla grande. Sus hojas presentan un intenso olor aromático (IICA), 2007).

1.4.9 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, estas características solo son posible evaluarlas a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto (3 años) (IPGRI, 2003).

1.4.9.1 Descriptores morfológicos

Un descriptor morfológico es una característica cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Los descriptores son aplicados en la caracterización y evaluación de las accesiones debido a que ayudan a su diferenciación, lo que simplifica la clasificación, almacenamiento y uso de los datos. Los descriptores han sido definidos para un gran número de especies cultivadas. Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (IPGRI, 2003).

1.4.10 Caracterización molecular

La caracterización de la variabilidad que no es detectable por simple observación visual. Esta caracterización se denomina molecular porque se refiere a la identificación de productos y/o funciones internas de la célula. Todas las técnicas de laboratorio para detectar esta variabilidad se agrupan dentro del concepto de marcadores moleculares explicado anteriormente. Si bien ya existen algunos métodos de análisis de datos en proceso de desarrollo para estos tipos

de caracterización las técnicas de laboratorio son relativamente recientes y están en continuo proceso de mejoramiento y actualización (IPGRI, 2003).

1.4.10.1 Marcadores moleculares

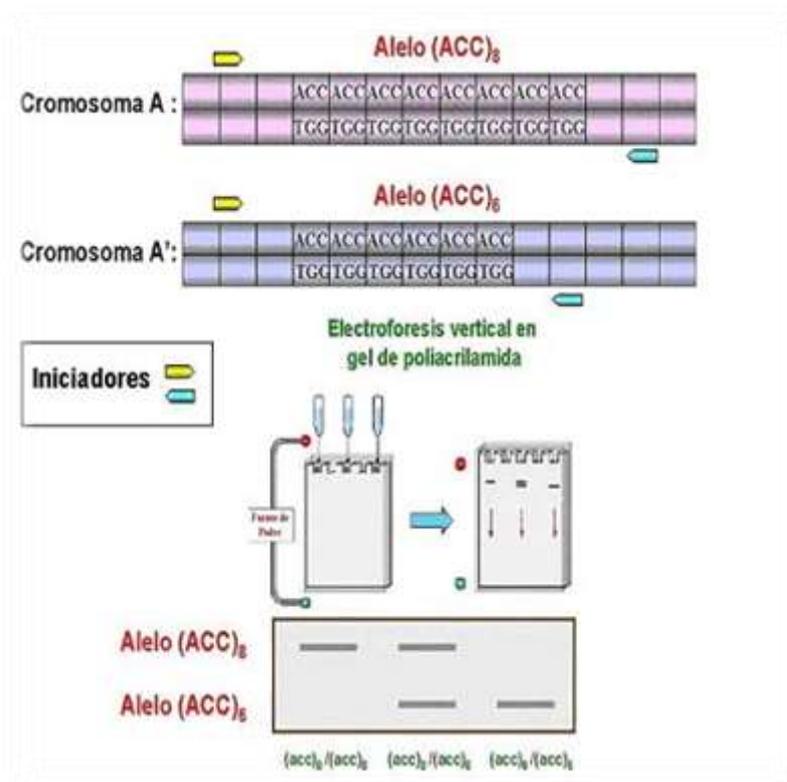
Los marcadores bioquímicos o moleculares como isoenzimas o fragmentos de ADN, pueden ser utilizados para caracterizar el genotipo de un individuo a partir de muestras de células o de tejidos. Pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo de la planta, siempre que sea posible obtener suficiente cantidad de ADN (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN (Velasco, 2005).

1.4.10.2 Microsatélites

Las secuencias sencillas repetidas (“SSR-*Simple Sequence Repeats*”), también denominadas “microsatélites” (Litt & Luty, 1989), consisten en pequeñas secuencias (“*sequence motif*”) de 1 a 7 nucleótidos adyacentes repetidos (Figura 1.9). En genomas eucariontes, estas secuencias sencillas son frecuentes, arbitrariamente distribuidas y forman *loci* genéticos altamente polimórficos distribuidos a lo largo de los cromosomas. (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

El número de unidades repetidas varían ampliamente entre los organismos, hallándose hasta 50 copias o más, los alelos de cada locus se diferencian en el número de repeticiones (Hajeer, 2000).



Fuente: (Yáñez, 2002)

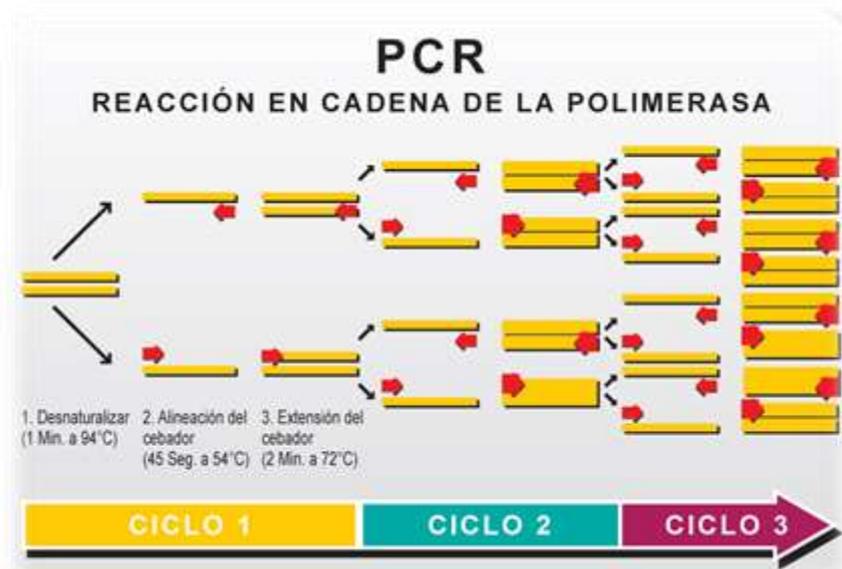
Figura 1.9: Esquema muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud.

1.4.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena polimerasa (PCR) es un método para amplificar secuencias de ADN in vitro (Figura 1.10), fue desarrollada en 1983 por el Doctor Kary Mullis quien recibió en 1993 el Premio Nobel de Química por este descubrimiento (Pérez de Castro, 2010).

La PCR utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de 6 Kb en promedio (10 a 30 pares de bases de longitud) y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco, los cuales están diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos; la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena

mediante la acción de la polimerasa (Delgado, 2006) como se muestra en la Figura 1.10.



Fuente: (Pérez de Castro, 2010)

Figura 1.10: Ciclos de una reacción en cadena polimerasa

1.4.12 Analizador de ADN LI-COR 4300

Esta técnica sirve para el “*screenig*” o detección rápida de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), inserciones, deleciones o variaciones del tamaño de los microsatélites, bien en poblaciones con mutaciones inducidas (*tiling*) o naturales (*ecotilling*). El analizador de ADN LI-COR 4300 es capaz de detectar el polimorfismo y de localizar su posición de forma aproximada (Figura 1.11), pero no determina qué base o bases se han modificado. Para obtener dicha información sería necesaria la secuenciación posterior del polimorfismo (Universidad de León, 2010).

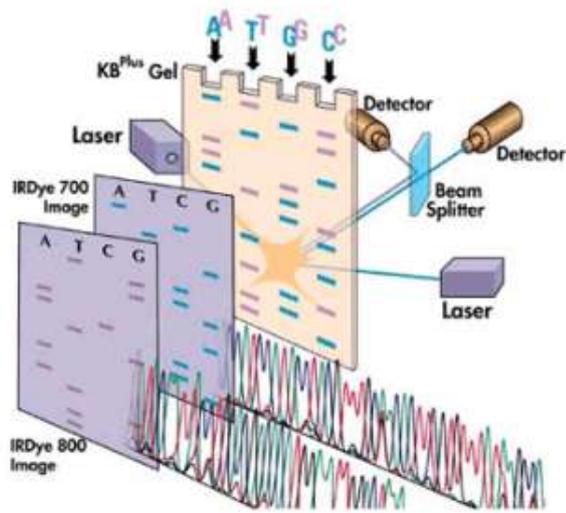


Figura 1.11: Ilustración de la detección de bandas en LI-COR 4300

1.5 Hipótesis de investigación

Existe variabilidad genética entre accesiones de aguacate de los valles interandinos del Ecuador.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación fue realizada en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en el Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) bajo la tutoría del Dr. Eduardo Morillo, jefe del departamento y con la participación del Programa de Fruticultura - Granja Experimental Tumbaco. El estudio fue financiado a través del proyecto SENESCYT PT-11-EESC-034: “Fortalecimiento de la investigación y producción de aguacate para la seguridad alimentaria de las familias de la sierra ecuatoriana” y el proyecto 527-025: “Fortalecimiento Institucional” del INIAP.

2.2 Fase I: Recolección de material vegetal

Se recolectaron muestras de varetas para la conservación ex situ de las accesiones colectadas en el Austro (Azuay y Loja). Además, se registraron los datos pasaporte de todos los materiales colectados, siguiendo las normas generales propuestas por el Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF).

La recolección de varetas se realizó de la siguiente manera:

Se cortaron ramillas apicales de aproximadamente 30 a 35 centímetros (cm) de longitud con presencia de brotes, las mismas serán de un grosor aproximado de 0,5 a 1 cm. Después de cortadas las varetas se retiró las hojas dejándoles el pecíolo sin dañar las yemas laterales y la yema terminal, esto se realizó con el fin de evitar que la vareta se deshidrate y mantener su turgencia. Finalmente se envolvió en papel periódico húmedo y fueron colocadas en un termo con hielo, previamente etiquetadas (Vela, 2009).

2.3 Fase II: Caracterización molecular

2.3.1 Características del laboratorio

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.

2.3.1.1 Ubicación geográfica

Provincia: Pichincha

Cantón: Mejía

Parroquia: Cutuglahua

Altitud: 3058 msnm

Longitud: 78°33'14" Oeste

Latitud: 0°22'00" Sur

2.3.2 Recolección de muestras

Se tomará (50 g) 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%. Posteriormente se guardaron en fundas plásticas Ziploc con sílica gel (100 g).

2.3.3 Procesamiento de muestras

Las muestras totalmente secas, al cabo de 2 días, se colocaron en tubos eppendorf, etiquetados correctamente con el código del árbol, los mismos que fueron colocados en el molino mezclador para su maceración y posterior extracción de ADN.

2.3.4 Extracción de ADN

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), que se detalla a continuación.

Procedimiento:

1. Añadir 700 µl de buffer (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) a 0,05 g de tejido seco de cada material.
2. Incubar a 65 °C por 1 hora agitando cada 30 minutos.
3. Centrifugar a 1400 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos.
4. Tomar el sobrenadante y añadir 699 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) 24:1. Homogenizar.
5. Centrifugar a 1400 rpm por 10 minutos.
6. Repetir el paso 4 y 5.
7. Adicionar 400 µl de etanol al 90%.
8. Centrifugar por 4 minutos a 1400 rpm. Si el pellet no es visible colocar el tubo a -20 °C durante 30 minutos y centrifugar nuevamente.
9. Retirar el isopropanol y lavar dos veces con 1 ml de etanol 70% la pastilla de ADN formada.
10. Secar en la microestufa por 30 minutos a 37 °C.
11. Resuspender el ADN en 100 µl de Tris-EDTA (TE) a temperatura ambiente por toda la noche.

2.3.5 Cuantificación de ADN en gel de agarosa

Para la cuantificación de ADN se analizó por electroforesis en geles de agarosa 1% en tampón Tris-acetato-EDTA 1X (TAE), utilizando estándar ADN Low Mass Ladder (No.10068-013 INVITROGEN). El proceso se detalla a continuación:

Cuantificación de ADN en geles de agarosa:

1. Ensamblar la cubeta de electroforesis.
2. Preparar el gel de agarosa al 1%.
3. Preparar las muestras a cuantificar en Parafilm: Mezclar 4 μ l de DNA a cuantificar y 1 μ l de bluejuice.
4. Cargar 2 μ l en los pocillos del gel de agarosa.
5. Cargar en el primer pozo del gel 2 μ l de DNA Low Mass Ladder.
6. Correr a 100 V por 30 minutos.
7. Colocar en la cámara UV, focalizar la imagen e imprimir en papel térmico.
8. Cuantificar la concentración de ADN en ng/ μ l comparando la intensidad de sus bandas con relación a las del marcador molecular (Morillo & Miño, 2011).

2.3.6 Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTek.

Se colocó 2 μ L de ADN de cada muestra a cuantificar en la placa Take3 del espectrofotómetro Epoch, la cual consta de 16 pocillos, en 2 se colocará el blanco (agua ultrapura) y en los 14 restantes las muestras, a continuación se procedió a dar lectura a través del Software para Análisis de Datos Gen5. Los datos obtenidos se importaron a una tabla en Excel.

2.3.7 Validación de ADN

Para la validación se empleó el primer AV1 (Tabla 2.1) (Ashworth, Kobayashi, De la Cruz, & Clegg, 2004), con el coctel de reacción de PCR detallado en la tabla 2.2, utilizando el programa de la tabla 2.3 en el termociclador PTC-200, esto se utilizó para las 214 muestras de ADN de aguacate. La concentración óptima de ADN para la realización de la PCR es de 5 ng/μl por lo cual se diluyó en agua de tartrazina el ADN de aguacate, a partir de los datos obtenidos de la cuantificación hasta lograr la concentración final recomendable.

Tabla 2.1: Microsatélites empleado para el proceso de validación

Locus	Secuencia	Número de bases	Tm (°C)
AV1F	CTACATAGATCGAAATAAGG	20	54
AV1R	ATCTGGCTATGAAATGTTGG	20	

Fuente: (Ashworth, Kobayashi, De la Cruz, & Clegg, 2004)

Tabla 2.2: 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 2.3: Programa de amplificación utilizado en el termociclador (Morillo & Miño, 2011).

	Temperatura °C	Tiempo	
<i>Ciclo inicial de denaturación</i>	94	5 min	
<i>Denaturación cíclica</i>	94	45 seg	30 ciclos
<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 visualización los productos de amplificación obtenidos de la PCR se mezclaron con el tapón de carga “bluejuice” en proporción 4:1, esta mezcla se cargó en geles de agarosa al 2%, utilizando el marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (10488-058 INVITROGEN), mediante electroforesis horizontal a 140 voltios durante 30 minutos; a continuación se realizó la tinción de los mismos en una solución de Bromuro de Etidio a 15 ppm por un periodo de tiempo de 20 minutos en agitación. Los geles se observaron en el fotodocumentador Dolphin View Wealtec (Morillo & Miño, 2011).

2.3.8 Amplificación con microsatélites mediante la técnica M-13 tailing para genotipaje de las muestras de aguacate en el analizador LI-COR 4300

Para la amplificación de ADN con microsatélites se utilizó las condiciones y los cebadores reportados por (Ashworth & Clegg, 2004) (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Microsatélites para el estudio de variabilidad genética de Aguacate (Ashworth & Clegg, 2004)

Locus	Secuencia	Número de bases	Tm (°C)
AV1F	CTACATAGATCGAAATAAGG	20	54
AV1R	ATCTGGCTATGAAATGTTGG	20	
AV2F	TTGCCAGTGGAACCTTCAAAA	20	63
AV2R	ACCCAACCAAAGATTTCAAT	20	
AV3F	ACTCTCGCCTCTGCGTTGAT	20	65
AV3R	GACTCAACATGGTTAGAACAAGGC	20	
AV4F	GATTAAAGATGACCCTGAAG	20	56
AV4R	GATTTGGCTCAAGATAGATC	20	
AV5F	GCTCACAAGGGAACCTTTCAT	20	64
AV5R	TAAATCCCCTTTCCCACCTT	20	
AV7F	TGCTGGCATAATGGCTGCTA	20	67
AV7R	CAAACATCTTCAGAACCGCC	20	
AV9F	CCACTTGGATTCTTGTTGGA	20	65
AV9R	ATTTGGGTTTCGGCTTAGGAA	20	
AV10F	TCCACAACCTTCTACAGGGTCGT	22	68
AV10R	GGAAGATAAAGCACCTTGAGTTC	22	
AV11F	GCGAACACTACTCACATAGG	20	58
AV11R	ATTTTAACTAATGGATTGGATG	22	
AV12F	ACAACCCAAACATAAATGCT	20	50
AV12R	AATAGAAGTGACATCCGACC	20	

Los microsatélites fueron amplificados en reacciones multiplex, para lo cual se realizaron pruebas para optimizar los dúplex PCR, las temperaturas y los pesos de amplificación.

Para la amplificación con primers individuales se utilizó el coctel de reacción para PCR que se detalla en la tabla 2.5.

Tabla 2.5: 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

La amplificación con microsatélites en combinaciones dúplex se realizó con el coctel detallado en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Coctel de amplificación dúplex de microsatélites-M13 (Morillo & Miño, 2011)

Componentes	Volumen
ADN (5ng /μl)	2,00 μl
Buffer Gotag 5x	1,00 μl
MgCl ₂ (25mM)	0,50 μl
dNTPs (5mM)	0,20 μl
M13 700-800 LI-COR (1 μM)	0,80 μl
Primer 1 F-M13 (1 μM)	0,05 μl
Primer 2 F-M13 (1 μM)	0,08 μl
Primer 1 R (10μM)	0,05 μl
Primer 2 R (10μM)	0,08 μl
Taq polimerasa (5U/μl)	0,05 μl
H ₂ O ultra pura	0,19 μl
Volumen final	5,00 μl

Para la amplificación de las muestras de ADN se utilizó el termociclador PTC-200 utilizando el programa detallado en la tabla 2.7.

Tabla 2.7: Programa de amplificación con microsatélites mediante la técnica M-13 tailing (Morillo & Miño, 2011)

	Temperatura °C	Tiempo	
<i>Ciclo inicial de denaturación</i>	94	2 min	
<i>Denaturación</i>	95	4 min	
<i>Denaturación cíclica</i>	95	1 min	25 ciclos
<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	

2.3.9 Genotipaje de las muestras de aguacate en el analizador genético LI-COR 4300

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-corrida 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.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas por el software SAGA-GT Microsatellite el cual estableció si los alelos producen datos homocigotos o heterocigotos, por último se confirmó los datos, lo cual generó un reporte con los datos de cada locus como las tallas de los alelos y las frecuencias alélicas en porcentaje.

2.3.10 Análisis estadístico

Para caracterizar la variabilidad genética los datos se obtuvieron mediante el software SAGA GT-SSR versión 3.3, el cual es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR. La matriz de datos obtenidos de SAGA fue importada a Excel en donde se elaboró una matriz genotípica, donde fue depurada y guardada como matriz de texto delimitado por tabulaciones para importar al paquete estadístico Power Marker V3.0 (Liu & Muse, 2005).

2.3.10.1 Análisis de diversidad genética

Los parámetros de diversidad determinados obtenidos el programa Power Marker V3.0 fueron:

- Número de observaciones: Es el número de alelos o genotipos observados en la muestra. Se reconoce que un genotipo perdido cuando uno de los alelos está perdido. Si existen datos perdidos, disminuye el número de observaciones.
- Tamaño de la muestra: Número de accesiones analizadas.
- Frecuencia de alelos: Es el resultado de la división del número de veces que se presenta un gen para el número total de genes en la población.
- Número de genotipos generados.

- Número de alelos generados por locus.
- Heterocigosidad total u observada (H_o): Es la frecuencia de individuos heterocigotos en la población. Si la frecuencia de un alelo es muy alta, existe poca heterocigosidad. La heterocigosidad está dada por la ecuación a continuación.

$$H_o = \frac{N^\circ \text{ de genotipos heterocigóticos}}{N^\circ \text{ total de genotipos}}$$

- Diversidad genética o heterocigosis esperada (H_{exp}): Es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar sean diferentes. Está dada por la siguiente ecuación:

$$H_{exp} = 1 - \sum q_i^2 = 1 - (q_a^2 + q_b^2 + q_c^2 + d^2 + \dots q_k^2)$$

Donde:

q = frecuencia alélica de cada alelo en un loci

- Contenido de información de polimorfismo (PIC): Es la medida de la información de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Un alelo es polimórfico cuando su frecuencia es menor a 0.9.

2.3.10.2 Estructura genética

La matriz genotípica fue convertida en el software Power Marker V3.0, en una la matriz de distancia escogiendo la opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS). El cálculo de la distancia genética entre dos poblaciones da una estimación relativa del tiempo que ha transcurrido desde que las poblaciones se han establecido. Bajas estimaciones de distancia pueden indicar una subestructura de la población, o indicar que las poblaciones están separadas desde periodos cortos de tiempo. Con esta matriz se elaboró el árbol UPGMA, el cual está basado en una matriz de distancias genéticas individuales.

- **Análisis de agrupamiento y coordenadas principales**

Posteriormente en el software Power Marker V3.0, se elaboró una matriz de datos binarios (1 y 0), con la cual, se realizó la representación en árbol UPGMA en el software NTSYS, para representar las relaciones individuales entre accesiones. A su vez se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCO), que es una técnica de análisis para encontrar una configuración de puntos a partir de la matriz de distancias, que permite proyectar en un plano de dos o tres dimensiones el conjunto de muestras analizadas en función de sus relaciones sobre dos o tres ejes de varianza que explican una fracción mayoritaria de la diversidad total observada (Balzarini & Di Rienzo, 2004).

2.3.10.3 Análisis global

Gracias a datos previos obtenidos por Urgilez (2012), de las accesiones de aguacate de los valles interandinos del centro y norte del Ecuador fue posible verificar o medir la representatividad de la variabilidad genética de una colección en relación con la diversidad total o esperada. Estos análisis se hicieron con los materiales colectados en el Norte, Centro y Sur de los valles interandinos del Ecuador, no se incluyeron los materiales de la colección de trabajo de la Granja experimental Tumbaco del INIAP, debido a que estos materiales son introducidos y no representan variabilidad de los valles interandinos. Los estimadores usados para este fin fueron las estadísticas F que comparan la diversidad de las colecciones por Loci. La distancia genética de Nei que refleja el número de sustituciones nucleotídicas en el ADN, que permite comparaciones a distintos niveles (entre poblaciones, entre variedades o subespecies, entre especies). Por último un análisis molecular de varianza (AMOVA) que nos reflejaron la variación total entre y dentro de las provincias.

- **Estadísticas F**

Para calcular las estadísticas F se utilizó el software GenAlex ver. 6.5 (Peakall & Smouse , 2005), los parámetros son el índice de fijación (Fis o

correlación entre los genes de los individuos (I) y los de la subpoblación (S)), y el grado de divergencia entre las poblaciones (F_{st} o correlación entre los genes de la subpoblación y los de la población total). Estas estadísticas permiten describir la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg observable para poblaciones que están estructuradas asumiendo que todas las poblaciones están en un mismo sitio que contribuyen de igual manera al acervo genético, y las poblaciones están ubicadas cercanamente unas con otras.

El F_{st} mide la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg entre las subpoblaciones. Es un parámetro comúnmente utilizado para determinar si existe flujo de genes entre subpoblaciones. Este valor considera la correlación de genes entre individuos de una población en comparación con el conjunto de la población. El valor F_{st} se mide en una escala de 0 a 1, mientras mayor es el valor menos intercambio genético hay entre las poblaciones (Nei, 1973).

$$F_{st} = \frac{HT - HS}{HT}$$

Donde:

HT= Promedio de la heterocigosis esperada en la población total para todos los loci.

Hs= Promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci.

El F_{is} o coeficiente de consanguinidad intrapoblacional mide la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg en la subpoblaciones, es decir, estima la correlación de alelos entre individuos dentro de una subpoblación. Un F_{is} positivo indica un exceso de homocigotos y un valor negativo un déficit en homocigotos. Si dos o más subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas entonces la heterocigosis total se reduce, aún si las subpoblaciones mantienen el equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1973). El valor F_{st} se mide en una escala de -1 a 1.

$$F_{is} = \frac{HS - HI}{HS}$$

Donde:

Hs= Promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci.

HI= Promedio de la heterocigosidad observada para todas las subpoblaciones.

- **Análisis Molecular de Varianza**

EL AMOVA (análisis molecular de varianza), determina la diferenciación genética entre poblaciones y dentro de las poblaciones formadas en el estudio. Para calcular este parámetro se utilizó el programa GenALEx ver. 6.5.

- **Distancia genética de Nei**

La distancia genética es una cantidad proporcional a las diferencias genéticas existentes entre poblaciones, en función de las frecuencias genéticas. La distancia tiene un valor de cero si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas y de infinito si no comparten ningún alelo (Nei, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, 1987).

$$D = -Ln I$$

Donde:

D=Distancia genética de Nei

I = Número de Nei

$$I = \frac{\sum x_i Y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

Donde:

x = frecuencia de cada alelo para la población x

y = frecuencia de cada alelo para la población y

2.3.11 Identificación de duplicados

Por último se realizó la identificación de duplicados a través de genotipos multilocus microsatélites y por medio índice de similitud obtenido en el software Power Marker V3.0, el cual es 1 para los individuos clones.

2.4 Fase III: Caracterización morfológica

2.4.1 Características de la zona de estudio

La caracterización morfo-agronómica se realizó en la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco. De igual manera se registró los datos in situ de las variedades Nacionales de las cuales se va a coleccionar en la Zona Austral. A continuación se detalla la ubicación geográfica y condiciones agroclimáticas.

2.4.1.1 Ubicación geográfica

Provincia:	Pichincha
Cantón:	Quito
Parroquia:	Tumbaco
Altitud:	2348 msnm
Longitud:	78° 24 Oeste
Latitud:	0° 13 Sur

2.4.1.2 Características Ambientales

Temperatura promedio anual:	17,2° C
Precipitación promedio anual:	800 mm
Humedad relativa promedio:	75,23%
Zona Ecológica:	Bosque Seco Montano Bajo (bsMb)

2.4.2 Descriptores cualitativos y cuantitativos

Los descriptores morfo-agronómicos que se emplearon en este estudio, fueron los propuestos por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) (1995). El detalle de los 46 descriptores que se utilizaron se encuentra en el anexo A, de los cuales 10 son cuantitativos y 36 cualitativos.

2.4.3 Registro de Datos

La caracterización morfológica se realizó tomando datos de acuerdo a ciertos descriptores y parámetros propuestos por el IPGRI. Estos descriptores nos permitieron medir, registrar y evaluar los fenotipos de la colección de trabajo aguacate de la Granja Experimental Tumbaco (INIAP). Para lo cual se registró datos de cada árbol de acuerdo a los requerimientos de cada descriptor propuesto, los mismos que fueron asentados en el libro de campo. El muestreo para posterior análisis de fruto y semilla por la maduración, se realizó en fundas plásticas.

2.4.4 Matriz básica de datos

Se elaboró en Excel una matriz básica de datos (MBD) con la información y los datos obtenidos en la caracterización, la cual consistió en un arreglo con 32 filas para las accesiones existentes y con 46 columnas, una para cada variable o descriptor propuesto.

2.4.5 Análisis estadístico

De los caracteres evaluados se determinarán los estadísticos descriptivos, los datos se analizarán por componentes principales. Se realizará el análisis de conglomerados, el dendograma se construirá con base en el algoritmo UPGMA (agrupamiento de pares no ponderados con medias

aritméticas). El análisis estadístico se realizará con el programa InfoStat versión 2011.

2.4.5.1 Variables cualitativas

Con las variables cualitativas codificadas numéricamente se obtuvieron estimados univariados, los cuales incluyeron la moda, el coeficiente de variación y la desviación estándar por atributo (IPGRI, 2003).

2.4.5.2 Variables cuantitativas

Con las variables cuantitativas se realizó también el análisis univariado, obteniéndose por cada atributo como medida de tendencia central, la media y como medidas de dispersión, la desviación estándar, el coeficiente de variación y los valores máximos y mínimos (IPGRI, 2003).

2.4.5.3 Coeficiente de variación

El Coeficiente de Variación (CV) es una medida que define la magnitud de la variabilidad de los caracteres estudiados debido a que es independiente de las unidades de medida. Facilita la comparación de la variabilidad de una misma característica en grupos de accesiones (IPGRI, 2003).

$$CV = \bar{s}/ds$$

Donde:

\bar{s} : es el promedio

ds : desviación estándar

El Coeficiente de Variación para cada descriptor fue de gran importancia ya que permitió determinar las características con variabilidades significativas (CV superior al 20%) las cuales establecen diferencias y semejanzas (formación de conglomerados) entre las accesiones. Descriptores con

coeficientes inferiores a 20 % no inciden en la formación de conglomerados, los mismos que fueron descartados.

2.4.5.4 Coeficiente de correlación de Spearman

Los datos cuantitativos fueron caracterizados como datos cualitativos dando atributos, por medio de percentiles para tener una MBD uniforme y poder realizar una correlación de Spearman.

Este coeficiente es una medida de asociación lineal que utiliza los rangos, números de orden, de cada grupo de sujetos y compara dichos rangos (Pita & Pértega, 2001). Este coeficiente puede ser usado para medir asociaciones en variables cualitativas ordinales.

El cálculo del coeficiente viene dado por:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

Donde $d_i = r_{xi} - r_{yi}$ es la diferencia entre los rangos de X e Y

2.4.5.5 Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados es un método analítico que se aplica para clasificar las accesiones de un germoplasma en grupos homogéneos con base en alguna similitud existente entre ellas. Donde la formación de estos grupos puede obedecer a leyes naturales o a cualquier conjunto de características comunes a las accesiones (IPGRI, 2003). El método de conglomerados o análisis de *cluster* se puede aplicar sobre una matriz básica de datos $n \times p$, donde n es el número de accesiones que se quieren agrupar y p son las variables.

Con los descriptores agronómicos seleccionados de importancia y que no mostraron correlación se realizó un análisis multivariado de conglomerados,

el cual se basó en la obtención de una matriz de distancias entre partes de materiales, con el objeto de agrupar las accesiones y representarlas en un dendograma en base al Coeficiente de Ward.

2.4.5.6 Análisis de componentes principales

Desde el punto analítico, este método se basa en la transformación de un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. Los componentes deben ser interpretados independientemente unos de otros, ya que contienen una parte de la varianza que no está expresada en otro componente principal (IPGRI, 2003).

Con los atributos que exhibieron variabilidad, se realizó un análisis multivariado de componentes principales para determinar las características con mayor contribución a la expresión de la variabilidad total.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados del estudio de la diversidad genética del aguacate y la identificación de duplicados a través de la caracterización molecular de las accesiones colectadas (muestras de hojas jóvenes) en la Sierra Sur y las accesiones existentes en la Granja Experimental Tumbaco – INIAP. Adicionalmente, se realizó la caracterización morfológica de 32 materiales de aguacate de la colección de trabajo del INIAP.

3.1 Colecta de material vegetal

Se colectaron de 20 accesiones de aguacate, 10 varetas por accesión (Tabla 3.1). El material colectado fue injertado en patrones de aguacates Nacionales y plantados dentro de la colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco-INIAP.

Tabla 3.1: Descripción de las localidades donde se colectaron accesiones aguacate Nacional en la Sierra Sur del Ecuador, 2012.

Accesion N°	Provinc	Cantón	Parroquia	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m)
AG052	Azuay	Paute	Paute	Guayan	02°45'50''	78°43'45''	2315
AG053	Azuay	Paute	Paute	Guayan	02°45'52''	78°43'42''	2306
AG054	Azuay	Paute	Dug-Dug	Gauldeleg	02°45'12''	78°42'33''	2326
AG055	Azuay	Paute	Dug-Dug	San Francisco	02°44'30''	78°43'20''	2420
AG056	Azuay	Paute	Paute	Tutucan	02°46'56''	78°45'20''	2198
AG057	Azuay	Gualaceo	Gualaceo	Nallig	02°54'39''	78°47'17''	2255
AG058	Azuay	Gualaceo	Gualaceo	Calero	02°54'37''	78°47'20''	2272
AG059	Azuay	Gualaceo	Gualaceo	Nallig	02°54'49	78°47'22''	2277
AG060	Azuay	Gualaceo	Gualaceo	Bullcay	02°51'57''	78°46'44''	2252
AG061	Azuay	Oña	Oña	Yungillapamba	03°24'44''	79°08'56''	1974
AG062	Loja	Loja	Villcabamba	Sacapo	04°13'53	79°12'09''	1600
AG063	Loja	Loja	Villcabamba	Capulí	04°13'57''	79°12'02''	1626
AG064	Loja	Loja	Malacatos	Rumishitana	04°08'50''	79°12'28''	1807
AG065	Loja	Loja	San Sebastian	Dos puentes	04°04'42''	79°11'42	2279
AG066	Loja	Loja	Cristo Sacerdote	San Francisco	03°56'01''	79°13'27''	2008
AG067	Loja	Loja	Cristo Sacerdote	San Francisco	03°05'35''	79°13'31''	1987

Accesion N°	Provinc	Cantón	Parroquia	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m)
AG068	Loja	Loja	Villcabamba	Cucanama Bajo	04°15'05''	79°14'55''	1517
AG069	Loja	Loja	Villcabamba	Cucanama Bajo	04°15'05''	79°14'55''	1522
AG070	Loja	Loja	Villcabamba	San Torum	04°14'56''	79°16'48''	1462
AG071	Loja	Loja	Villcabamba	San Torum	04°14'58''	79°16'46''	1460

3.2 Caracterización molecular

3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN

Se realizaron pruebas preliminares con tres métodos de extracción de ADN Colombo (1998); PEX modificado por Jhingan (1992) y Ferreira & Grattapaglia (1998), este último resultado óptimo para hojas secas, obteniéndose una buena concentración de ADN con un promedio de 1208,1 ng/μl, de las 214 muestras recolectadas.

La cuantificación de ADN en geles de agarosa de los diferentes materiales de estudio, presentó bandas bien definidas (Figura 3.1). Con el fin de verificar la información obtenida en geles de agarosa, se realizó la cuantificación en el espectrofotómetro EPOCH, las concentraciones obtenidas se encuentra en el anexo E.

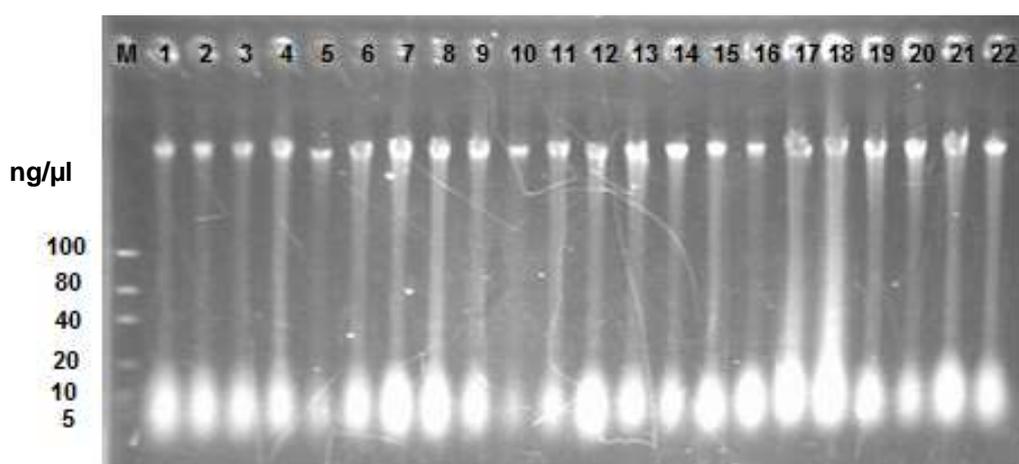


Figura 3.1: Cuantificación ADN genómico de aguacate en geles de agarosa al 1% (carril inicial: marcador de peso molecular Low Mass Ladder)

3.2.2 Validación de ADN con el primer AV1

La validación se realizó con el primer AV1 con el cual se obtuvo bandas de ADN bien definidas en los geles de agarosa al 2%. En la figura 3.2 se presenta la validación de algunas muestras.

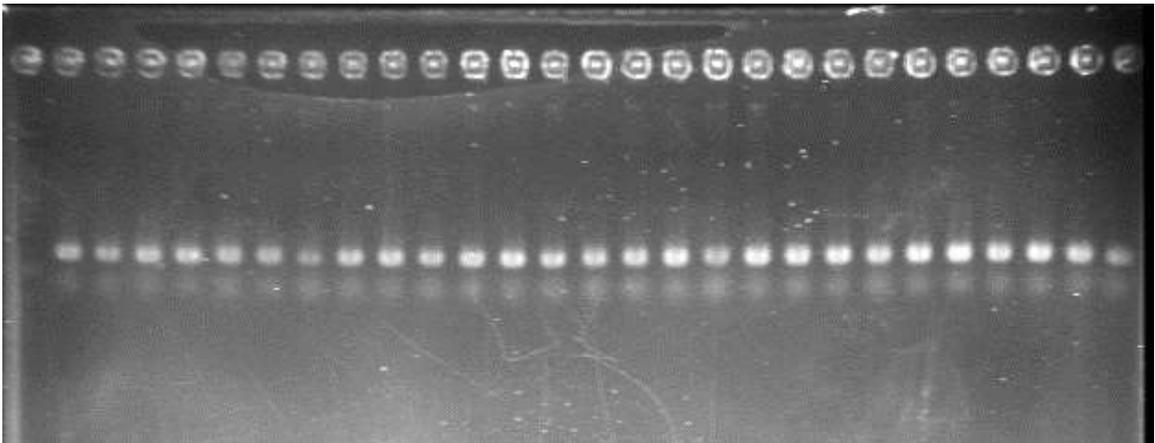


Figura 3.2: Muestras de ADN de aguacate validado, amplificados con el primer AV1, en geles de agarosa al 2% (Carril inicial: 100bp).

3.2.3 Pruebas de amplificación y “duplexaje” de SSR con la técnica M13 “*tailing*” para el analizador LI-COR 4300.

Con el fin de verificar las temperaturas de annealing óptimos, los pesos moleculares y los primers dúplex reportados por Urgilez (2012), se realizaron pruebas de amplificación con los 10 primers (Anexo F) en 9 accesiones de aguacate codificadas (1.1; 2.1; 3.1; 4.1; 5.1; 6.1; 7.1; 8.1 y 10.1). Resultado de estas pruebas (Figura 3.3), se comprobó que las temperaturas utilizadas fueron las adecuadas y que los primers amplificaron fragmentos de los tamaños esperados (Tabla 3.2).

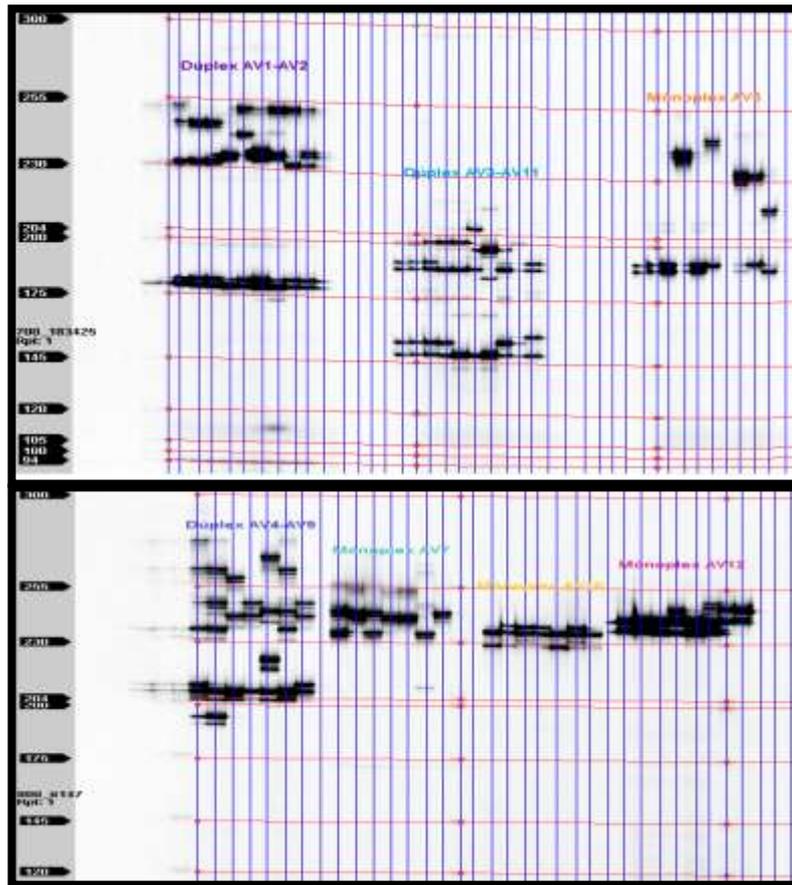


Figura 3.3: Pruebas de duplexaje en 700 nm (arriba) y 800 nm (abajo), en el LI-COR 4300

La figura 3.3 muestra la corrida electroforética de las muestras de aguacate en el Analizador LI-COR 4300, de los diez primers: Dúplex 1 (AV1 - AV2), Dúplex 2 (AV3 – AV11) Dúplex 3 (AV4 – AV9) y Mónoplex AV5, AV7, AV10 y AV12 en los cuales se puede observar buenos patrones de amplificación.

Al evaluar los 10 primers, permitió agruparlos en tres dúplex. La diferencia de pesos moleculares entre el primer AV1 y AV2, permitió formar el dúplex 1, ya que no se traslapan sus amplificaciones; el primero amplifica para alelos en un tamaño que va desde 160 a 200 pares de bases (pb), y el segundo en 220 a 225 (pb). El detalle del dúplex 2 y 3 se presenta en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Respuesta de los 10 primers a temperatura, peso molecular y fluorescencia en 9 muestras de aguacate.

	Locus	Tamaño (pb)	Temperatura °C	Marcaje de fluorescencia
Dúplex 1	AV1	160-200	51.5	700
	AV2	220-225		
Dúplex 2	AV3	145-170	51.5	700
	AV11	175-204		
Dúplex 3	AV4	160-200	52	800
	AV9	210-300		
Individuales	AV5	175-230	52	700
	AV7	160-200	50	800
	AV10	220-255	50	800
	AV12	230-255	59	800

3.2.4 Genotipaje en el equipo LI-COR

Con las temperaturas óptimas y los dúplex establecidos se corrieron las 214 muestras colectadas de aguacate en el equipo LI-COR 4300. Las imágenes obtenidas fueron genotipadas mediante el asistente de lectura SAGA GT Microsatellite versión 3.3. En el anexo G se muestra los patrones de bandas para los 10 microsatélites amplificados, en los cuales se puede distinguir los polimorfismos o alelos para cada locus. El locus AV5 fue el más polimórfico, mientras que el locus AV10 presenta menos patrones de bandas. En general, se obtuvo buena amplificación con todos los SSRs, excepto en el locus AV9, que se dificultó el genotipaje, debido a la presencia de bandas inespecíficas (*stutter bands*) que se confunden con los alelos.

Los pesos moleculares de los distintos locus, representados en las bandas de ADN genómico amplificado, se detallan con diferentes colores (Figura 3.4). Las accesiones de aguacate estudiadas que tienen una sola banda, representan a individuos homocigotos, mientras los que tienen dos bandas son individuos heterocigotos.

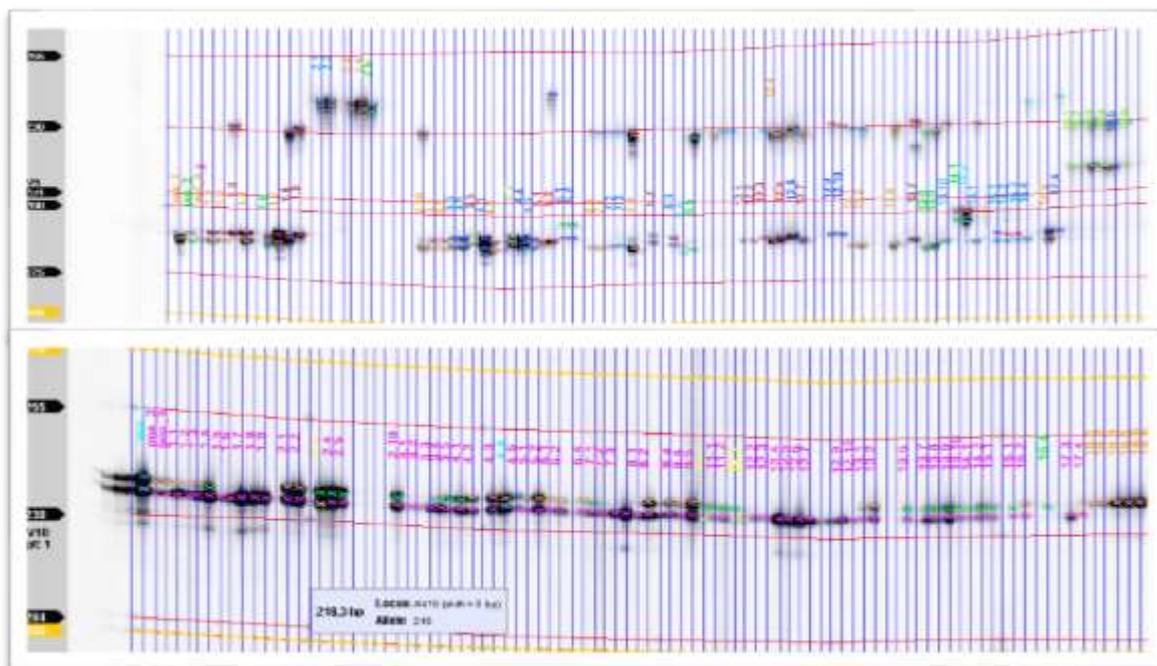


Figura 3.4: Arriba: Genotipaje del SSR AV5, siendo el más polimórfico; abajo: genotipaje del SSR AV10, el locus menos polimórfico.

1.2.5. Amplificación y genotipaje de gaps

Del genotipaje de las 214 muestras de aguacate con los 10 locus, en su mayoría (75%) presentaron bandas de ADN genómico bien definidas para cada locus, lo que permitió identificar los alelos de cada individuo; mientras que el 25 % de individuos estudiados, presentaron datos faltantes o gaps, los mismos que volvieron a ser cuantificados, validados y amplificados en el LI-COR 4300.

Una vez que se volvió a amplificar las muestras con gaps, en el LICOR 4300, se incorporaron en la matriz genotípica y se descartaron del análisis las muestras (4.4, 13.4, 2.8, 18.9, 27.9, 28.2, 28.3, 28.4, 31.3, 35.2, 36.4, AG052 y AG056) que tuvieron más del 30% de gaps.

3.2.5 Análisis estadísticos

Para obtener la matriz genotípica depurada (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), con los tamaños de los alelos adecuados para cada

accesión, se restó 19 (pb) de cada alelo debido a que estos son pertenecientes a la cola M13 que se le agrega al primer para que pueda unirse al marcaje de fluorescencia para visualizar en el equipo LICOR 4300.

3.2.5.1 Diversidad genética del aguacate

La diversidad genética está dada por el número de alelos, frecuencia alélica, genotipos, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y contenido de información polimórfica (Tabla 3.13).

Número de alelos

En la figura 3.5 se puede observar que el locus con mayor número de alélos (20) es el AV5, seguido del AV2 y el AV9 con 19; mientras, que el locus con menor presencia alélica es el AV10 con 4 alélos.

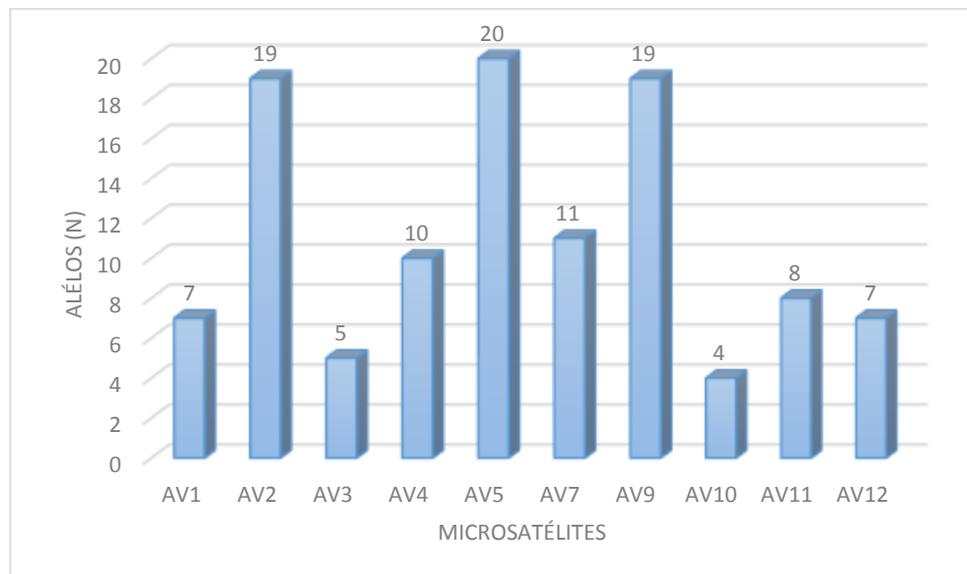


Figura 3.5: Número de alélos de 10 microsatélites utilizados en el genotipaje, para conocer la diversidad genética de aguacate.

Se registró en total 110 alelos en los 10 locus SSRs (microsatélites) analizados con un promedio de 11 alelos/locus en 200 muestras de aguacate estudiadas (Figura 3.5).

Frecuencias alélicas

En las tablas a continuación se presentan los locus SSR con sus alelos registrados y frecuencia alélica, en azul, se muestran los alelos menos frecuentes y en rojo, los alelos más frecuentes para cada locus.

Para el locus AV1 (Tabla 3.3) Ashworth & Clegg (2004) reportan un peso de 161 pares de bases, en el presente estudio se obtuvo la mayor frecuencia (0,4227) para el mismo alelo 161, mientras que el alelo 155 es el de menor frecuencia (0,0258) (Figura 3.6).

Tabla 3.3: Frecuencias alélicas para el locus AV1

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV1			
7	161	155	0,0258
		158	0,0438
		161	0,4227
		164	0,3325
		167	0,1082
		191	0,0387
		200	0,0284

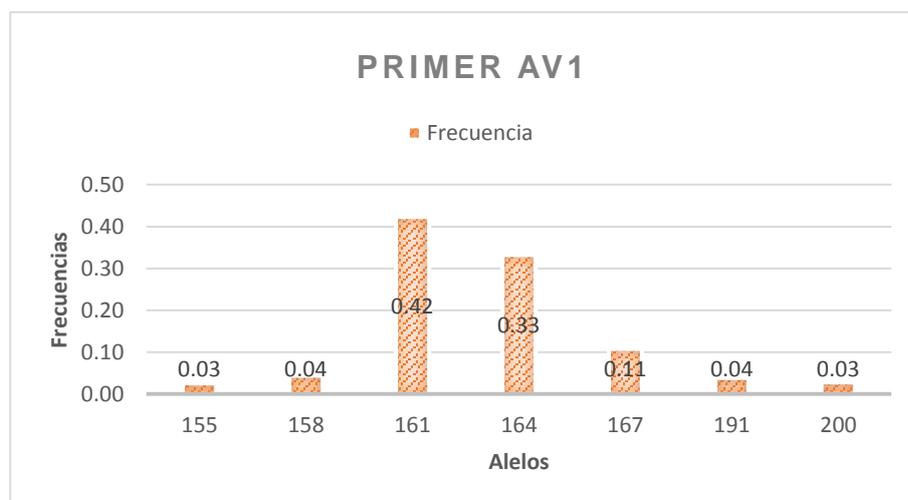


Figura 3.6: Frecuencias alélicas para el locus AV1

En el locus AV2 con 19 alelos (Tabla 3.4), Ashworth & Clegg (2004) reportan un peso de 216 pares de bases, en este estudio se obtuvo la mayor frecuencia (0,1710) para el alelo 234, seguido del alelo 216 (0,1528), mientras que el alelo 231 es el de menor frecuencia (0,0078) (Figura 3.7).

Tabla 3.4: Frecuencias alélicas para el locus AV2

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV2			
19	216	208	0,0389
		209	0,0440
		210	0,0959
		212	0,0155
		213	0,1010
		214	0,0259
		216	0,1528
		218	0,0777
		219	0,0570
		220	0,0104
		222	0,0389
		228	0,0337
		230	0,0233
		231	0,0078
		232	0,0337
		234	0,1710
		236	0,0181
		240	0,0311
		243	0,0233

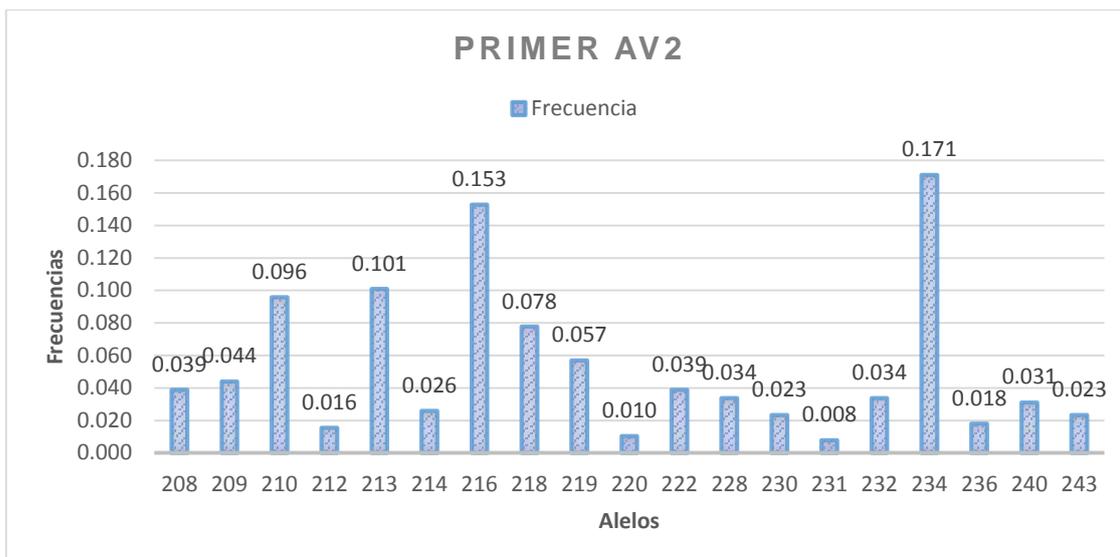


Figura 3.7: Frecuencias alélicas para el locus AV2

En el locus AV11 (Tabla 3.5), Ashworth & Clegg (2004) reportan un peso de 182 pares de bases, en el presente estudio este alelo presento una frecuencia de 0,1624. Por otro lado en este locus, el alelo 170 es el de mayor presencia (0,3273), por otro lado el alelo 167 fue el menos frecuente (0,0103) (Figura 3.8).

Tabla 3.5: Frecuencias alélicas para el locus AV11

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV11			
8	182	167	0,0103
		170	0,3273
		173	0,1985
		176	0,0593
		179	0,1211
		182	0,1624
		185	0,1082
		188	0,0129

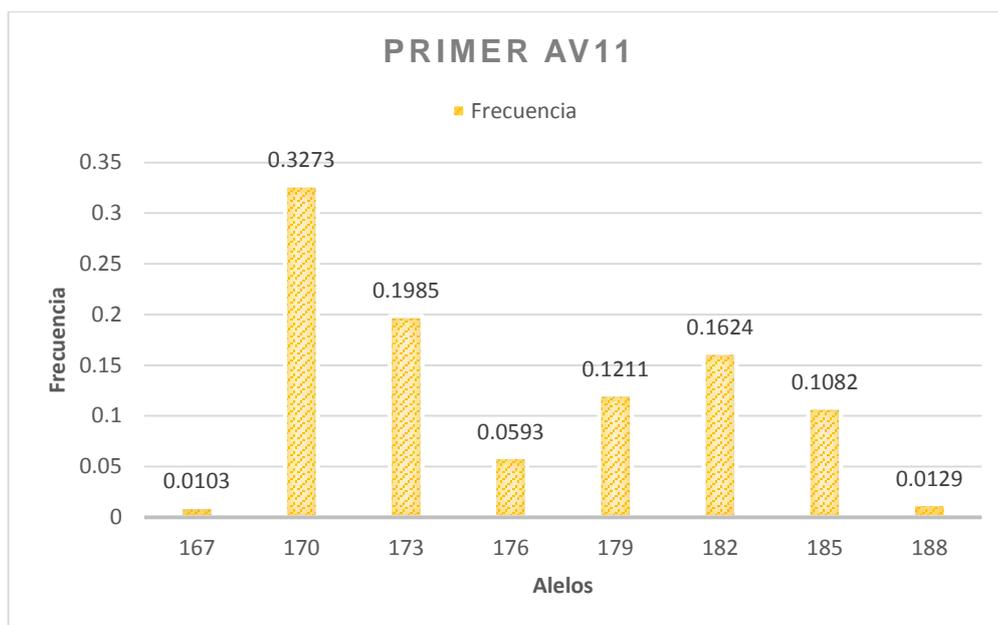


Figura 3.8: Frecuencias alélicas para el locus AV11

Ashworth & Clegg (2004) reportaron que el alelo 136 era el de mayor frecuencia en el locus AV3; sin embargo, en este estudio este alelo ocupó el segundo lugar en frecuencia (Tabla 3.6). La mayor frecuencia presentó el alelo 130 (0,5151), mientras que el alelo 133 (0,0327) es el que reporta menor frecuencia (Figura 3.9).

Tabla 3.6: Frecuencias alélicas para el locus AV3

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV3			
5	136	127	0,0503
		130	0,5151
		133	0,0327
		136	0,2965
		139	0,1055



Figura 3.9: Frecuencias alélicas para el locus AV3

El locus AV4 (Tabla 3.7) presenta una alta frecuencia alélica para el alelo 187 (0,5237), mientras que la frecuencia de los alelos 178 y 196 es mínima (Figura 3.10).

Tabla 3.7: Frecuencias alélicas para el locus AV4

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV4			
10	190	173	0,0237
		175	0,0763
		178	0,0053
		181	0,0079
		184	0,1053
		187	0,5237
		190	0,1684
		196	0,0053
		199	0,0447
		202	0,0395

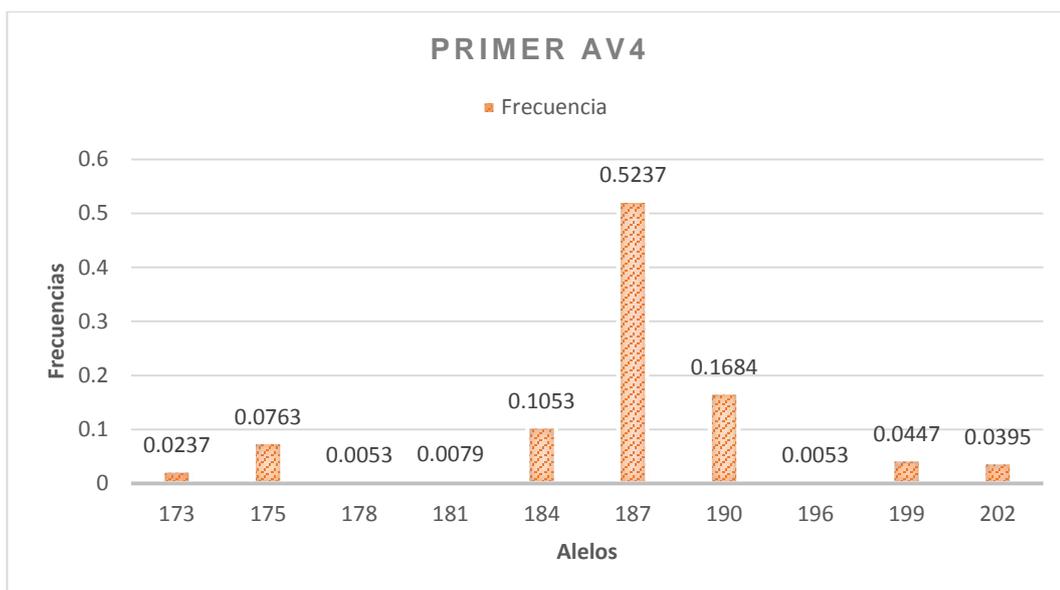


Figura 3.10: Frecuencias alélicas para el locus AV4

El locus AV9 (Tabla 3.8) es uno de los más polimórficos, con una mayor frecuencia alélica para el alelo 226 (0,1872), mientras que el alelo 214 fue el que presento menor frecuencia alélica (0,0026) (Figura 3.11).

Tabla 3.8: Frecuencias alélicas para el locus AV9

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV9			
19	228	214	0,0026
		216	0,0769
		218	0,0231
		220	0,1026
		222	0,1795
		224	0,0897
		226	0,1872
		228	0,1128
		230	0,0051
		232	0,0256
		236	0,0077
		238	0,0205
		242	0,0128

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
		244	0,0154
		246	0,0282
		248	0,0744
		252	0,0103
		254	0,0205
		256	0,0051

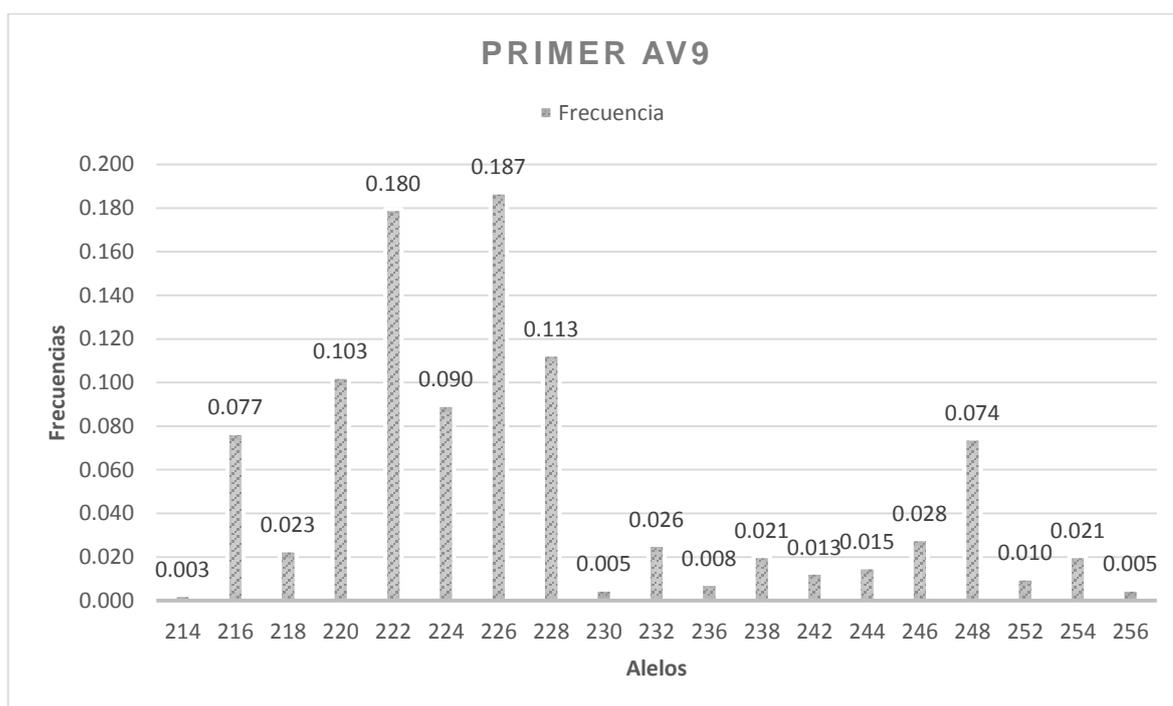


Figura 3.11: Frecuencias alélicas para el locus AV9

El locus AV5 (Tabla 3.9) es uno de los primers más polimórficos en este estudio, con una mayor frecuencia alélica para el alelo 173 (0,2433), mientras que los alélos 167, 179, 181 y 215 presentaron la menor frecuencia alélica (0,0053) (Figura 3.12).

Tabla 3.9: Frecuencias alélicas para el locus AV5

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV5			
20	211	167	0,0053

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
		169	0,2059
		171	0,0588
		173	0,2433
		175	0,0374
		177	0,0187
		179	0,0053
		181	0,0053
		195	0,0160
		197	0,0615
		205	0,0241
		209	0,0455
		211	0,0401
		213	0,1524
		215	0,0053
		217	0,0080
		219	0,0134
		221	0,0160
		223	0,0294
		225	0,0080

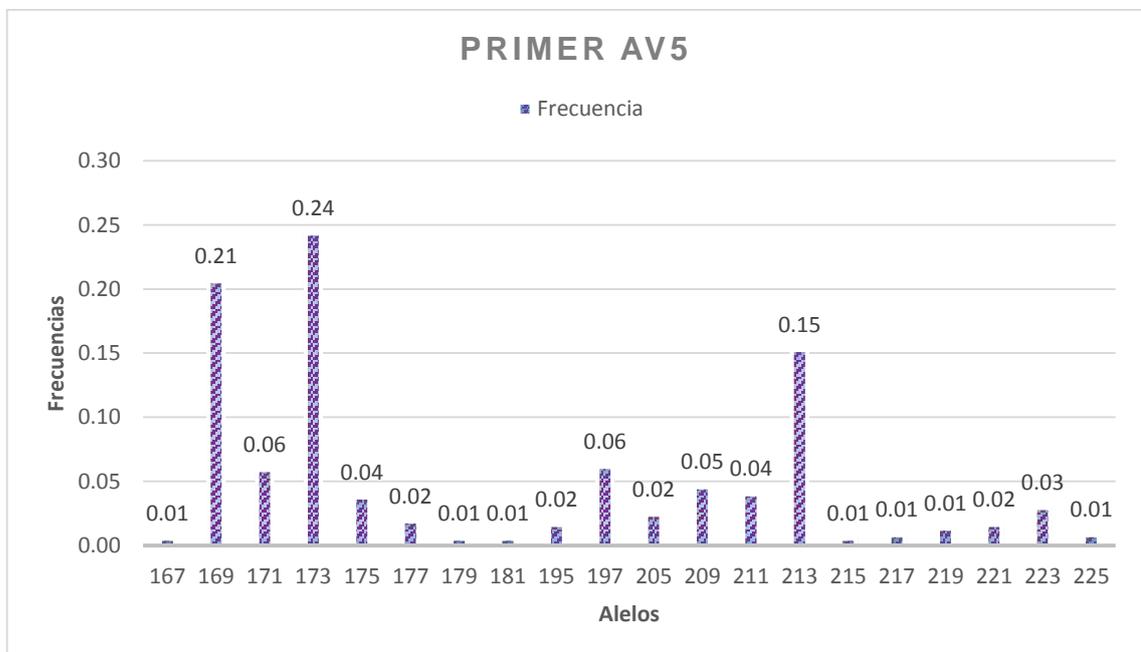


Figura 3.12: Frecuencias alélicas para el locus AV5

Ashworth & Clegg (2004) reportan un peso de 224 para el locus AV7, en el presente estudio se observó la mayor frecuencia alélica (0,4495) para el mismo alelo (224), por otro lado, el alelo que presentó menor frecuencia (0,0080) fue el 212 (Tabla 3.10, Figura 3.13).

Tabla 3.10: Frecuencias alélicas para el locus AV7

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV7			
11	224	202	0,0106
		212	0,0080
		214	0,2527
		220	0,0559
		222	0,0878
		224	0,4495
		226	0,0612
		228	0,0293
		230	0,0160
		240	0,0160
		244	0,0133

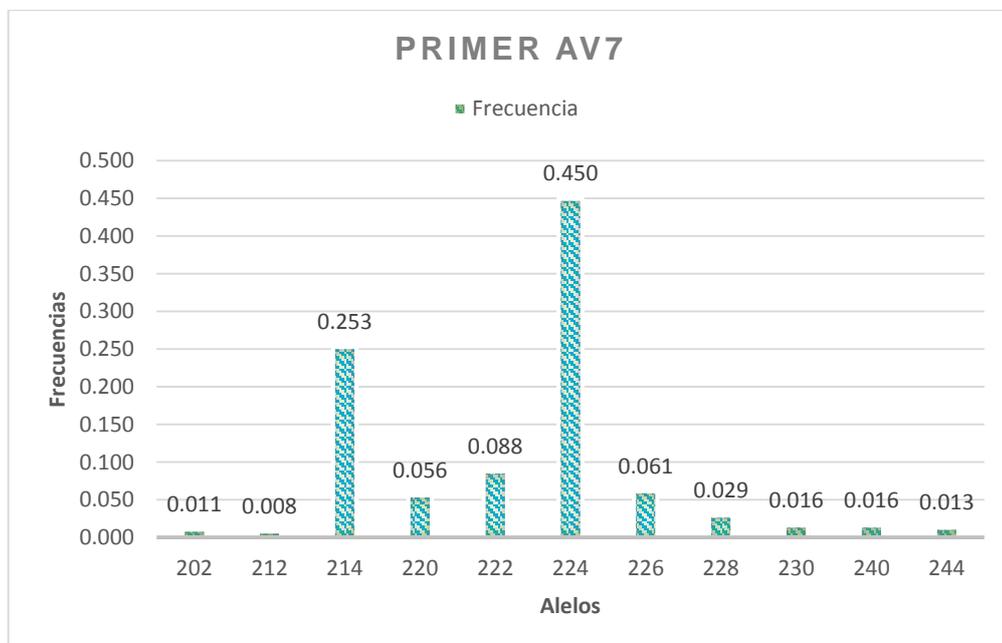


Figura 3.13: Frecuencias alélicas para el locus AV7

Para locus AV10 (Tabla 3.11), Ashworth & Clegg (2004) reportaron un peso de 170, el cual es 45 pb inferior al que se obtuvo en el presente estudio, con la mayor frecuencia alélica para el alelo 215 (0,6146), y una menor frecuencia para el alelo 212 (0,0026); siendo el locus con menor número de alelos (Figura 3.14).

Tabla 3.11: Frecuencias alélicas para el locus AV10

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV10			
4	170	212	0,0026
		215	0,6146
		218	0,3776
		221	0,0052

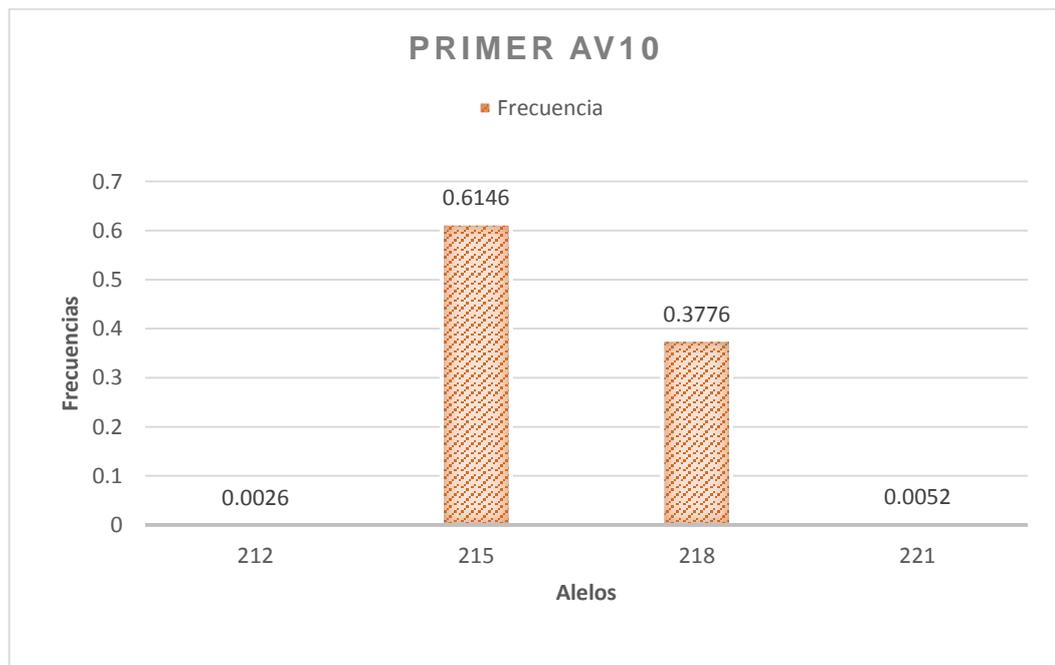


Figura 3.14: Frecuencias alélicas para el locus AV10

El locus AV12 (Tabla 3.12), presento la mayor frecuencia para el alelo 226 (0,3744), y una menor frecuencia para el alelo 214 (0,0051) (Figura 3.15).

Tabla 3.12: Frecuencias alélicas para el locus AV12

Número de alelos	Peso reportado (pb)	Alelo (pb)	Frecuencia alélica
AV12			
7	229	214	0,0051
		217	0,0590
		220	0,1590
		223	0,2077
		226	0,3744
		229	0,1718
		232	0,0231

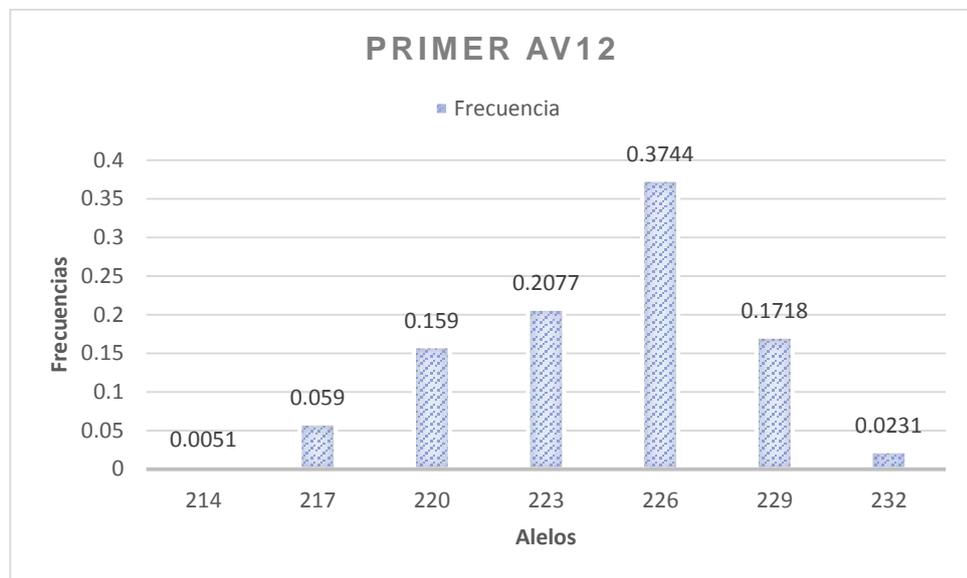


Figura 3.15: Frecuencias alélicas para el locus AV12

Genotipos

En la figura 3.16 se puede observar que el locus con mayor número de genotipos fue el AV2 con 60, mientras que el locus que presentó menor número de genotipos fue el AV10 con 6.

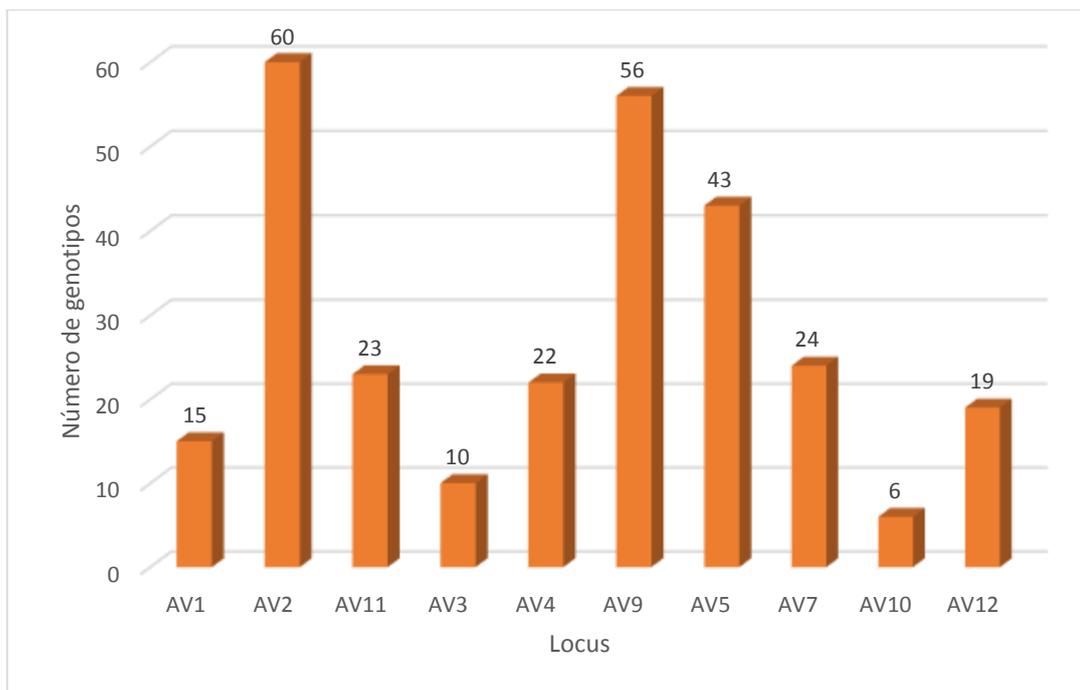


Figura 3.16: Número de genotipos de cada locus

Heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y contenido de información polimórfica

La información de diversidad genética obtenida del software Power Marker se presentan en la tabla 3.13 con un promedio el 96% de las muestras analizadas de aguacate, se obtuvo una heterocigosis observada (H_o) de 0,64 mientras que la heterocigosis esperada (H_e) fue de 0.74. El promedio del PIC de los 10 primers fue de 0.70, siendo el locus AV2 el que presento mayor PIC con 0,90 y el locus AV10 presento menor polimorfismo con un PIC de 0,37.

Tabla 3.13: Parámetros de diversidad genética de las 200 accesiones de aguacate amplificadas.

Marcador	Mayor frecuencia alélica	Número de genotipos	Número de alelos	Disponibilidad	Heterocigosis esperada	Heterocigosis observada	PIC
AV1	0,42	15,00	7,00	0,97	0,69	0,56	0,64
AV2	0,17	60,00	19,00	0,97	0,91	0,84	0,90
AV3	0,52	10,00	5,00	1,00	0,63	0,57	0,57
AV4	0,52	22,00	10,00	0,95	0,68	0,64	0,65
AV5	0,24	43,00	20,00	0,94	0,86	0,70	0,85

Marcador	Mayor frecuencia alélica	Número de genotipos	Número de alelos	Disponibilidad	Heterocigosis esperada	Heterocigosis observada	PIC
AV7	0,45	24,00	11,00	0,94	0,72	0,53	0,68
AV9	0,19	56,00	19,00	0,98	0,89	0,87	0,88
AV10	0,61	6,00	4,00	0,96	0,48	0,52	0,37
AV11	0,33	23,00	8,00	0,97	0,80	0,88	0,77
AV12	0,37	19,00	7,00	0,98	0,76	0,31	0,72
Promedio	0,38	27,80	11,00	0,96	0,74	0,64	0,70

3.2.5.2 Estructura genética

Análisis de agrupamiento

El dendograma UPGMA (Figura 3.17) nos indica la relación que existe entre las diferentes variedades de aguacate. Se pudo observar que la variedad Farchild se separa de todas las demás y de igual manera se puede distinguir dos grupos definidos, el primero con 4 variedades entre las cuales están el híbrido 14366, el Naval, el Guayllabamba y el Reed, estos dos últimos claramente emparentados.

El resto de las accesiones forman el otro grupo, donde también podemos distinguir alto grado de parentesco entre las accesiones Nacionales de la colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco (Nacio) y las accesiones Nacionales colectadas en el austro (AG), de igual manera para los ecotipos híbrido 14371 con híbrido 14361.

En la figura 3.18 se puede observar que los materiales no forman conglomerados sin embargo se pueden distinguir agrupaciones por ecotipos presentando mayor similitud entre estos, por otro lado la accesión AG061 difiere del resto de materiales siendo una accesión excluida.

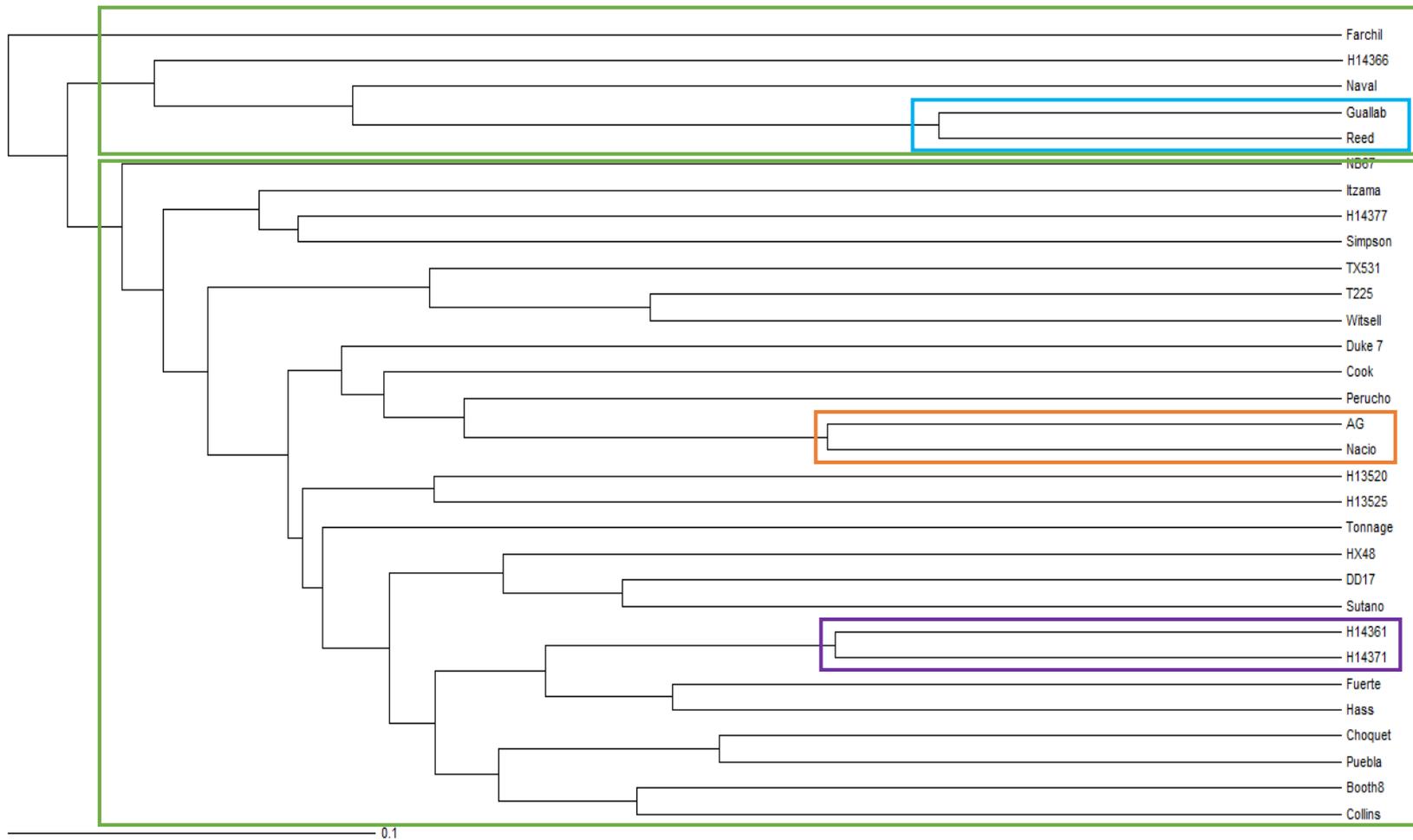


Figura 3.17: El dendrograma formado a partir de la matriz de distancia de Jaccard las diferentes variedades de aguacate obtenido del software PowerMarker, en color verde se distinguen los dos grupos formados.

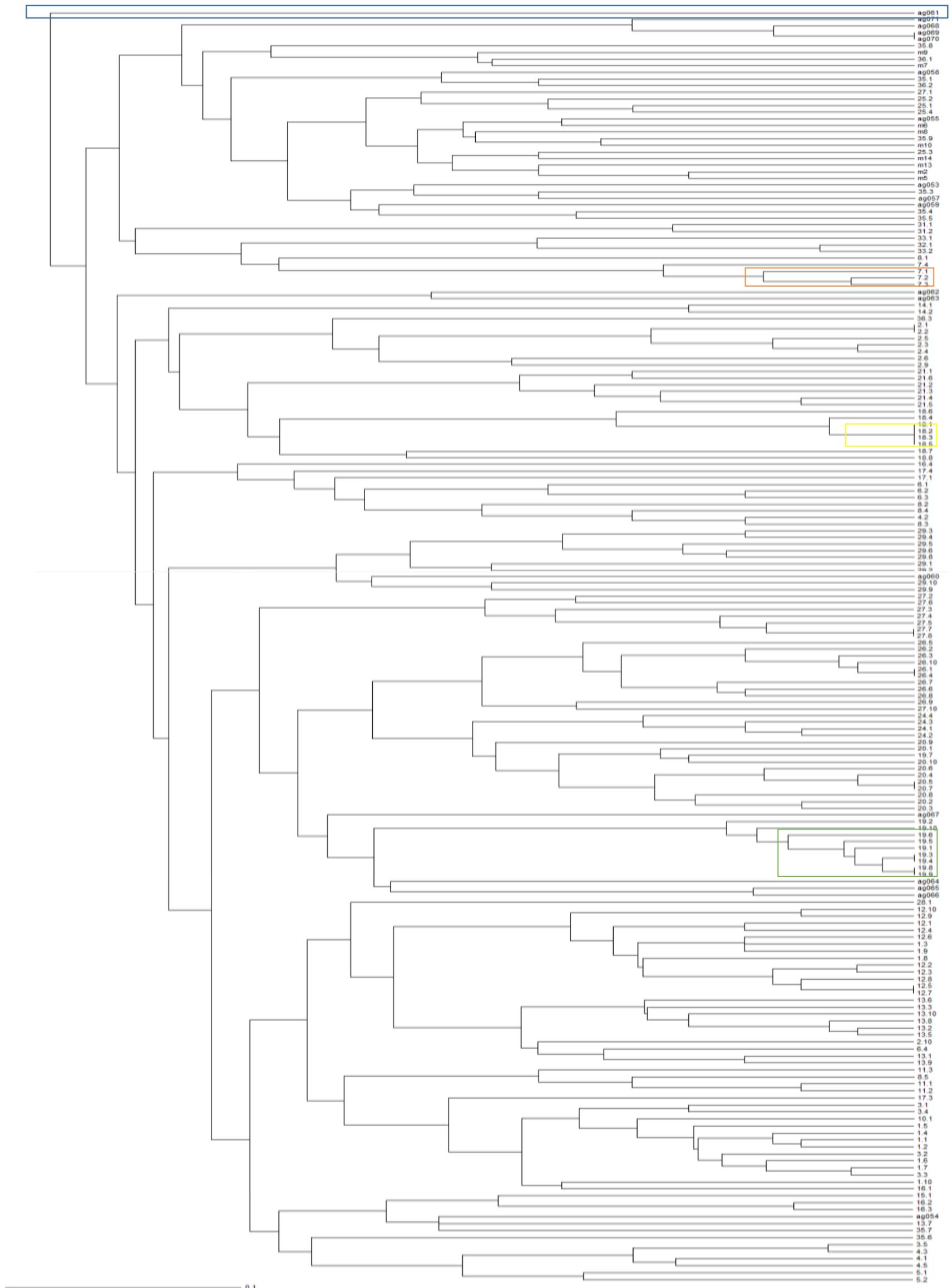


Figura 3.18: El dendograma formado a partir de la matriz de distancia de Jaccard las diferentes variedades de aguacate obtenido del software PowerMarker, en color verde se distinguen los dos grupos formados.

Análisis de datos multivariados

En la figura 3.19 del análisis de coordenadas principales en dos dimensiones se diferencia claramente las accesiones de la variedad TX 531 (en color verde). Sin embargo, no se distingue una conformación de grupos definidos.

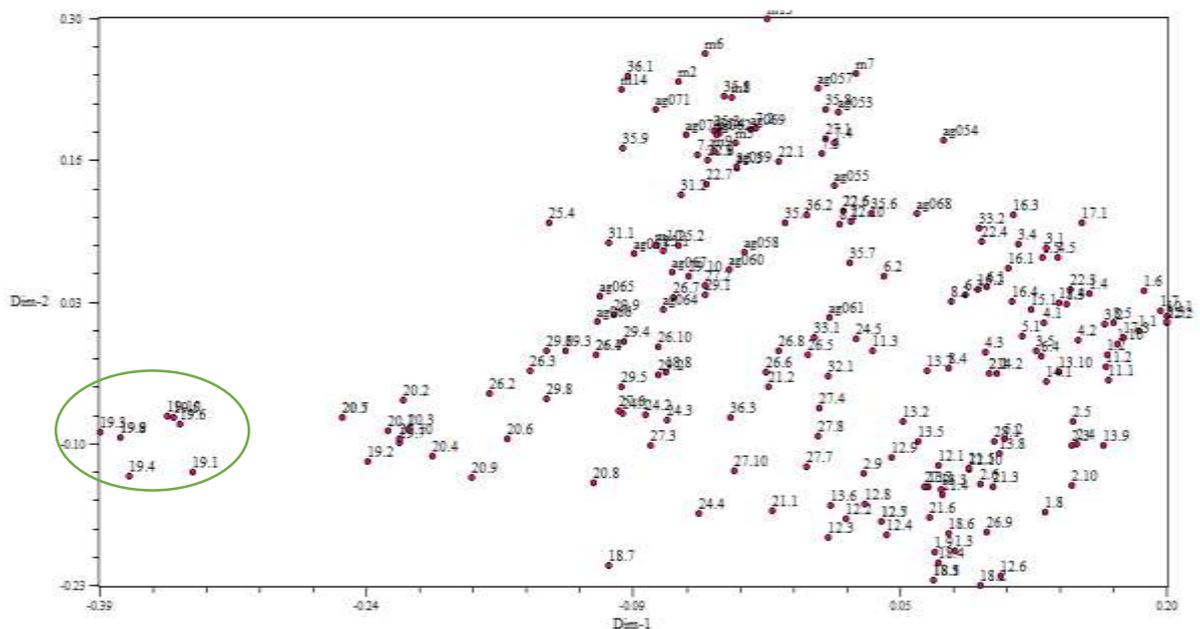


Figura 3.19: Análisis de coordenadas principales (PCO) de 200 muestras de aguacates analizados con 10 primeros SSRs, en las dos primeras coordenadas.

Mediante el análisis de coordenadas principales se obtuvieron los ejes de varianza con mayor porcentaje, para lo cual se calculó los valores Eigen (Tabla 3.14), que indican el porcentaje individual y acumulado de la variabilidad que se encuentra en cada una de las coordenadas. El valor eigen para el primer eje x es de 8,91% de varianza, y para el segundo eje dio un valor de 8,06% lo que nos da un índice de variabilidad total de 16,98%. Estos resultados confirman la falta de estructuración, sin embargo discriminan algunas accesiones.

Tabla 3.14: Valores eigen obtenidos a partir del análisis de coordenadas principales de 200 materiales de aguacate analizados con 10 primers SSRs.

i	Valor Eigen	Porcentaje	Acumulado
1	3.27490772	8.9191	8.9191
2	2.96150938	8.0656	16.9847
3	2.46564053	6.7151	23.69

En la figura 3.20, el análisis de coordenadas principales presenta una tercera coordenada que muestra un 6.71% de variabilidad adicional (Tabla 3.14), lo que suma un acumulado de 23.69% de la variabilidad total observada. En este gráfico se puede apreciar la distribución espacial de las 200 accesiones, en la cual se pueden distinguir la separación clara de los ecotipos NB67 (18), TX531 (19), Híbrido 14366 (7) y el cultivar colectado en Oña AG-061 que también difiere de todas las demás en el dendograma UPGMA.

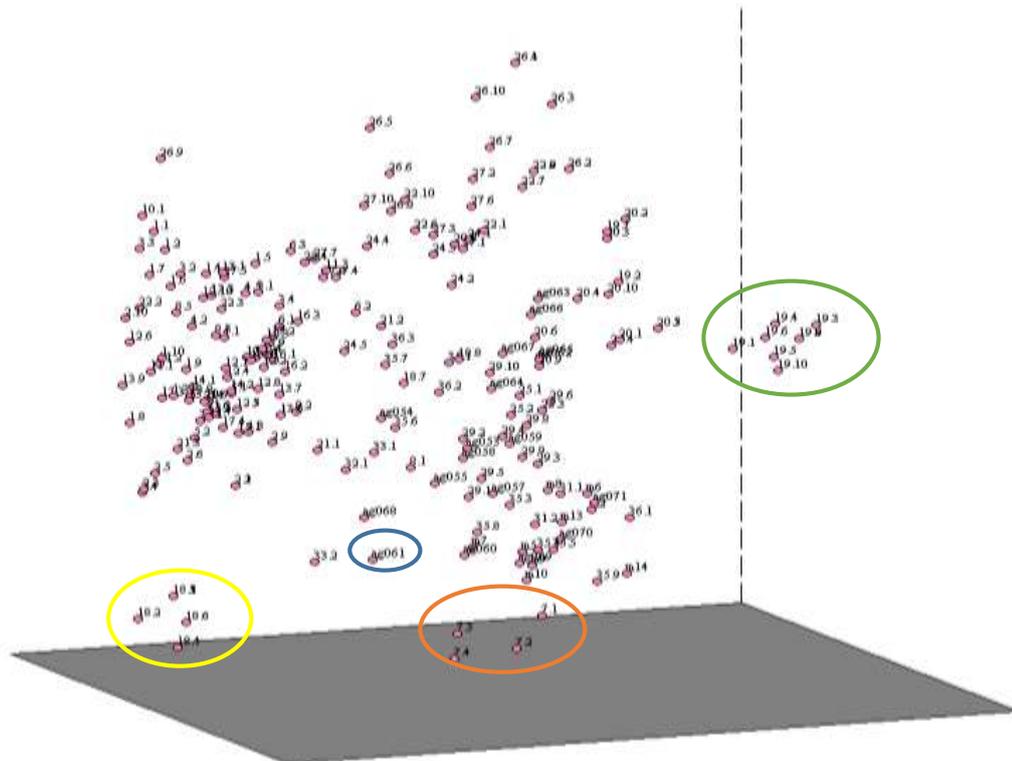


Figura 3.20: Análisis de coordenadas principales de 200 muestras de aguacate analizados con 10 primers SSRs, visto en tres coordenadas.

3.2.5.3 Análisis global

Análisis de coordenadas principales

En la figura 3.21 se representa el análisis de coordenadas principales global, de la colección realizada en el Centro y Sur como la realizada en el Centro y Norte (en morado), 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.

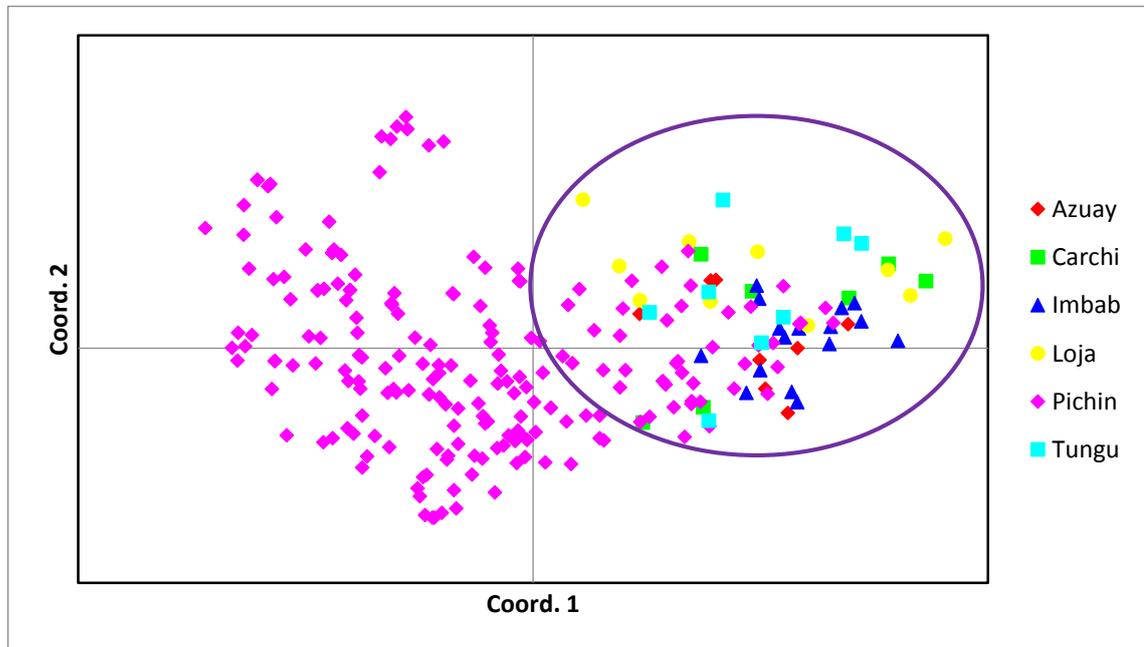


Figura 3.21: Analisis de conglomerados por provincias

Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

Para determinar si existe o no una diferencia genética significativa se realizó un análisis molecular de varianza o AMOVA.

- **Análisis molecular de varianza global**

El análisis molecular de varianza global muestra a diferenciación genética de todos los materiales de aguacate que se encuentran en la Colección de Trabajo de la Granja Experimental Tumbaco-INIAP. El número de individuos es 248, el número de provincias es 6 (Carchi, Imbabura, Pichincha Tungurahua, Azuay y Loja) y el número de regiones es 1 (Región Interandina). Los cálculos se realizaron con un número de permutaciones de 999.

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.



Figura 3.22: Porcentajes obtenidos del AMOVA

Tabla 3.15: 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%

- **Análisis molecular de varianza entre las colectas del norte y sur**

El análisis molecular de varianza de las colectas muestra la diferenciación genética entre de los materiales de aguacate colectados en las provincias del centro-norte (Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua) y las provincias del sur (Azuay y Loja). El número de individuos para el centro-norte es 35 y para el Sur es 18. Los cálculos se realizaron con un número de permutaciones de 999.

Los datos obtenidos del AMOVA se resumen en la tabla 3.16, mostrando una diferenciación de 4% procedentes de las diferentes entre las provincias del Norte y el Sur, y el 96% corresponde a la variación observada entre individuos dentro de las regiones (Figura 3.22). Estos resultados comprueban la falta de estructura poblacional entre los individuos analizados en el presente estudio.

Tabla 3.16: Resultados del análisis molecular de varianza entre la región centro-norte y sur

Origen	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Est. Var.	% de variación genética
Entre regiones	1	19.469	19.469	0.374	4%
En las regiones	51	517.267	10.142	10.142	96%
Total	52	536.736		10.517	100%

3.2.5.3.1 Estadísticas F

Las estadísticas F obtenidos en el software GenAlex indican un valor F_{st} (coeficiente de coancestro) de 0,137 y un F_{is} (coeficiente de consanguinidad o endogamia intrapoblacional) de 0,158, valores significativos al 95%. Esto nos quiere decir que el 13,7% de la variación genética observada corresponde a diferencias entre las 6 provincias. Un valor de F_{is} de 15,8% determina el porcentaje de variación dentro de cada provincia (Tabla 3.17).

Según las circunstancias de equilibrio de Hardy y Weinberg, existe una falta de heterocigotos con respecto a lo esperado, debido a que los valores Fis para todos los loci fueron positivos, excepto para el loci AV11 el cual dio un valor negativo de -0,055 lo cual nos dice que hay mayor número de heterocigotos.

Tabla 3.17: Cálculo de parámetros F para 248 materiales de aguacate obtenidas del análisis de polimorfismo de 10 locus SSR

	Fis	Fst
AV1	0.286592	0.125152
AV2	0.082362	0.103469
AV11	-0.060426	0.064122
AV3	-0.006048	0.058774
AV4	0.386215	0.221812
AV9	0.017841	0.094695
AV5	0.236595	0.190344
AV7	0.411104	0.199551
AV10	0.152375	0.260035
AV12	0.217183	0.077449
Total	0.158538	0.137973

3.2.5.3.2 Distancia Genética de Nei

La mayor similitud se observó para las provincias de Carchi e Imbabura con una distancia de Nei de 0.166, mientras la mayor diferenciación es para las provincias de Pichincha y Tungurahua con una distancia de 0.61 (Tabla 3.18).

Tabla 3.18: Cálculos de distancia de Nei entre las seis provincias donde fueron recolectadas las muestras de aguacate.

Azuay	Carchi	Imbabura	Loja	Pichincha	Tungurahua	
0.000						Azuay
0.343	0.000					Carchi
0.312	0.166	0.000				Imbabura
0.319	0.495	0.473	0.000			Loja
0.432	0.564	0.569	0.582	0.000		Pichincha
0.609	0.339	0.312	0.506	0.617	0.000	Tungurahua

Identificación de duplicados

A partir del análisis de agrupamiento se pueden distinguir algunos materiales duplicados, (Tabla 3.19); por ejemplo, en el caso de las accesiones NB-67 tiene cuatro plantas clones. El mapa de la colección de trabajo de la granja experimental Tumbaco se encuentra en el anexo I, en el mismo se indica materiales que mostraron identidad molecular, por lo cual se estableció que son clones.

Tabla 3.19: Representación de los clones determinados en el estudio

Ecotipos	Clones			
Nacional	AG-069		AG-070	
Híbrido 13520	2.1		2.2	
Hass	12.5		12.7	
NB-67	18.1	18.2	18.3	18.5
TX-531	19.3		19.4	
TX-531	19.8		19.9	
T225	20.5		20.7	
DD17	26.1		26.4	
HX48	27.7		27.8	

3.3 Caracterización morfológica

El registro de los descriptores morfológicos tomados en la colección de trabajo de aguacate de la Granja experimental Tumbaco-INIAP, se detallan en el anexo C.

Para el análisis de la variabilidad morfológica entre los ecotipos de la colección de trabajo de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco, se detalla para las variables cuantitativas, las medidas de resumen estadísticas (valor máximo, mínimo, desviación estándar) y el coeficiente de variación. En el caso de las variables cualitativas, se analizó las modas y frecuencias.

En la tabla 3.20 se presentan los parámetros estadísticos descriptivos de las 10 variables cuantitativas evaluadas en los ecotipos de aguacate. En color celeste se especifica las variables con un coeficiente de variación >20.

Tabla 3.20: Parámetros estadístico resumen de las 10 variables cuantitativas evaluadas en 32 ecotipos de aguacate en la Granja Experimental Tumbaco-INIAP.

Variables cuantitativas	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
Longitud de la lámina foliar	107.90	182.75	148.89	19.29	12.96
Número de flores por inflorescencia	34.00	72.00	51.31	9.24	18.01
Número de ramificaciones por inflorescencia	4.00	7.00	4.81	0.93	19.35
Número de días de floración a madurez de fruto	188.00	353.00	286.41	42.62	14.88
Longitud del fruto	70.77	151.19	110.08	20.07	18.23
Diámetro del fruto	47.02	93.27	76.05	12.52	16.46
Peso del fruto	90.40	587.56	321.43	110.34	34.33
Longitud de la semilla	27.20	63.33	46.18	9.01	19,51
Diámetro de la semilla	23.40	57.40	41.28	7.95	19,27
Peso de la semilla	13.20	81.80	46.30	15.93	34,41

En la tabla 3.21 se presentan los parámetros estadísticos de las 36 variables cualitativas evaluadas en las accesiones de aguacate. En color celeste las variables con mayor significancia (CV>20).

Tabla 3.21: Parámetros estadísticos de las 36 variables cualitativas evaluadas en 32 ecotipos de aguacate en la Granja Experimental Tumbaco-INIAP.

Variables cualitativas	Moda	Coefficiente de variación (%)
Ángulo de inserción de las ramas principales	Agudo (<90°)	31.91
Color de la rama joven	Verde	32.26
Color de las lenticelas del vástago joven	Verde	37.57
Forma de la hoja	Oblonga-lanceolada	25.67
Forma de la base de la hoja	Aguda	27.08
Color de las hojas maduras	Verde claro	24.89
Ángulo de inserción del peciolo foliar	Agudo (<90°)	0.00
Margen de la hoja	Entero	35.77
Forma del ápice de la hoja	Intermedio	31.77
Textura de la hoja	Semidura	24.89
Olor a anís	Tenue	35.33
Época de floración y duración	Segundo trimestre	31.70
Floración secundaria	Presente	35.65
Tipo de floración	Tipo A	35.77
Época de fructificación	Segundo cuatrimestre	21.89
Hábito de fructificación	Frutos solitarios	35.65
Forma del fruto	Obovado-angosto	37.78
Forma de la base del fruto	Puntiaguda	33.67
Forma del ápice del fruto	Redondeado	11.73
Posición del ápice del fruto	Asimétrico	17.92
Aristas en el fruto	Ausente	53.76
Brillantes de la cáscara del fruto	Moderada	20.71
Posición del pedicelo en el fruto	Central	37.03
Forma del pedicelo	Cónico	33.11
Color del pedicelo	Verde	44.18
Superficie de la cáscara del fruto	Intermedia	27.87
Color de la cáscara del fruto	Verde	74.42
Grosor de la cáscara del fruto	1 milímetro	30.01

Color de la pulpa cercana a la cáscara	Verde claro	12.98
Color de la carne cercana a la semilla	Amarillo claro	39.66
Textura de la pulpa	Cremosa	27.56
Dulzura de la pulpa	Ligeramente dulce	11.54
Fibra en la pulpa	Poca	28.56
Forma de la semilla	Ovada ancha	50.87
Posición de la semilla en la fruta	Apical	21.88
Espacio libre de la cavidad de la semilla	Sin espacio	14.94

El descriptor ángulo de inserción del peciolo foliar, no presento variabilidad, es decir todos los materiales presentaron el mismo dato para este descriptor, por lo cual fue descartado del análisis.

Del análisis de correlación de Spearman tanto en las variables cualitativas como cuantitativas, se pudieron discriminar las variables que tienen una correlación mayor al 95%; las cuales fueron: ángulo de inserción de las ramas principales, color de la rama joven, color de las lenticelas del vástago joven, forma de la hoja, textura de la hoja, peso del fruto, brillantes de la cáscara del fruto, superficie de la cáscara del fruto y posición de la semilla en el fruto (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

3.3.1 Frecuencias de cada descriptor

3.3.1.1 Peso del fruto

En la figura 3.23 se puede observar la variación entre ecotipos, en Itzama se puede ver que los frutos muestran un rango de 439.6 g a 755 g con un promedio de 587.56 g; mientras que en otras accesiones (Nacional, Híbrido 14361, Híbrido 14371) la variación de pesos es mínima.

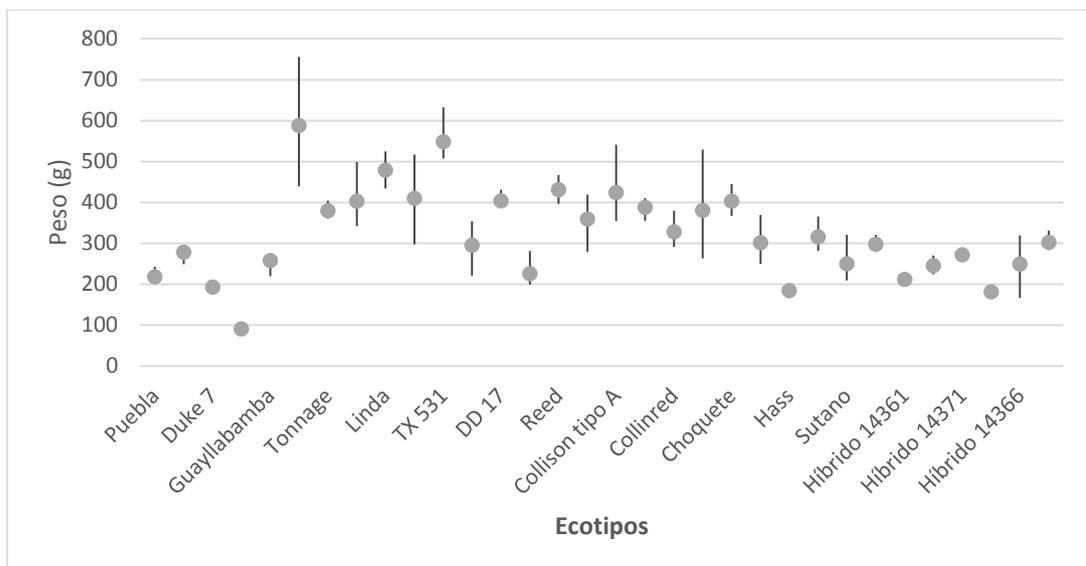


Figura 3.23: Representación de la variación del peso del fruto de cada ecotipo con valor mínimo, máximo y promedio.

3.3.1.2 Peso de la semilla

Con respecto al peso de la semilla, se determinó que éste no está relacionada con el peso de la semilla, por ejemplo el ecotipo que mayor variabilidad presentó fue NB67; mientras que en Itzama que fue el ecotipo con mayor variación en fruto, en semilla la variación no es muy representativa; en algunas accesiones (Reed, Híbrido 13525) la variación es mínima (Figura 3.24).

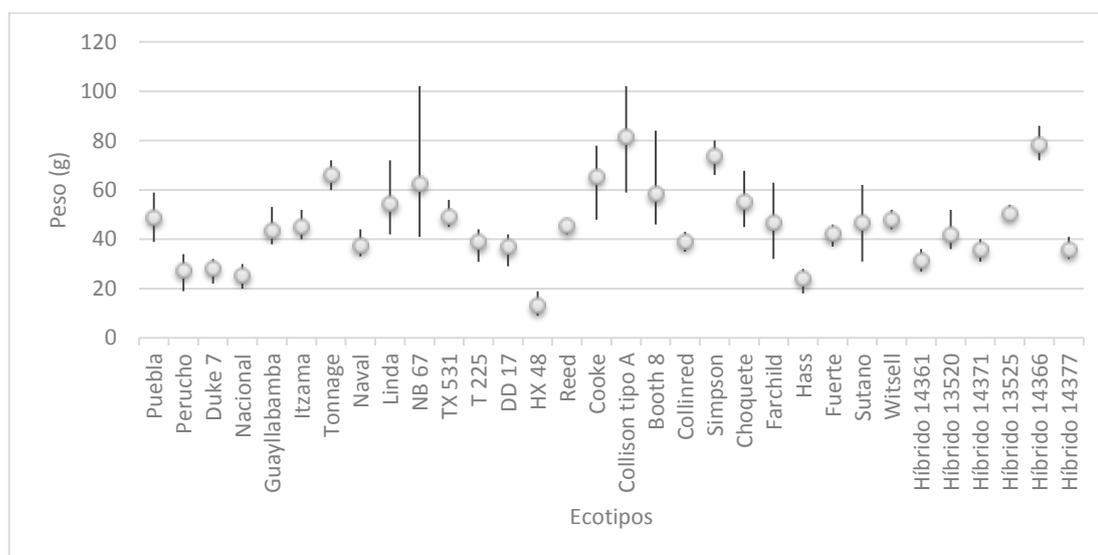


Figura 3.24: Representación de la variación del peso de la semilla de cada ecotipo con valor mínimo, máximo y promedio.

3.3.1.3 Ángulo de inserción de las ramas principales

En lo que respecta al ángulo de inserción de las ramas principales 27 materiales poseen todas sus ramas con un ángulo de inserción agudo, mientras que 5 materiales poseen ramas con un ángulo obtuso de inserción (Figura 3.25, anexo D).

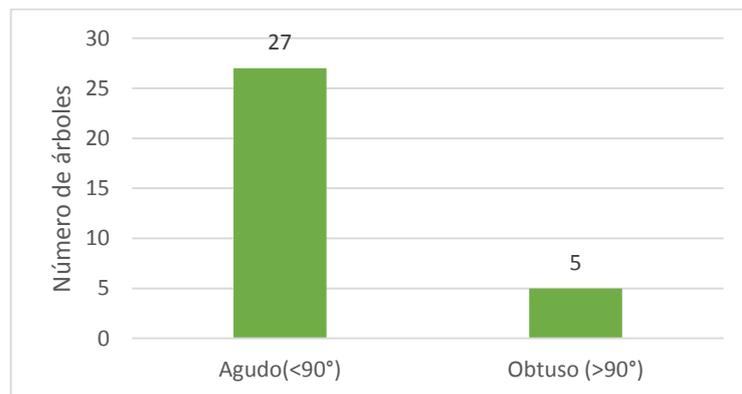


Figura 3.25: Ángulo de inserción de las ramas principales.

3.3.1.4 Color de la rama joven

Este descriptor consta de 4 categorías (Anexo D), en los árboles de aguacate de este estudio solo se encontró solamente 2, siendo la mayoría de color verde (18) y un número menor de color amarillo (14) (Figura 1.1).

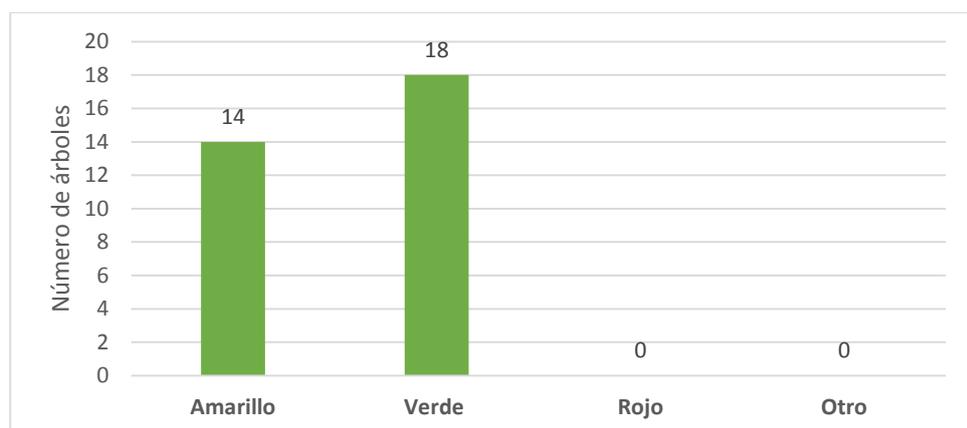


Figura 3.26: Color de la rama joven.

3.3.1.5 Color de las lenticelas del vástago joven

En esta característica destaca el color verde de las lenticelas del vástago joven (23) en los árboles caracterizados de la granja experimental Tumbaco (Figura 3.27), mientras que el color rojo en las lenticelas presentó solo la variedad Fuerte, por otro lado, los materiales Cooke y Booth 8 no presentaron lenticelas.

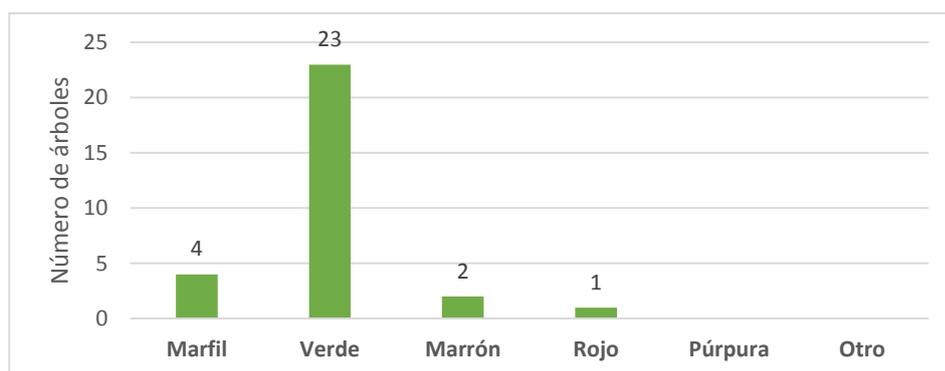


Figura 3.27: Color de las lenticelas del vástago joven.

3.3.1.6 Forma de la hoja

La forma de hoja que se presentó comúnmente fue la oblonga lanceolada presentándose en 17 árboles (Figura 3.28), mientras que la menos frecuente fue la forma redondeada, presentándose esta característica solamente en el ecotipo Farchild.

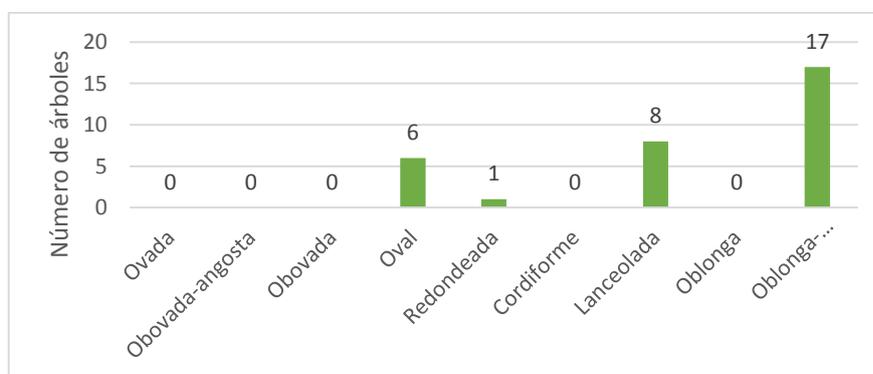


Figura 3.28: Frecuencias de la forma de la hoja.

3.3.1.7 Forma de la base de la hoja

La forma de la base de la hoja que sobresale es la aguda (29), mientras que la forma obtusa es la que se presenta en menor frecuencia (Figura 3.29).

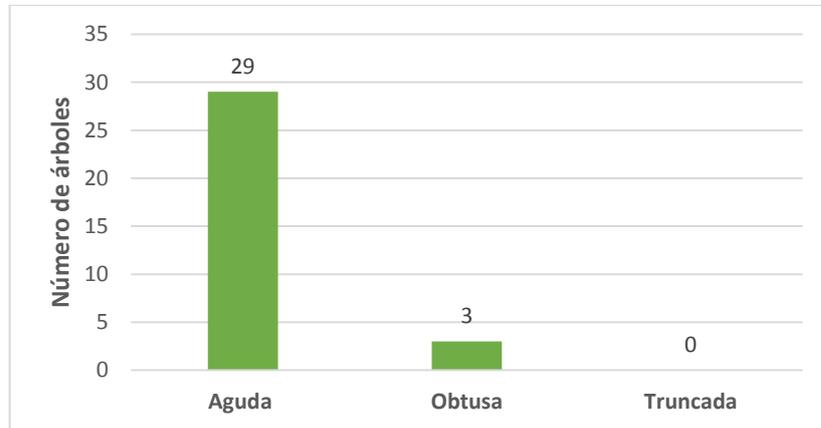


Figura 3.29: Frecuencias observadas de la forma de la base de la hoja.

3.3.1.8 Color de las hojas maduras

El color verde oscuro (18) se observó en mayor frecuencia en los ecotipos estudiados, mientras que el color verde claro (2) fue el de menor frecuencia en hojas maduras (Figura 3.30), presentándose en los materiales Farchild y Choquete.

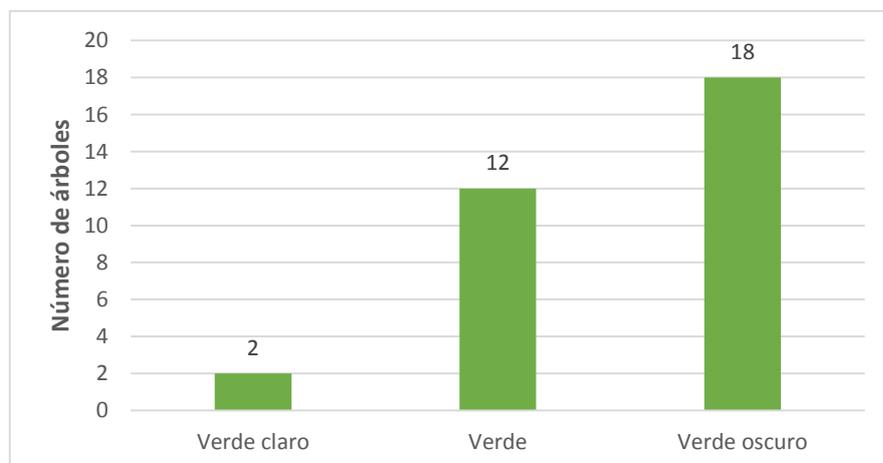


Figura 3.30: Color de las hojas maduras.

3.3.1.9 Margen de la hoja

El margen de la hoja puede ser entero u ondulado, esta característica se observa indistintamente del origen racial en aguacate. La frecuencia fue de 20 árboles con margen entero y 12 árboles con margen ondulado (Figura 3.31).

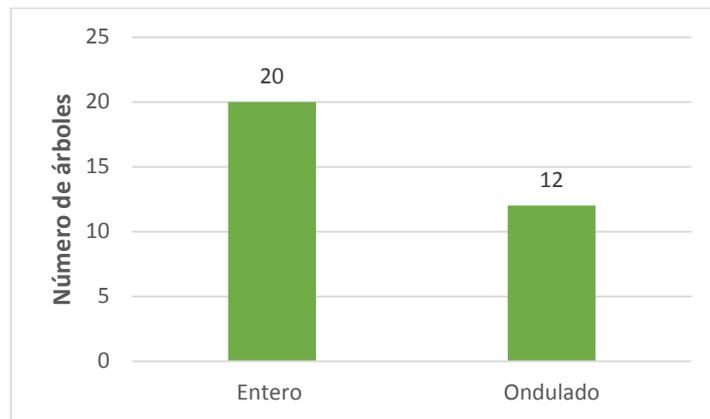


Figura 3.31: Frecuencias observadas del margen de la hoja.

3.3.1.10 Forma del ápice de la hoja

El ápice de la hoja en 16 ecotipos fue agudo y solo tres ecotipos presentaron un ápice obtuso (Itzama, Choquete y Farchild) (Figura 3.32).

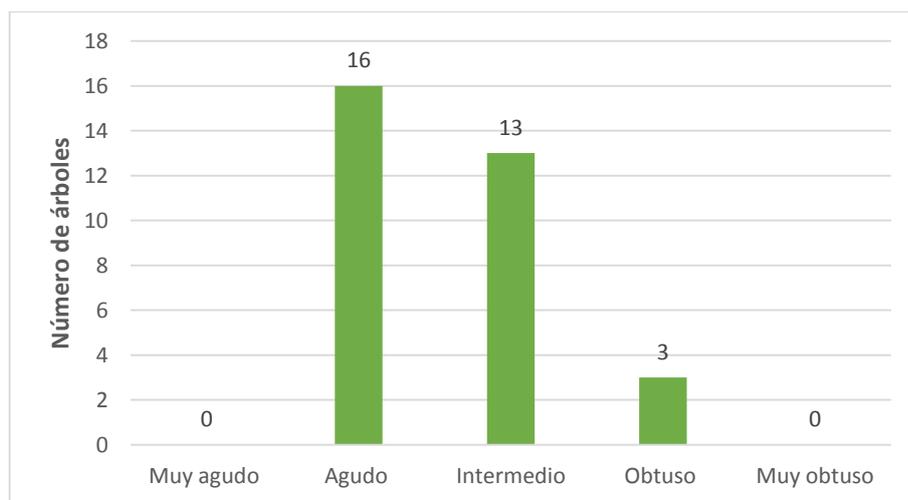


Figura 3.32: Forma del ápice de la hoja.

3.3.1.11 Textura de la hoja

La textura de la hoja se registró en hojas maduras, donde 20 ecotipos presentaron textura dura (Figura 3.33).

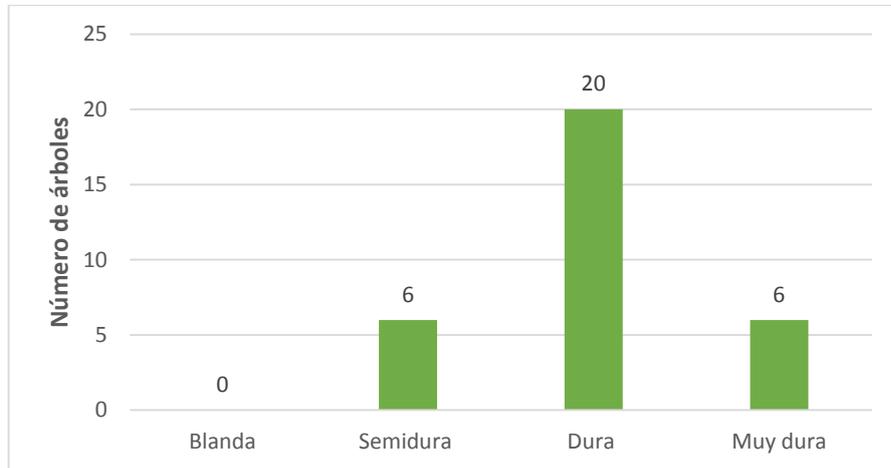


Figura 3.33: Textura de la hoja.

3.3.1.12 Olor a anís

El olor a anís es uno de los descriptores más informativos y característico para las razas mexicanas de aguacate. En este estudio se pudo distinguir 4 árboles con intenso olor a anís, los cuales son de origen mexicano, mientras que la mayoría de ecotipos (19) presentó un olor tenue (Figura 3.34).

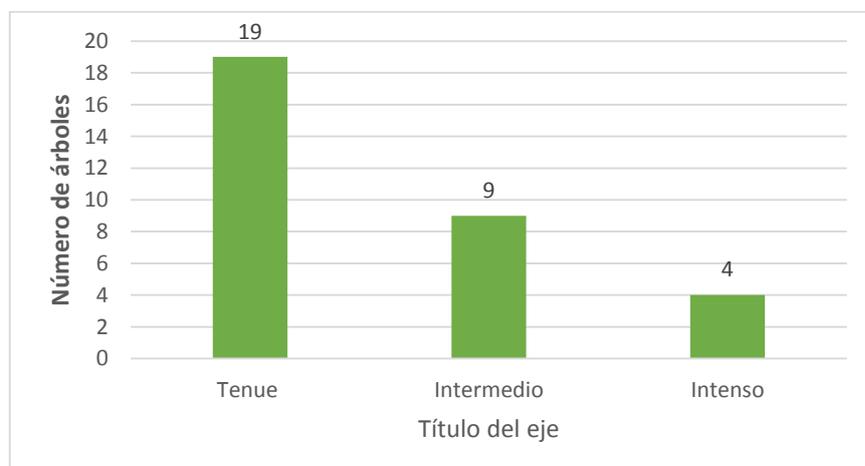


Figura 3.34: Olor a anís.

3.3.1.13 Época de floración

La época de floración mayor se da en el segundo trimestre del año en la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco del INIAP. En el mes mayo se observó floración en 14 ecotipos, mientras que en marzo solamente en un ecotipo (Figura 3.35).

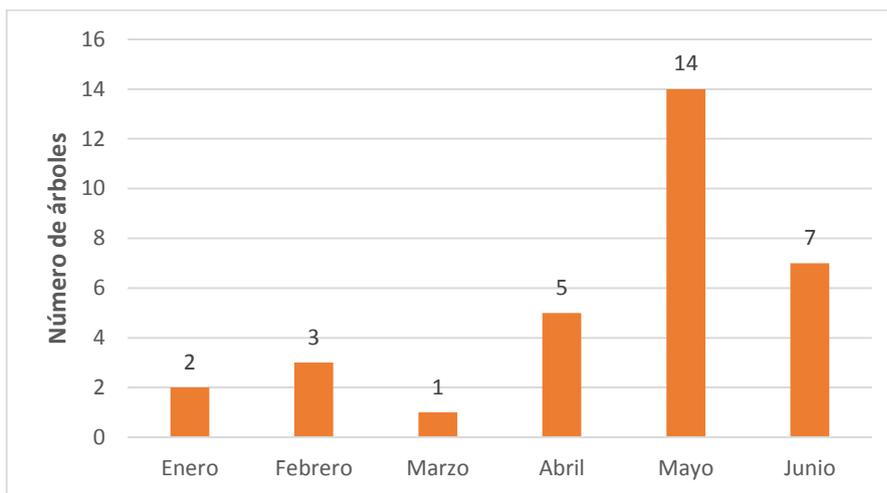


Figura 3.35: Época de floración por meses.

3.3.1.14 Tipo de floración

El aguacate en cada ecotipo presenta un solo tipo de flor, observándose 20 ecotipos con flor de tipo A y 12 de tipo B (Figura 3.36).

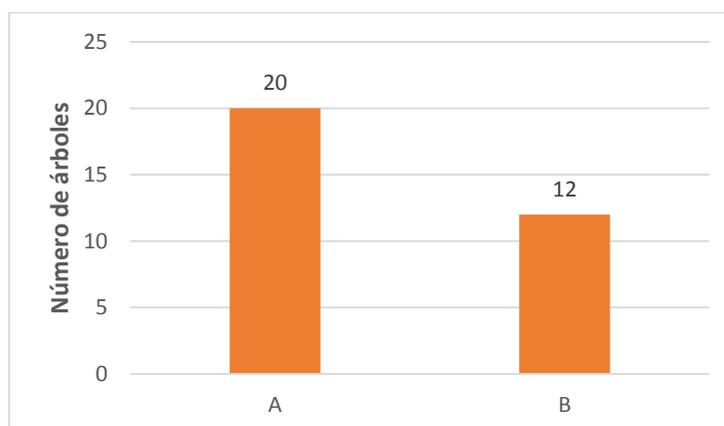


Figura 3.36: Tipo de floración.

3.3.1.15 Época de fructificación

La fructificación predomina en los meses de Enero y Febrero, mientras que en Junio, Julio, Agosto y Septiembre no se encuentra ningún árbol en producción (Figura 3.37).

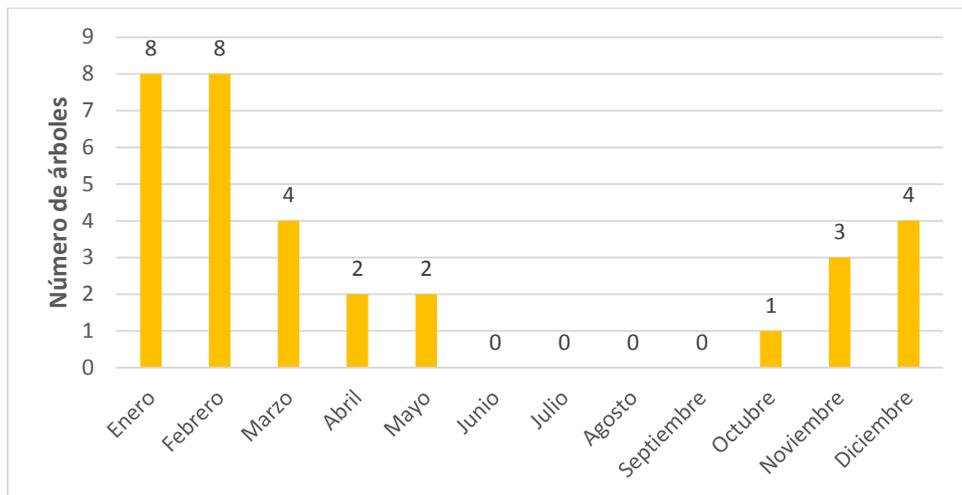


Figura 3.37: Época de Fructificación por meses.

3.3.1.16 Hábito de fructificación

La mayoría de accesiones se caracterizaron por producir frutos solitarios, mientras que en ecotipos como el Reed se da una producción abundante en racimos (Figura 3.38).

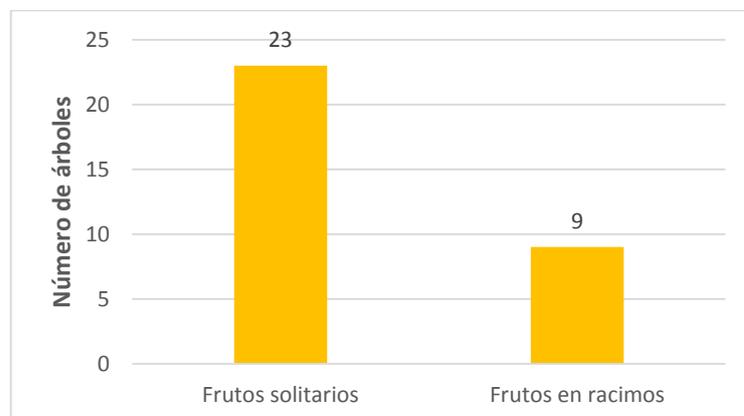


Figura 3.38: Hábito de fructificación.

3.3.1.17 Forma del fruto

En la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco-INIAP encontramos 32 ecotipos, tanto de materiales introducidos, hibridaciones y materiales colectados en el país por lo cual se encontró una gran variedad de formas de fruto, predominando los frutos obovados-angostos; mientras que la forma oblata y elipsoide no se encontraron en ningún árbol de la colección (Figura 3.39).

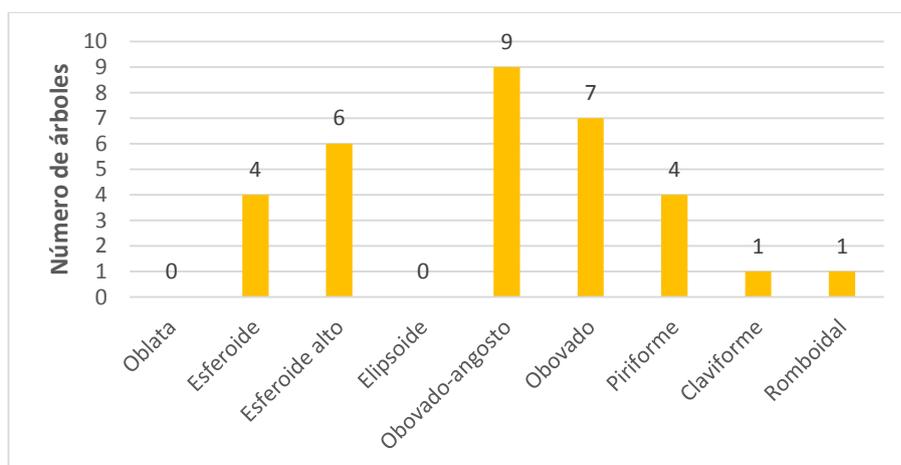


Figura 3.39: Frecuencia observada por la forma del fruto.

3.3.1.18 Forma de la base del fruto

La base del fruto puntiaguda se observó en 12 ecotipos, mientras que la base hundida en 3 (HX48, Simpson y Choquete) (Figura 3.40).

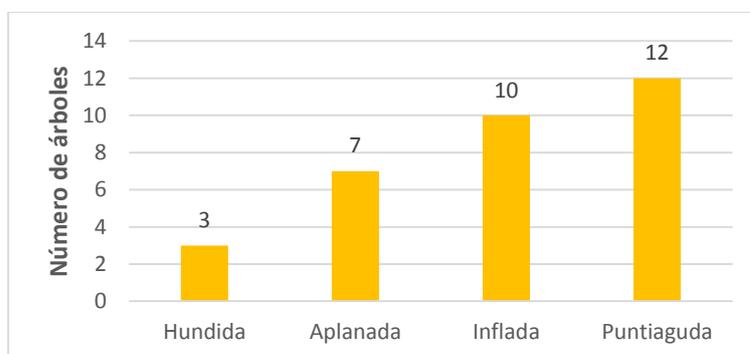


Figura 3.40: Forma de la base del fruto.

3.3.1.19 Aristas en el fruto

Las aristas en el fruto es una característica poco común, presentándose solamente en 4 accesiones (T225, HX48, Hass y Witsell) (Figura 3.41).

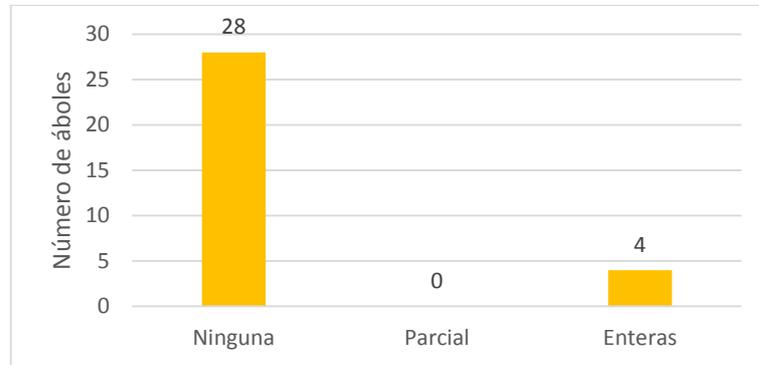


Figura 3.41: Aristas en el fruto.

3.3.1.20 Brillantez de la cáscara del fruto

La brillantez de la cáscara del fruto fue moderada en 24 ecotipos, mientras que dos (Choquete y Duke 7) presentaron una brillantez notable (Figura 3.42).

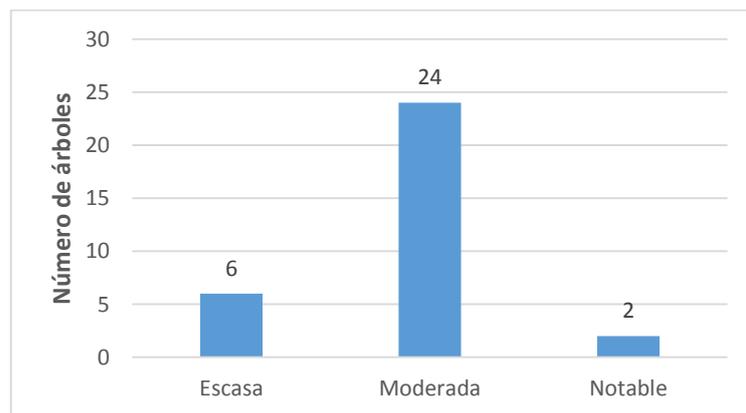


Figura 3.42: Brillantes de la cáscara del fruto.

3.3.1.21 Posición del pedicelo del fruto

La posición central y asimétrico fueron las más comunes con el 50% y 46.8% respectivamente, mientras que un solo ecotipo (Perucho) presentó el pedicelo muy asimétrico y ningún árbol con la característica extremadamente asimétrico (Figura 3.43).

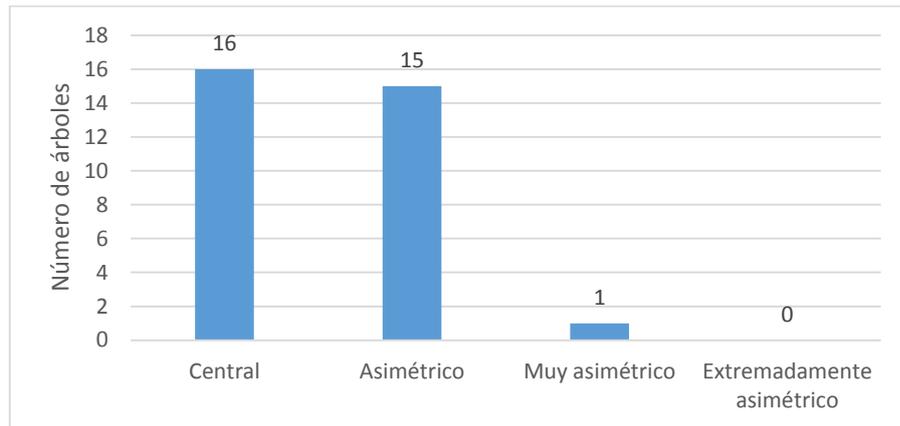


Figura 3.43: Posición del pedicelo en el fruto.

3.3.1.22 Forma del pedicelo

En la colección de trabajo encontramos materiales que presentan forma cilíndrica y cónica, lo cual se debe al origen de dichos árboles (Figura 3.44).

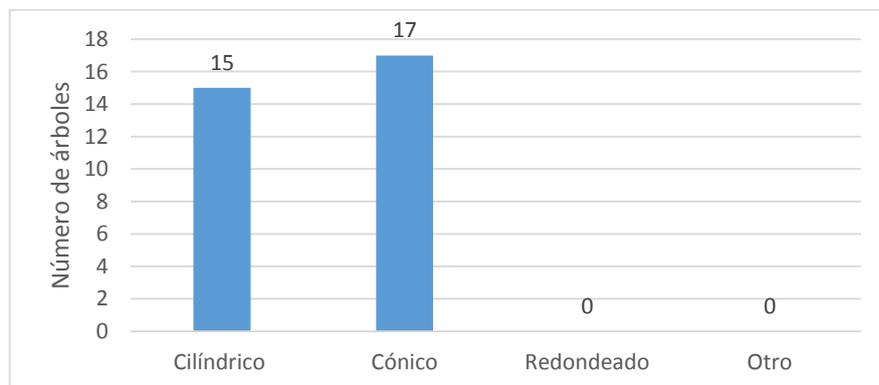


Figura 3.44: Forma del pedicelo.

3.3.1.23 Color del pedicelo

El color del pedicelo más frecuente es el verde, mientras que el anaranjado es el menos común (Figura 3.45); observándose esta coloración en el ecotipo HX48.

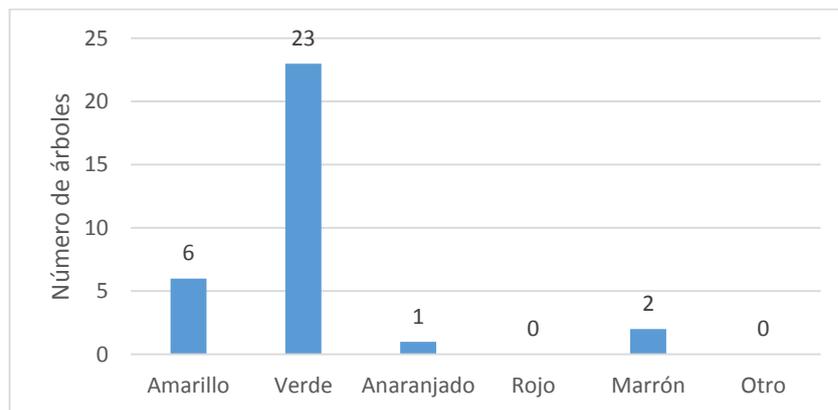


Figura 3.45: Color del pedicelo.

3.3.1.24 Superficie de la cáscara del fruto

Para la superficie de la cáscara del fruto 4 árboles presentaron una cáscara rugosa (T225, HX48, Hass y Witsell). Por otro lado, los ecotipos, en su mayoría híbridos, presentaron una superficie de la cáscara intermedia, mientras que los ecotipos de origen Mexicano presentaron una superficie lisa (Figura 3.46).

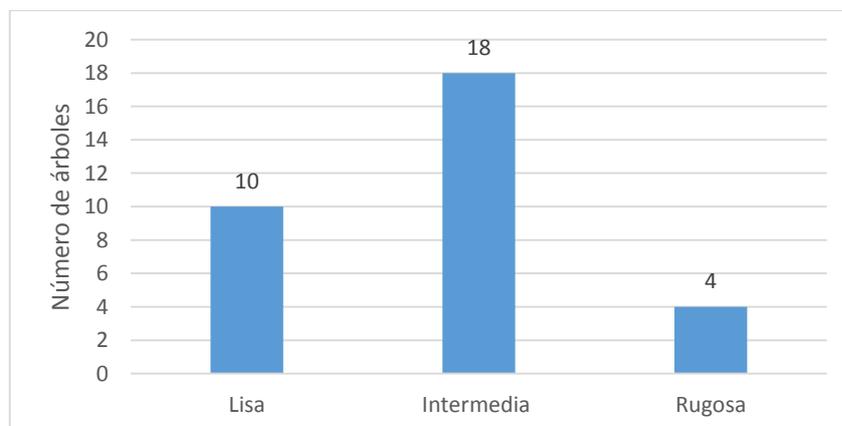


Figura 3.46: Superficie de la cáscara del fruto.

3.3.1.25 Color de la cáscara del fruto

En la colección de trabajo de la granja experimental Tumbaco encontramos cinco colores para la cáscara del fruto de los nueve propuestos por el IPGRI (1995), de los cuales el color que sobresale es el verde (13) (Figura 3.47).

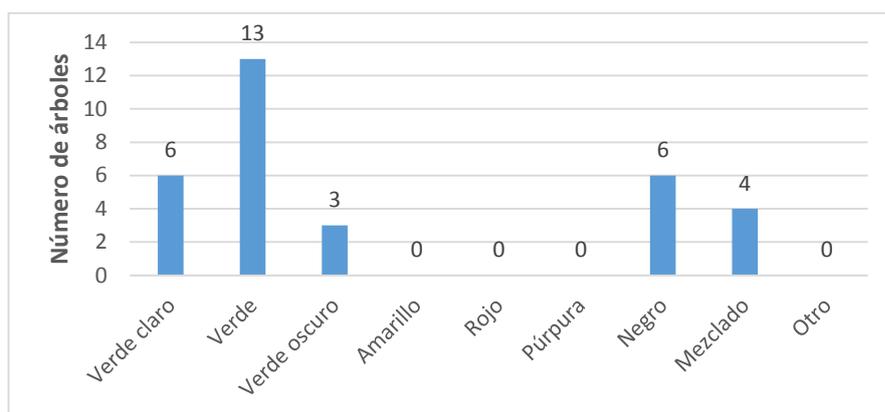


Figura 3.47: Color de la cáscara del fruto.

3.3.1.26 Grosor de la cáscara del fruto

El grosor de la cáscara del fruto presentó un rango que varió desde 1 mm (16 árboles) hasta 3 mm (Choquete y Witsell) (Figura 3.48).

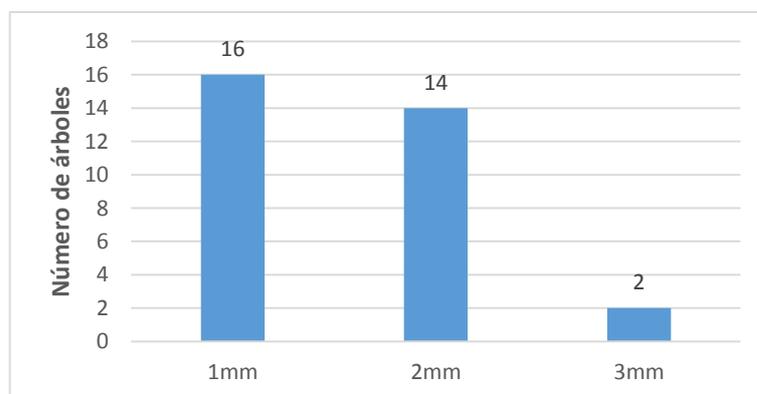


Figura 3.48: Grosor de la cáscara del fruto.

3.3.1.27 Color de la carne cercana a la semilla

El color verde claro de la carne cercana a la semilla en frutos maduros fue el de mayor frecuencia en los árboles estudiados. Sin embargo, 4 materiales presentaron colores no registrados en los descriptores propuestos por el IPGRI (1995) (Figura 3.49).

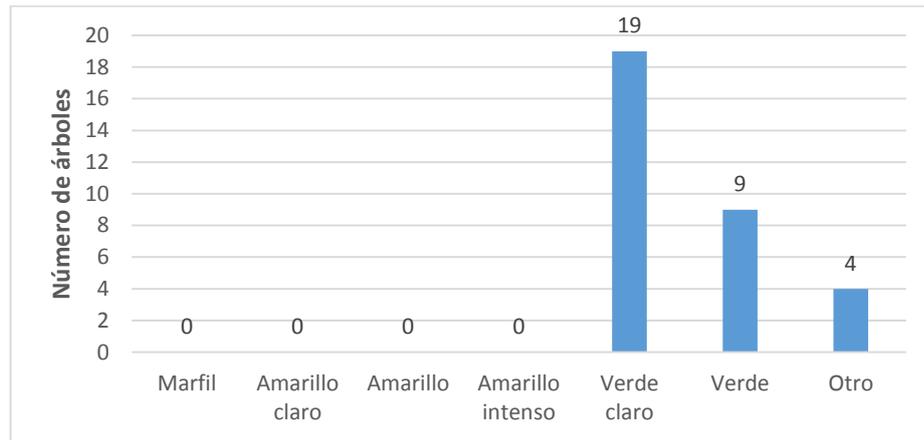


Figura 3.49: Color de la carne cercana a la semilla.

3.3.1.28 Textura de la pulpa

La textura de la pulpa cremosa fue la característica que se presentó en la mayoría de ecotipos, mientras que solamente el ecotipo Puebla presentó la característica pastosa (Figura 3.50).

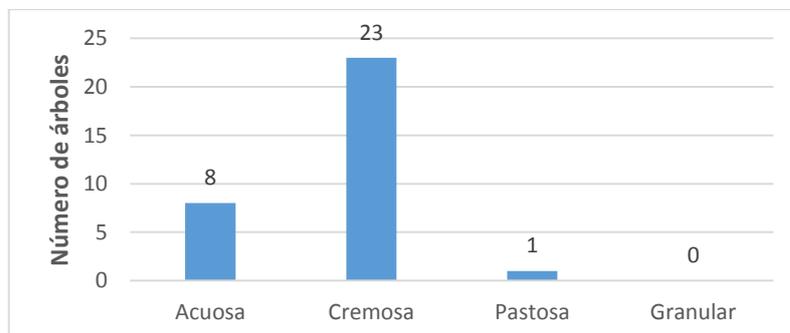


Figura 3.50: Textura de la pulpa.

3.3.1.29 Fibra en la pulpa

La mayoría de ecotipos de la Granja Experimental Tumbaco presentaron poca fibra en la pulpa (26), mientras que 5 ecotipos (Puebla, Perucho, Duke 7, Simpson y Farchild) presentaron fibra intermedia y un ecotipo (Nacional) presentó mucha fibra (Figura 3.51).

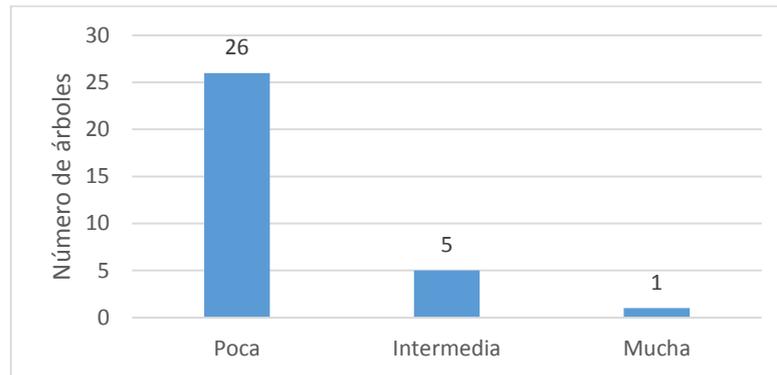


Figura 3.51: Fibra en la pulpa.

3.3.1.30 Forma de la semilla

En los ecotipos presentes en colección de trabajo de aguacate destacan la forma de la semilla esferoide y ovada-ancha (Figura 3.52).

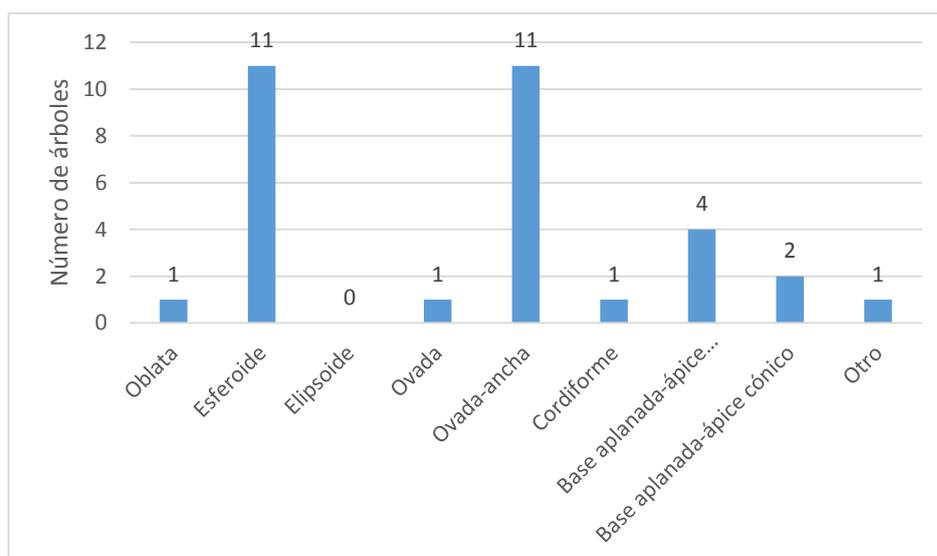


Figura 3.52: Forma de la semilla.

3.3.1.31 Posición de la semilla en la fruta

La mayoría de ecotipos (26) presentaron una apical de la semilla en la fruta, mientras que la posición central se observó en seis árboles (Figura 3.53).

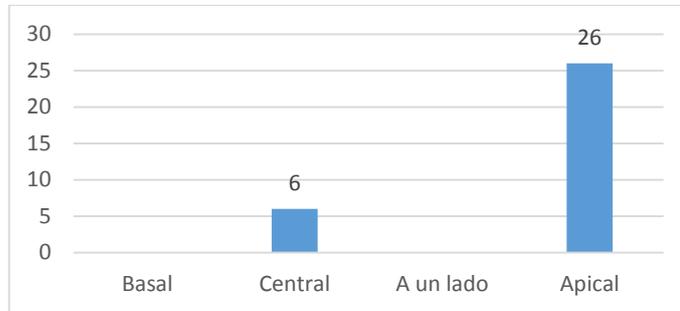


Figura 3.53: Posición de la semilla en la fruta.

3.3.1.32 Precocidad

La figura 3.54 presenta la precocidad de cada ecotipo de aguacate, las variedades comerciales Hass y Fuerte (en azul) presentan aproximadamente 250 días desde floración a madurez del fruto; por otro lado los aguacates de tipo Nacional son los ecotipos más precoces, mientras el ecotipo Tonnage es el más tardío.

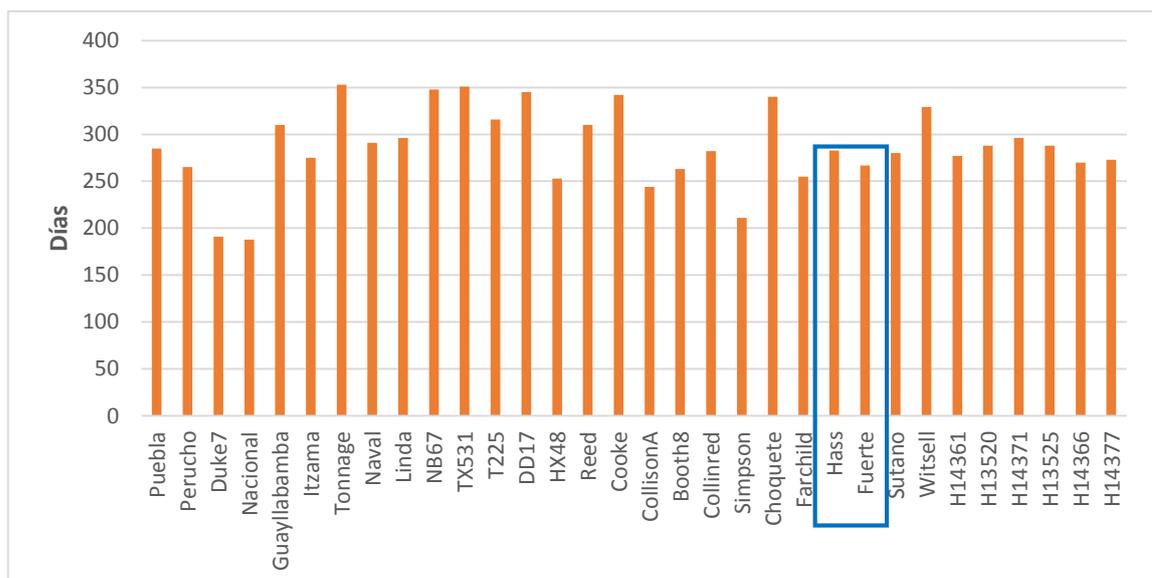


Figura 3.54: Número de días de floración a madurez de fruto.

3.3.2 Análisis de agrupamiento

Con los 24 descriptores de mayor relevancia se realizó el análisis de agrupamiento, donde se distinguen los materiales de tipo mexicano (Nacional, Puebla, Perucho y Duke 7), los cuales forman un grupo (en color azul), por otro lado los materiales de tipo guatemalteco, antillano e híbridos forman otro grupo (en color rojo) (

Figura 3.55).

En la figura 3.55 se identifica claramente que los ecotipos Reed y Guayllabamba (en color celeste) presentan un índice de diferencia mínima, teniendo características fenotípicas similares.

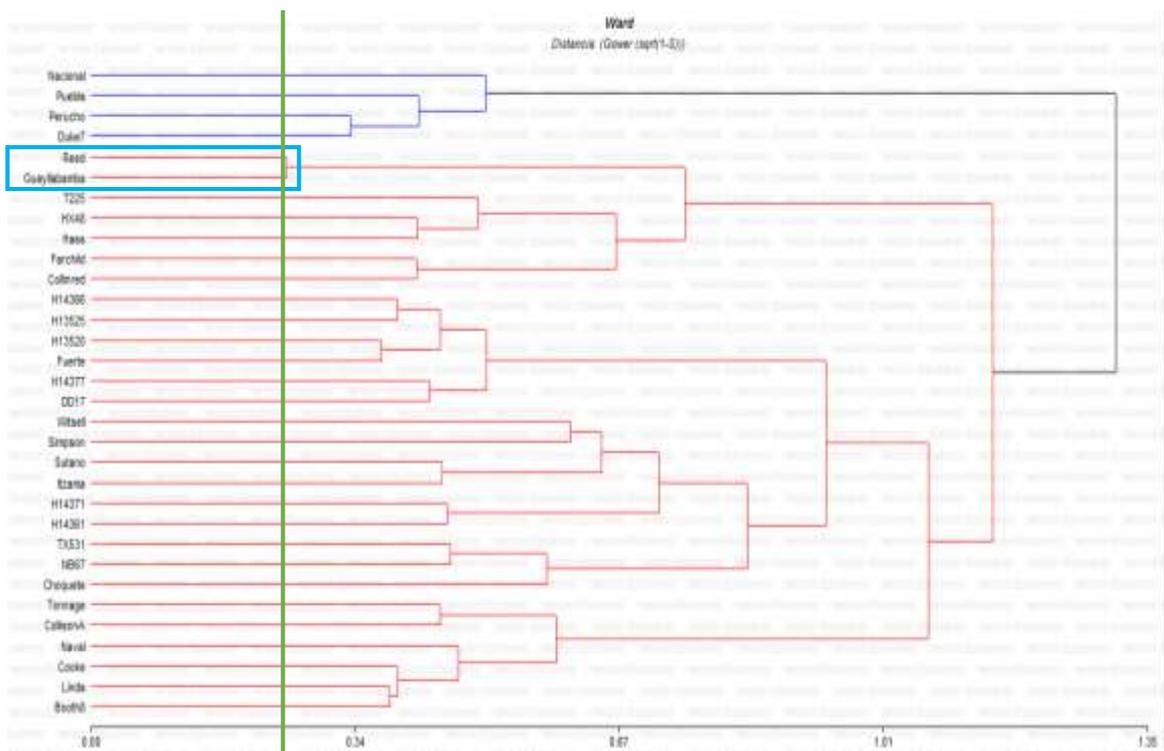


Figura 3.55: Análisis de agrupamiento de la caracterización morfológica de 32 ecotipos de la Colección de trabajo de la Granja Experimental Tumbaco- INIAP.

3.3.3 Análisis de componentes principales

En el análisis de componentes principales (Figura 3.56) con un aporte de 18.5% para el primer componente (Componente del fruto) y con un 11.5% para el segundo componente (Componente de flor) se diferencian los ecotipos de tipo mexicano (Nacional, Puebla, Perucho y Duke 7) (en color amarillo), los cuales están asociados al olor a anís, a la textura de la pulpa y a la fibra en la pulpa.

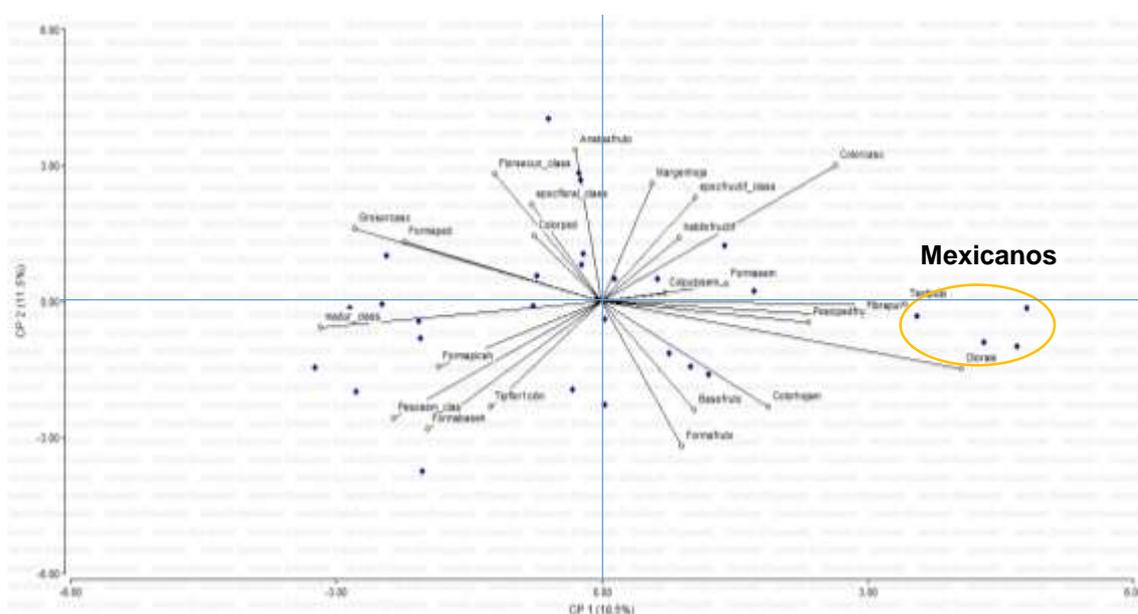


Figura 3.56: Análisis de Componentes principales

En la tabla 3.22 en color amarillo destacan las variables con mayor aporte para el primer componente (>0.5 o > -0.5); en color verde las variables con mayor aporte para el segundo componente.

Tabla 3.22: Valores de los componentes principales (CP1 y CP2)

Variables	CP 1	CP 2
Formabaseh	-0.42	-0.47
Colorhojam	0.4	-0.39
Margenhoja	0.12	0.43
Formapiceh	-0.39	-0.24

Olorais	0.86	-0.25
Tipfloración	-0.27	-0.39
habitofructif	0.19	0.23
Formafruto	0.19	-0.54
Basefruto	0.22	-0.4
Aristasfruto	-0.06	0.56
Posicpedfru	0.49	-0.08
Formaped	-0.47	0.22
Colorped	-0.16	0.24
Colorcasc	0.56	0.5
Grosorcasc	-0.59	0.27
Colpulpsem	0.15	0.03
Textpulp	0.73	-0.01
Fibrapul	0.62	-0.06
Formasem	0.3	0.06
Pesosem_clas	-0.5	-0.43
madur_class	-0.67	-0.1
epocfloral_class	-0.17	0.36
Florsecun_class	-0.26	0.47
epocfructif_class	0.22	0.38
Correlación cofenética= 0.603		

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La caracterización de la diversidad en plantas, está dado por la caracterización fenotípica, que está sujeta a una fuerte influencia ambiental y que a su vez es un proceso largo en especies perennes. Por otra parte, la caracterización de la variabilidad genética con marcadores moleculares permite identificar, clasificar y utilizar la diversidad existente en los genomas de las plantas en programas de mejoramiento genético, ya que las diferencias o similitudes a nivel del ADN entre individuos se observan en forma directa; en este estudio se consideró tanto la caracterización fenotípica como genotípica (Piñero, 2008).

4.1 Caracterización molecular

La biología molecular permite el uso de metodologías para la identificación, clasificación y aprovechamiento de la diversidad genética presente en los genomas de las plantas; con estas técnicas se pueden determinar en forma precisa las diferencias o similitudes a nivel del ADN entre individuos (Gutiérrez, Martínez, Gracia, & Iracheta, 2009). Los marcadores de ADN como Minisatélites (Lavi *et al.* 1991), RAPDs (Fiedler *et al.* 1998), RFLPs (Davis *et al.* 1998) o VNTRs (Mhameed, *et al.*, 1997) han sido utilizados para genotipar diferentes cultivares de aguacate. Sin embargo los microsatélites (; Ashworth y Clegg, 2003; Schnell *et al.*, 2003; Ashworth *et al.*, 2004) está adquiriendo preponderancia en la definición de genotipos individuales y en los estudios del flujo de genes de árboles forestales, puesto a que presentan ventajas para estudios de genética poblacional por su codominancia, y alto grado de polimorfismo apropiado para estudios de diversidad y relaciones en y entre poblaciones, su estabilidad, su fácil detección por medio de PCR, su gran dispersión a lo largo del genoma y su alta reproducibilidad (Alcaraz & Hormaza, 2007); recientemente muchos microsatélites en aguacate has sido desarrollados (Mhameed, *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 2004) lo que ha facilitado los estudios

de diversidad (Schnell *et al.*, 2003; Ashworth y Clegg, 2003, Alcaraz & Hormaza, 2007).

4.1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de aguacate se dificulta debido a los altos contenidos de ácidos grasos de las hojas (Gutiérrez, 2009), propios de la especie; por lo que se evaluaron varios métodos: 1) el propuesto por Jhingan (1992) de PEX, 2) el propuesto por Colombo (1998) modificado por Piedra (2004) y 3) el de Ferreira y Grattapaglia (1998), con el fin de determinar el más adecuado en cuanto a calidad y cantidad de ADN. Los tres métodos evaluados fueron adecuados considerando cantidad, mientras que para calidad, el tercero fue el método con mejores resultados en cuanto a validación, ya que utiliza lavados del pellet de ADN con etanol al 70%, lo cual elimina los ácidos grasos y fenoles que inhiben la reacción de PCR.

4.1.2 Cuantificación de ADN

Respecto a la cuantificación de ADN genómico de aguacate, se obtuvo bandas claras y bien definidas en los geles de agarosa, pero debido a que este método de cuantificación es poco específico y subjetivo al compararse con marcadores de peso molecular, no se tiene certeza de la concentración de ADN de aguacate. Esto es un problema al momento de realizar la PCR, ya que una alta concentración de ADN inhibe esta reacción, por lo cual puede fallar su validación. Esta cuantificación fue verificada en el espectrofotómetro EPOCH, resultando una concentración precisa de ADN, de lo cual se pudo hacer las diluciones exactas del mismo.

4.1.3 Pruebas de amplificación y “duplexaje” de SSR con la técnica M13 “*tailing*” para el analizador LI-COR 4300.

Las temperaturas de annealing reportados por (Ashworth & Clegg, 2003) siendo las encontradas temperaturas más bajas que las reportadas, esto puede

deberse a que estos SSRs tienen un amplio rango de temperaturas de amplificación, mientras que en lo que respecta a los pesos moleculares obtenidos en este trabajo fue similar a los reportados por las mismas SSR por Schnell *et al.* (2003) y (Ashworth & Clegg, 2003), que confirma la fiabilidad de los análisis SSR.

4.1.4 Genotipaje en el analizador Licor 4300

El aguacate es una especie diploide, es decir con un número cromosómico de $2n=24$ por lo cual en el presente estudio se identificó la presencia dos bandas para individuos heterocigotos y de una banda en individuos homocigotos, en cada locus. Sin embargo, se encontró que en algunos individuos no hubo amplificación con algunos microsatélites, lo que concuerda con el estudio de Galindo (2011) sobre las relaciones de aguacate en México, así como en el estudio realizado por Ashworth *et al.* (2004) y Borrone *et al.* (2009). Esto se puede deber a la presencia de alelos nulos, debido a sustituciones, deleciones e inserciones en las secuencias que corresponden a los sitios de unión de los microsatélites específicos, por esta razón no se dió la amplificación. A su vez en estos estudios se menciona problemas de barrido en las bandas con los microsatélites utilizados, lo cual se detectó específicamente en el primer AV9 donde se pueden identificar barrido que podría confundirse como una banda.

El LI-COR 4300 es un equipo de alta especificidad ya que puede diferenciar alelos que varíen en 2 pares de bases (pb) (LI-COR Biosciences, 2012), mientras que en geles de acrilamida se diferencian en 20 pb y con menor especificidad, los geles de agarosa que difieren en 50 pb, por lo tanto se pueden detectar el número total de alelos de una población para cada locus, lo cual representa la variabilidad total (Del Villar & Reynoso, 2010).

4.1.5 Diversidad genética de aguacate

En los datos obtenidos del genotipaje realizado en el Austro se encontraron 110 alelos en los 10 locus estudiados con un promedio de 11 alelos/locus, lo cual presenta una similitud con el estudio realizado en el Centro y Norte en el cual se encontró la presencia de 107 alelos con un promedio de 10.7 alelos/ locus. (Urgilez, 2012).

En el trabajo realizado por Ashworth & Clegg (2003) en el que utilizaron un total de 25 loci microsatélites (10 de los cuales fueron utilizados en el presente estudio) en 37 ecotipos de aguacate, tuvieron como resultado un promedio de 10.4 alelos/locus. En la investigación realizada por Alcaraz & Hormaza (2007) se trabajó con 75 accesiones de aguacate en las cuales incluye ecotipos locales de España y ecotipos obtenidos por intercambio de diferentes países, las accesiones fueron caracterizadas con 16 microsatélites de aguacate, detectándose un total de 156 diferentes fragmentos de amplificación con un promedio de 9,75 alelos/locus.

Coto *et al.* (2007) en el trabajo de mejoramiento de aguacate para la resistencia a la pudrición de la raíz y la salinidad, realizó un análisis de la diversidad entre 22 ecotipos de aguacate cultivados en Cuba utilizando 16 de microsatélites con un promedio 8.1 alelos/locus. Siendo en este estudio el valor más bajo de encontrado respecto a las investigaciones nombradas anteriormente. Los valores mencionados son significativamente menores al reportado por Schnell *et al.* (2003) con 14 microsatélites obtuvo un promedio de 18,8 alelos/locus, siendo el mayor promedio, debido probablemente a que se realizó el estudio con un número mayor de accesiones (224).

Por último Galindo (2011) obtuvo datos similares de alelos por locus reportando un promedio de 10.75 alelos/locus. Todos los estudios mencionados anteriormente concuerdan con el presente estudio.

Los locus con mayor número de alelos son AV5, AV2 y AV9 por lo tanto estos son los locus con mayor polimorfismo siendo mejores para los análisis de diversidad genética, mientras que los locus AV10, y AV3 proyectaron menor polimorfismo es decir mayor cantidad de alelos repetidos y de tamaños similares.

Las frecuencias alélicas oscilaron 0,0026 a 0,6146, observándose la mayor frecuencia alélica el locus AV10, si la frecuencia de un alelo es muy alta, existe poca heterocigosidad (Galindo & Milagro, 2011). Sin embargo en este estudio no se detectaron alelos fijos (frecuencia alélica >0.9), mientras que 58 alelos (52,72%) pueden ser considerados como raros (frecuencia alélica <0.05), datos con cierta similitud a los reportados por Alcaraz & Hormaza (2007) con frecuencias alélicas en un rango de 0.006 a 0.5583, donde no se obtuvo alelos fijos y con 83 alelos posiblemente raros (53%).

La heterocigosidad observada (H_0) para los materiales caracterizados de los valles interandinos del centro-sur fue de 0,64 mientras que la heterocigosis 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).

Los resultados concuerdan con respecto al sistema de reproducción dicogámico de esta especie, lo que provoca diferentes niveles de heterocigosidad en las poblaciones de aguacate (Rodríguez, *et al.*, 2003).

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.

Los datos de este estudio concuerdan con estudio realizado por Alcaraz & Hormaza (2007), en el cual la heterocigosidad esperada fue de 0,76, una heterocigosidad observada de 0,64. El valor PIC (0,35) que reportaron fue bajo en comparación con el PIC (0,73) encontrado en el presente estudio.

Por otro lado Mhameed *et al.* (1996) encontró niveles altos de heterocigosidad, usando SSRs la H_o encontrada fue de 0,62, dato similar obtenido en el estudio de Schell *et al.* (2003) con un promedio de H_o fue de 0,64. Todos los valores mencionados coinciden con los datos obtenidos en este estudio.

4.1.6 Estructura genética

El aguacate presenta el fenómeno de dicogamia protoginea, madurando a destiempo los verticilos sexuales, lo que se traduce en una menor probabilidad de autopolinización de las flores. A su vez se ha visto que el comportamiento floral no es estricto y está fuertemente influenciado por las condiciones climáticas. Se sabe que bajas temperaturas causan un retardo en la apertura floral lo que incrementa la posibilidad de autopolinización. Por lo tanto se puede esperar que exista una variación entre los porcentajes de autopolinización y polinización cruzada dependiente de las condiciones en que se encuentre el huerto.

De acuerdo al análisis de agrupamiento UPGMA consolidado por ecotipos, se observa que Farchild se diferencia del resto de materiales

constituyendo un grupo separado debido a su diferenciación alélica. Los cultivares Guayllabamba y Reed están emparentados ya que presentan un coeficiente de distancia muy cercano a 0 (0.2188) por lo que se podría especular que se trata del mismo material vegetativo, esta deducción se respalda con los resultados del análisis morfológico, en el cual el coeficiente de distancia presenta el mismo patrón.

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, 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.

En el análisis de coordenadas principales presenta una variabilidad acumulada de 23.69%, debido a esto no hay formación de estructuras definidas, sin embargo se pueden distinguir la separación clara de los ecotipos NB67, TX531 e Híbrido 14366, puesto que estos materiales son introducidos y difieren en su contenido genético del resto de materiales de la colección de trabajo.

Los resultados obtenidos del análisis de variabilidad genética del aguacate son muy favorables, ya que existe una amplia diversidad genética en

la Colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco del INIAP, por lo cual con estudios posteriores se tiene las posibilidades de encontrar características interesantes que mejoren la resistencia y por ende la productividad del aguacate (Bonilla, 2010), encaminando hacia el mejoramiento genético.

4.1.7 Análisis global

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.

De acuerdo al Análisis molecular de varianza (AMOVA) global se encontró una diferencia entre provincias de un 17%, esta variabilidad se debe a que en este estudio se encontraron 31 ecotipos diferentes (tanto de colectas como de materiales introducidos). Por otro lado el AMOVA de las colectas de material Nacional que se realizó en la Sierra Norte y Sur revelaron una diferencia genética del 4%, esta diferencia es mínima debido a que todos los materiales son del mismo ecotipo por lo tanto comparten la misma información genética. El estudio realizado por Urgilez (2012) presentó un 4% de variación genética en los materiales de tipo Nacional colectados en los Valles Interandinos del Norte del Ecuador, lo cual coincide con el presente trabajo.

De igual manera a lo anterior mencionado se debe considerar la posibilidad de que las localidades estudiadas, debido a su cercanía geográfica, compartan ancestros comunes y por lo tanto, un origen común.

Las estadísticas F revelan que el índice de diferenciación genética F_{is} o índice de consanguineidad fue de 15,85 %, corresponde a diferencias entre poblaciones, este valor nos indica que existe un alto nivel de intercambio

genético, y que comparten los mismos ancestros, ya que mientras mayor es el valor menos intercambio genético hay entre las poblaciones (Nei, 1973).

El valor F_{st} o índice de fijación más alta se mostró en el alelo AV10 con 0.26 indicando que existe una alta fijación de cierto alelo para este locus, ya que mientras más se acerca a 1 más fijación de un alelo existe.

De los 10 loci utilizados tres locus (AV3, AV11) mostraron un resultado F_{is} negativo, por lo tanto como la mayoría son valores de F_{is} positivos, existen pocos heterocigotos respecto a lo esperado.

Según las circunstancias de equilibrio de Hardy y Weinberg, existe una falta de heterocigotos con respecto a lo esperado, debido a que los valores F_{is} para todos los loci fueron positivos, excepto para el loci AV11 el cual dio un valor negativo de -0,055 lo cual nos dice que hay mayor número de heterocigotos.

En el estudio de Alcaraz & Hormaza (2007), 15 de los 16 loci estudiados mostró un resultado positivo de F_{is} que indica un déficit de heterocigotos con una media de 18%, mientras que para un solo locus fue negativo. Estos resultados indican un cierto grado de consanguinidad que podría explicarse por el hecho de que los genotipos están relacionados genéticamente.

El locus con el menor valor de F_{IT} siendo este de 0,145 es el locus AV4 y el AV7 con un F_{IS} de 0,15. El mayor porcentaje de variación genética corresponde al locus AV2, AV3, AV9, AV11, AV12.

La distancia de Nei entre las provincias de Pichincha e Imbabura es de 0,247, de Pichincha y Carchi es de 0,315, de Pichincha y Tungurahua 0,219, de Imbabura y Carchi es de 0,183, de Imbabura y Tungurahua es de 0,328, y entre Carchi y Tungurahua es de 0,356. Estos datos se interpretan con poca diferencia genética, debido a la cercanía de las provincias, los datos que dan más similitud es entre las Provincias Imbabura y Carchi, y los valores más altos están entre

las provincias de Carchi y Tungurahua, datos totalmente lógicos de acuerdo a la ubicación y distancia de una provincia a otra.

4.2 Caracterización morfológica

Gutiérrez (2009) tomaron en cuenta variables como peso de semilla, peso de fruto, porque mostraron la mayor influencia en la clasificación de las muestras, para el análisis de agrupamiento. En el presente estudio las variables más informativas fueron el olor a anís, forma del fruto, aristas en el fruto, color de la cáscara del fruto, grosor de la cáscara del fruto, textura de la pulpa, fibra en la pulpa, la madurez o precocidad del fruto, ya que estos aportaron mayor información en la conformación de componentes principales.

El olor a anís o la intensidad del aroma volátil de hojas del aguacate fue más alto en las razas mexicanas que en las razas guatemaltecas y antillanas. Estragol y β -cariofileno son los componentes más abundantes en las razas mexicanas y guatemaltecas respectivamente, y pueden ser indicadores en la clasificación de raza (Wu, Chou, Chang, & Chen, 2007).

La forma del fruto es variable y no discrimina en razas, pero es considerable tener en cuenta que en aguacates de origen mexicano los frutos tienen tendencia a ser pequeños, los antillanos con tendencia a grandes y los guatemaltecos con tamaño medio (Larios, *et al.*, 2011).

La presencia de aristas en el fruto es característica de árboles de aguacate de origen guatemalteco, es por esta razón que esta variable es muy descriptiva, ya que en árboles de origen mexicano hay ausencia de aristas y la cáscara es suave y lisa, por otro lado los árboles de origen antillano carecen de aristas con un grosor mediano y liso.

El color de la cáscara del fruto varía de acuerdo a los diferentes ecotipos, siendo una característica importante el color negro en aguacates de tipo Nacional.

El grosor de la cáscara del fruto es una característica discriminativa ya que en aguacates de origen mexicano la cascara es delgada, en antillana de grosor medio y en guatemaltecos la cáscara se caracteriza por ser gruesa (Barrientos & López, 1998).

La textura de la pulpa nos permite identificar el contenido de aceite, siendo los más cremosos, esto es común en aguacates de raza mexicana, mientras que los aguacates de raza guatemalteca tienen contenido medio y los de raza antillana, bajo contenido de aceite.

La fibra en la pulpa es común en aguacates de origen mexicano, por lo cual es una característica informativa que permite identificar árboles de esta raza; por otro lado en árboles de origen guatemalteco y antillano la fibra es escasa.

La madurez o precocidad del fruto es una característica de importancia ya que se ha determinado que los frutos de origen mexicano tienen un tiempo de flor a fruto de aproximadamente 6 - 9 meses, los de origen guatemalteco de 10-16 meses y los de origen antillano 5 a 9 meses (Barrientos & López, 1998).

La variabilidad morfológica existente en los materiales de la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco del INIAP permite establecer una base para programas de mejoramiento genético, por lo cual es importante la conservación de estos materiales con la diversidad del germoplasma de aguacate para el desarrollo de nuevos cultivares (variedades mejoradas).

4.2.1 Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento reveló que los ecotipos de origen mexicano comparten ciertas características fenotípicas que les permitieron agruparse,

mientras que los materiales de origen guatemalteco, antillano e híbridos no formaron grupos definidos de acuerdo a su origen racial.

De acuerdo a las observaciones morfológicas, al análisis de agrupamiento y a la caracterización molecular se pudo comprobar que el ecotipo nombrado como Guayllabamba, presenta características tanto fenotípicas como genotípicas de los ecotipos Reed, por lo cual se asume que este material es Reed.

4.2.2 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales permitió identificar las variables que presentan mayor información en cuanto a la diferenciación fenotípica, siendo el olor a anís, posición del pedicelo en el fruto, forma del pedicelo, color de la cáscara, grosor de la cáscara textura de la pulpa, fibra en la pulpa y la madurez, los descriptores que contribuyeron a la formación de la primera componente y la forma del fruto, las aristas en el fruto a la segunda componente.

De acuerdo a Rodríguez *et al.* (2003) las variables que más contribuyeron para la discriminación en la primera componente fueron el grosor y la flexibilidad de la cáscara del fruto y la época de cosecha, y en la segunda, el olor a anís en las hojas y el color de las lenticelas del vástago joven; reportando la formación de tres grupos. El primero Grupo Guatemalteco y la mayoría de los híbridos de Guatemalteco x Antillano, el grupo II los Antillanos. El cultivar Jaruco, clasificado como Antillano quedó incluido en el Grupo I. El Grupo III quedó constituido por el único representante de la raza Mexicana (Rodríguez, *et al.*, 2003), esto último comprueba la formación de los representantes de tipo Mexicano que se agruparon en el presente estudio, mientras que los otros ecotipos no forman agrupaciones raciales.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares SSR, utilizados en el estudio, demostraron una fácil detección por medio de PCR y una alta reproducibilidad siendo eficientes para detectar polimorfismo, identificar cultivares, determinar clones y confirmar la clasificación botánica.
- Gracias a su codominancia, y al alto grado de polimorfismo, estos microsatélites son apropiados para analizar la diversidad genética de aguacate, con los cuales se pudo identificar la diversidad y la estructura genética en las regiones interandinas del Centro-Norte y Centro-Sur del Ecuador, a su vez permiten tener una relación genética entre y dentro de las provincias estudiadas.
- El método de extracción foliar de Ferreira y Grattapaglia (1998) para muestras secas para aguacate permitió obtener una buena concentración y calidad de ADN.
- 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.
- Existe el mismo patrón de diversidad genética tanto en el estudio realizado en los valles interandinos del Norte y Centro como el realizado en Sur y Centro, presentando valores de 10.7 alelos/locus para el primero y 11 alelos/locus para el segundo.
- La heterocigosidad esperada 0.74, indican que los microsatélites seleccionados forman un conjunto de gran utilidad informativa para la caracterización de germoplasma de aguacate.

- El PIC de 0.73 demostró un gran polimorfismo y diversidad genética en las muestras de aguacate analizadas.
- Los locus con mayor polimorfismo de acuerdo a los datos de riqueza alélica, heterocigosis esperada, heterocigosis observada, PIC, valores F, son AV2, AV5, AV9, AV11, AV12.
- Con la combinación de microsatélites empleada, no se puede establecer grupos en base a su origen racial, lo que puede deberse al hecho de que, la mayoría de los cultivares son híbridos.
- Los análisis de multivariados PCO corroboraron en la falta de estructura genética en aguacate, sin embargo los ecotipos TX531, NB67 y el híbrido 14366 si se diferenciaron de forma clara, al ser los mismos, materiales introducidos.
- El AMOVA para los materiales colectados de tipo Nacional de la región Centro-Norte y Sur dieron un 4% de variabilidad genética.
- De acuerdo al 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.
- Las estadísticas F revelaron un valor de diferenciación genética del 15.8% entre las provincias estudiadas.
- La colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco representa la mayoría de la variabilidad genética en este cultivo debido a que posee accesiones de los Valles interandinos de tipo nacional proveniente de colectas y materiales introducidos.

- La caracterización molecular y morfológica reveló que el cultivar erróneamente nombrado como Guayllabamba en la colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco, es un ecotipo Reed.
- El análisis de similitud para la elaboración del dendograma UPGMA detectó 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.
- Los descriptores morfológicos más informativos fueron el olor a anís, forma del fruto, aristas en el fruto, color de la cáscara del fruto, grosor de la cáscara del fruto, textura de la pulpa, fibra en la pulpa, la madurez o precocidad del fruto.
- Los ecotipos de origen mexicano formaron un solo grupo, por sus similares características, de acuerdo al análisis de agrupamiento de la caracterización morfológica. Mientras que los aguacates de origen guatemalteco y antillano no forman grupos definidos.
- El análisis de componentes principales reveló que las el olor a anís, la textura de la pulpa y la fibra en la pulpa son relevantes para determinar materiales de origen mexicano.
- La identificación de las localidades es útil para desarrollar los programas de mejoramiento genético y manejo de recursos genéticos de aguacate. Las poblaciones que mostraron el mayor distanciamiento genético fueron Pichincha y Tungurahua, considerándose candidatas convenientes en cruza dirigidas.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de marcadores moleculares SSRs para estudios de determinación de la variabilidad genética en aguacate.

Para futuras investigaciones es recomendable realizar un estudio del aguacate con la utilización de otros marcadores SSRs, para determinar si estos muestran mayor polimorfismo que los utilizados en este estudio.

Realizar un estudio de secuenciación para identificar variaciones puntuales e identificar alelos mayor precisión.

Realizar un análisis georeferenciado para identificar si existe relación del flujo génico de acuerdo a la ubicación geográfica de los materiales.

Se recomienda utilizar los descriptores morfológicos que resultaron más informativos en este estudio para posteriores caracterizaciones de ecotipos de aguacate.

CAPÍTULO VII

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/CICTAMEX/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 vulgarisL.) 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/Extenso/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, Trads.) Brasilia: EMBRAPA-CERNAGEN.
- Fielder, J., Buffer, G., & Bangerth, F. (1998). Genetic relations of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica*, 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., . . . Celedón, 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. *Secretaría 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 etiolación 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.