2008B-2013A 005068312

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Variabilidad genética y morfología de fruto en una población de mamey *Pouteria sapota* (Sapotaceae)

TRABAJO DE TITULACIÓN EN MODALIDAD DE

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MANUEL ALEJANDRO RODRÍGUEZ GAYTÁN

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Diciembre de 2014

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Departamento de Producción Agrícola, división de Ciencias Agropecuarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

"Así como la luz se manifiesta a si misma y a la oscuridad, la verdad es la norma de si misma y del error"

Baruch Spinoza

Agradecimientos:

A mis padres Manuel y Graciela, que me otorgaron el regalo más grande que existe, la vida y las posibilidades que ella implica.

A mis hermanos Jesús y Paloma, por su compañía y solidaridad a lo largo del camino.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Mariela, Héctor, Benja, Juan, Daniel, Ana Karen, Héctor Javier, Yolanda, David. Paola, Fernanda, Víctor, Martín, Martha, Karla, Julieta y Zianya. Por ser pieza fundamental y base de mi formación como estudiante y como ser humano.

A mis profesores quienes siempre fueron para mí un ejemplo a seguir y que fomentaron las cualidades que en sus personas les llevaron a ser excelentes profesionistas.

A la Dra. Martha Isabel Torres Morán que siempre se mostró presta e interesada durante el proceso de titulación. Gracias por tu aplomo, templanza y cariño.

A mis asesores y sinodales por la valiosas observaciones y puntos de vista que ofrecieron para la optimización del presente trabajo.

A la Universidad de Guadalajara por haber sido artífice y proveedora de los recursos humanos y materiales necesarios para mi formación.

Contenido

Resumen…… 1

I. Introducción…….. 2

II. Antecedentes…… 4

2.1 Importancia, uso y conservación de los recursos fitogenéticos……..... 4

2.2 Especies frutales como recursos fitogenéticos……... 5

2.3 El Mamey como recurso fitogenético subutilizado…….. 6

2.4 Variabilidad genética y fenotípica……. 8

2.4.1 Variabilidad a nivel morfológico……..... 8

2.4.2 Variabilidad a nivel molecular……. 9

2.5 Marcadores ISTR……. 10

2.6 Marcadores ISSR……. 11

2.7 Antecedentes del estudio de la variabilidad genética de mamey……. 13

2.7.1 Variabilidad isoenzimática…… 13

2.7.2 Variabilidad a nivel morfológico…….. 13

2.7.3 Variabilidad a nivel molecular……. 15

III. Justificación……. 17

3.1 Hipótesis…… 17

3.2 Objetivo general…… 17

3.3 Objetivos particulares…….. 18

IV. Materiales y métodos…… 19

4.1 Material vegetal…… 19

4.2 Variabilidad genética…… 20

4.2.1 Extracción del ADN genómico……. 20

4.2.2 Amplificación de marcadores ISTR…… 20

4.2.3 Amplificación de marcadores ISSR…… 21

4.2.4 Análisis de datos moleculares…… 22

4.3 Variabilidad morfológica del fruto…….. 23

4.4 Análisis de correlación de matrices…….. 23

V. Resultados…… 24

5.1 Variabilidad genética……... 24

5.1.1 Nivel de polimorfismo…… 24

5.1.2 Análisis de agrupamiento……. 26

5.1.3 Estructura genética de la población……... 27

5.2 Variabilidad morfológica del fruto…….. 29

5.2.1 Caracterización morfológica…… 29

5.2.2 Análisis de componentes principales……. 30

5.3 Análisis de correlación de matrices……... 32
VI. Discusión……. 33
6.1 Variabilidad genética…… 33
6.1.1 Nivel de Polimorfismo……... 33
6.1.2 Análisis de agrupamiento y estructura genética de la población…….. 34
6.2 Variabilidad morfológica del fruto…… 35
6.2.1 Caracterización morfológica…… 35
6.2.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)…… 35
6.3 Análisis de correlación de matrices…….. 36
VII. Conclusiones……. 37
VIII. Literatura citada…… 38

Índice de figuras

Figura		Página
Figura 1	Gráfico que representa el aumento de la producción y la superficie cultivada de mamey en los últimos 10 años	7
Figura 2	Esquema de transposición de los retrotransposones en una célula	11
Figura 3	Amplificación de un segmento de ADN entre dos secuencias de microsatélite	12
Figura 4	Patrón de amplificación en geles de poliacrilamida 6% para muestras de mamey	24
Figura 5	Patrón de amplificación en geles de agarosa de alta resolución 1% para muestras de mamey	25
Figura 6	Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA	26
Figura 7	Gráfico que representa el número óptimo de grupos genéticos en el análisis de estructura genética de la población	27
Figura 8	Representación gráfica de cada una de las simulaciones probabilísticas para la formación de grupos genéticos	28
Figura 9	Grafico de dispersión realizado con base en los dos primeros componentes principales	31

Índice de cuadros

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1	Secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación de los marcadores ISTR	21
Cuadro 2	Secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación de los marcadores ISSR	22
Cuadro 3	Nivel de polimorfismo detectado por los marcadores ISTR e ISSR	25
Cuadro 4	Valores de **Δ***K* para determinar el número de grupos genéticos.	27
Cuadro 5	Valores de diferenciación genética (Fst)	29
Cuadro 6	Valores de estadística descriptiva obtenidos para cada una de las variables analizadas de fruto de mamey	29
Cuadro 7	Cuadro de valores propios, varianza propia y varianza acumulada de cada uno de los componentes principales	30
Cuadro 8	Cuadro de vectores propios de los tres primeros componentes principales	31
Cuadro 9	Valores de coeficiente de correlación “r”	32

RESUMEN

El mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) ha sido un importante fuente de alimento en México y Centroamérica de dónde es originario, así como en otras zonas tropicales del mundo donde ha sido introducido. A pesar de la importancia que representa este recurso fitogenético no se han establecidos parámetros de variabilidad y diversidad genética que permitan llevar a cabo planes de desarrollo sustentable y explotación comercial. El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de variabilidad genética con el uso de marcadores ISTR e ISSR y a nivel fenotípico mediante características cuantitativas y cualitativas del fruto en una población de mamey cultivada con fines comerciales fuera de la zona de origen (Comala, Colima) para después comparar a nivel molecular a los individuos analizados con muestras colectadas en una localidad que se encuentra dentro de la zona de origen (Mérida, Yucatán). El estudio se llevo a cabo con treinta de los cien individuos que componen la población de Comala y ocho individuos que forman parte de un sistema agroforestal en el municipio de Mérida. En primera instancia se realizó un análisis molecular para determinar el nivel de variabilidad y la estructura genética de la población, donde se encontró que existe un alto nivel de variabilidad genética intrapoblacional y un grado considerable de diferenciación en términos de proporciones alélicas entre las muestras procedentes de Colima y Yucatán, los marcadores ISTR e ISSR demostraron ser útiles en la segregación de las muestras en función de su lugar de origen, en discrepancia con lo reportando en la literatura. Se realizó una caracterización morfológica y un Análisis de Componentes Principales con base en las características fenotípicas del fruto donde las más importantes para la formación de grupos fueron: longitud del fruto, peso del fruto, grosor longitudinal del mesocarpio, diámetro del fruto, número de semillas y forma del fruto. Por último se llevó a cabo una comparación de la variabilidad detectada a nivel fenotípico y molecular mediante un análisis de correlación de matrices, no se encontró que exista una correlación significativa entra los datos morfológicos y moleculares.

I. INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos se definen como el conjunto de genomas de las especies vegetales con un valor directo o potencial en la alimentación humana y en la agricultura. Debido a la importancia que suponen, es necesario conocer y caracterizar su variabilidad y estructura antes de iniciar programas de uso, manejo o sustentabilidad (FA0, 2013). Dentro de éste concepto se incluyen razas y variedades nativas, así como otras variedades desarrolladas por productores y fitomejoradores (Fraleigh, 2006).

Entre las herramientas más utilizadas para el estudio de la diversidad y la variabilidad biológica se encuentran la caracterización fenotípica y molecular. El objetivo del uso de dichas herramientas es la obtención de inferencias específicas o poblacionales mediante el análisis de características morfológicas, agronómicas y bioquímicas, así como características a nivel de ácidos nucleicos respectivamente (Almaraz-Abarca, 2011).

El mamey, *Puteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn, es una especie de importancia alimenticia en México y Centroamérica así como en otras zonas tropicales del mundo donde ha sido introducida. La relevancia principal del mamey como recurso alimenticio se da dentro de su zona de origen y diversificación, en el sur de México y Centroamérica. Sin embargo, su explotación y uso sustentable se han visto limitadas por el uso de un sistema de producción basado en pequeñas plantaciones familiares y recolecta en sistemas agroforestales (Nava-Cruz y Ricker, 2004).

El estudio de la diversidad y variabilidad genética del mamey es esencial en el desarrollo de estrategias que permitan en primera instancia conocer la diferenciación y estructura de éste recurso, y posteriormente garantizar la conservación y el uso sustentable de la especie (Azurdia, 2006). La variabilidad genética y fenotípica del mamey ha sido estudiada en poblaciones silvestres y en cultivares que se encuentran dentro o fuera de la zona de origen. En dichas investigaciones se han encontrado altos niveles de variación fenotípica para poblaciones silvestres así como cultivadas (Galván y Núñez, 1994; Azurdia y cols. 1997 y Gazel y cols. 1999). El estudio de la variabilidad con marcadores de ADN para el mamey ha sido escaso, en los trabajos disponibles el

nivel de polimorfismo encontrado en el material analizado ha oscilado entre alto y bajo, en función del marcador utilizado y la procedencia de los individuos bajo estudio (Carrara y cols. 2004).

Un aspecto en el que vale la pena hacer énfasis es el hecho de que, contrario a lo esperado, los niveles de variabilidad fenotípica y molecular reportados para plantaciones introducidas son altos, lo que sugiere que antes de establecer los cultivares hubo poco trabajo de selección (Carrara y cols. 2004; Bayuelo-Jiménez y cols. 2007 y Gaona-García y cols. 2008).

Al igual que otras sapotáceas, el mamey recibe relativamente poca atención por parte de los fruticultores, extensionistas y dependencias gubernamentales. Esto debido a la falta de información que permita desarrollar variedades resistentes a enfermedades y que sean fácilmente propagadas por métodos asexuales. Esta situación ha provocado que la exportación y difusión de ésta especie se vean limitadas (CFF, 2013). Ante esta problemática es aconsejable realizar una caracterización fenotípica y molecular que permita determinar los niveles de variación reales de ésta especie, y así establecer parámetros que permitan desarrollar un sistema de producción que garantice la satisfacción de la demanda del mercado local e internacional y la conservación de éste recurso fitogenético.

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia, uso y conservación de los recursos fitogenéticos

A nivel mundial existe una interdependencia de los recursos fitogenéticos por parte de las poblaciones humanas. Esto queda de manifiesto por el hecho de que ningún país del mundo es autosuficiente en la producción de recursos alimenticios basado en el germoplasma de sus especies nativas, lo que ha provocado la introducción de especies exóticas, llevando así a la diversificación de la agricultura (Rubenstein y cols. 2005).

Sin embargo, la introducción de especies exóticas en la agricultura ha provocado la invasión por parte de éstas en comunidades vegetales naturales, donde provocan cambios en la dinámica de los ecosistemas nativos, modificación de parámetros de competencia, depredación e hibridación intraespecífica. Por otra parte y aunado a lo anterior, en los últimos 50 años se ha optado por reemplazar algunas razas y variedades tradicionales por otras de constitución genética más uniforme, lo que provoca a mediano y largo plazo una disminución importante de los recursos fitogenéticos disponibles inicialmente (Fraleigh, 2006). Ante ésta problemática se ha optado por desarrollar estrategias que permitan conservar dichos recursos *in situ* o *ex situ* con la finalidad de promover su uso sustentable (Martín-Martínez, 2005).

El mejoramiento genético vegetal es quizá la actividad principal por la cual los recursos fitogenéticos adquieren un valor incalculable desde distintos puntos de vista. El objetivo de dicha actividad consiste en proporcionar con base en el germoplasma inicial, el desarrollo de nuevas variedades o formas que presenten características atractivas a un fin particular como puede ser: aumento en el rendimiento neto, resistencia a plagas o enfermedades, tolerancia al estrés hídrico, disminución de compuestos tóxicos como compuestos fenólicos y alcaloides en la planta, etc. (Poehlman y Allen-Sleper, 2005).

Antes de realizar cualquier trabajo de mejoramiento genético, manejo agronómico o programa de sustentabilidad, es indispensable conocer ciertos parámetros fenológicos, reproductivos y genéticos de la especie a tratar. Entre las características más importantes a observar se encuentra la variabilidad, diversidad y estructura genética. Su importancia radica en que el

conocimiento de dichos atributos permitirá entender y utilizar sus parámetros hereditarios en programas de mejoramiento y conservación.

Debido a la importancia de los recursos fitogenéticos para la estabilidad y supervivencia de las poblaciones humanas, su estudio, conservación, así como su manejo y uso sustentable representan actividades fundamentales para el desarrollo agrícola así como para garantizar la seguridad alimentaria (Martín-Martínez, 2005).

2.2 Especies frutales como recursos fitogenéticos

Las especies frutales en las zonas tropicales y templadas del mundo han jugado un papel fundamental en el desarrollo de las sociedades incluso antes de la civilización. A pesar de que la domesticación y el mejoramiento genético de frutales son actividades practicadas desde hace mucho tiempo, existen muchas especies en la actualidad que no han sido debidamente manejadas y utilizadas, por lo que el consumo de sus frutos queda solamente relegado al nivel local mediante el establecimiento de sistemas agroforestales o colecta de las poblaciones silvestres (Zagaja, 1988).

El conocimiento de la diversidad y la variabilidad intraespecífica es la base para la conservación y uso de los recursos fitogenéticos en frutales. Sin embargo se ha hecho un esfuerzo mucho menor en la descripción y conocimiento sistemático de la diversidad y variabilidad genética de muchos frutales en comparación con los cultivos básicos (Lamb, 1974).

En México las 64 especies frutales que ocupan los primeros lugares en cuanto a producción representan el 10% de la superficie cultivada y el 14% de las divisas del sector agropecuario (Segura-Ledesma y cols. 2009). Según Borys y Leszczyñska (2001), el número total de frutales producido en México es de 621 especies, considerando especies nativas y exóticas. Los frutales nativos representan menos del 5% de las especies de interés comercial, hecho que deja de manifiesto la preferencia del mercado por los frutos de especies exóticas.

Con respecto a la conservación de los recursos fitogenéticos en frutales se tiene muy poca información disponible. Esto debido a que las colecciones de germoplasma de muchas especies

tropicales se encuentran incompletas o representan solamente muestras sesgadas de las poblaciones nativas (Zagaja, 1988).

La valorización de los recursos fitogenéticos frutales no es tarea fácil. Además de la investigación genética, se requiere llevar a cabo estudios de mercado y de caso, inventarios de especies cultivadas, así como análisis sobre la situación socioeconómica de los productores de dichas especies, con la finalidad de desarrollar estrategias de uso, explotación y conservación (Segura-Ledesma y cols. 2009).

2.3 El Mamey como recurso fitogenético subutilizado

En la familia Sapotaceae hay especies que producen frutos que son consumidos por las comunidades humanas. Este es el caso de los géneros *Pouteria* y *Chrysophyllum,* cuya producción se ha restringido a las zonas de origen. Esto ha provocado que las instituciones gubernamentales y de investigación no presten atención al aprovechamiento y desarrollo de este recurso (Azurdia, 2006).

El mamey es una especie nativa del sureste de México cuya distribución se extiende hasta Nicaragua en América Central. El árbol de mamey produce frutos comestibles, aunque la madera, el látex del tallo y las semillas son también son de potencial aprovechamiento. Al igual que otras especies del género es poco aprovechado, a pesar de que se trata de un cultivo rentable y con gran potencial industrial (Nava-Cruz y Ricker, 2004).

En las últimas décadas el aumento en la producción neta y en la superficie cultivada de mamey ha sido considerable (Azurdia y Ortiz, 2003; SIAP-SAGARPA, 2013). Las principales zonas de producción se encuentran en los países que conforman el centro de origen y diversidad. México Guatemala y Honduras ocupan los primeros lugares de producción, sin embargo existen plantaciones comerciales en Cuba, Estados Unidos, Brasil y Filipinas (CFF, 2004).

En México el mamey se produce en 15 estados bajo la modalidad de riego y temporal, su cultivo tiene un área aproximada de 1612 hectáreas. Los estados con mayor rendimiento y superficie cultivada son: Yucatán, Chiapas, Guerrero, Tabasco y Michoacán. En la última década en México

el número de hectáreas de cultivo y la producción neta de fruto han tenido un aumento del 67% y 42% respectivamente (Fig. 1) (Arcos-López, 2011 y SIAP-SAGARPA, 2013 b).

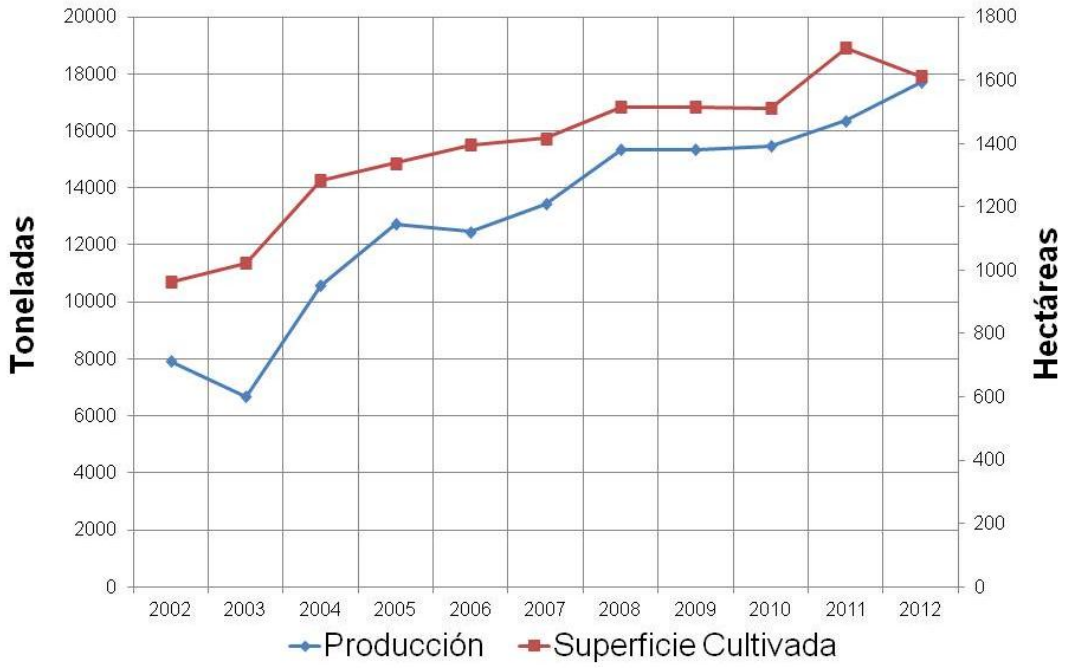

Figura 1. Gráfico que muestra el aumento en México de la superficie cultivada y la producción de mamey en los últimos 10 años (SIAP-SAGARPA, 2013)

A pesar del aumento del cultivo de mamey, la base de la producción sigue siendo por colecta de extracción. Los frutos que se recolectan de las zonas limítrofes con las poblaciones humanas y las plantas productoras no reciben ningún tipo de manejo agrícola (Nava-Cruz y Ricker, 2004). Existen otros sistemas de producción como los huertos de traspatio y sistemas agroforestales, donde las plantas de mamey se encuentran asociadas a otros cultivares como mango, café, cítricos y otras especies de sapotáceas (Azurdia, 2006).

Dadas las características de cultivo de mamey, así como algunas otras propiedades intrínsecas a su producción, la asociación Crops for the Future (CFF) anteriormente denominada Centro Internacional de Cultivos Subutilizados (ICUC por sus siglas en inglés) ha clasificado a ésta especie como un cultivo subutilizado, por varias razones, entre las que se encuentran: gran cantidad de variación genética intraespecífica; uso y procesamiento de la especie a nivel local;

cultivo que recibe poca atención por parte de instituciones de investigación, productores, extensionistas y de organismos encargados de toma de decisiones así como desconocimiento o poco aprecio por las características medicinales, culinarios u organolépticas (CFF, 2013).

El cultivo de mamey presenta dificultades en el manejo postcosecha: como problemas de almacenamiento, susceptibilidad a plagas y enfermedades y duración de vida de anaquel. La causa de ésta problemática es quizá la falta de manejo agronómico y desarrollo de variedades resistentes a enfermedades y uniformes en el tratamiento postcosecha (Gómez-Jaimes, y cols. 2012).

La importancia del conocimiento de la diversidad y variabilidad genética y fenotípica del mamey radica en que es la base para la conservación, utilización, búsqueda de alternativas para la diversificación agrícola así como para prevenir y contrarrestar la degradación del recurso genético en la zona de origen y diversidad.

2.4 Variabilidad genética y fenotípica

En la actualidad los caracteres fenotípicos y moleculares son herramientas ampliamente utilizadas para resolver problemática de índole filogenética, poblacional o ecológica (Rentería-Alcántara, 2007).

2.4.1 Variabilidad a nivel morfológico

Dentro de los caracteres fenotípicos, los morfológicos son los más ampliamente utilizados. Éstos caracteres incluyen características discretas que presentan pocas categorías de morfología externa o morfométricas que emplean variables continuas a nivel anatómico interno y externo (Morrone, 2013).

Entre las ventajas que representa el uso de marcadores morfológicos en el estudio de la variabilidad intraespecífica se encuentran la facilidad de medición de los caracteres, su obtención y análisis resulta relativamente económico y son aplicables a prácticamente todos los organismos

(Rentería-Alcántara, 2007). Sin embargo al abordar el estudio de la variabilidad y la diversidad genética, los marcadores morfológicos presentan una serie de desventajas: 1) su expresión está influenciada por las condiciones ambientales, 2) se necesita por lo general un tiempo de espera prolongado para ser observados y 3) frecuentemente se seleccionan con criterios subjetivos (Hillis, 1987; Azofeifa-Delgado, 2006 y Rentería Alcántara, 2007).

2.4.2 Variabilidad a nivel molecular

La comprensión de los fenómenos genéticos moleculares en plantas es indispensable para la conservación, manejo y eficiente utilización de los recursos fitogenéticos (Mondini y cols. 2009). El conocimiento de fenómenos poblacionales en plantas silvestres y cultivadas se ha incrementado con la aplicación de técnicas moleculares (Excoffier y cols. 1992).

En contraste con los atributos morfológicos, el uso de características moleculares para el estudio de la variabilidad genética tiene una serie de ventajas: son marcadores fenotípicamente neutros, por lo general presentan mayor cantidad de polimorfismo, pueden ser evaluados durante cualquier estadio del desarrollo de la planta, y se encuentran libres de efectos epistáticos (Valdez-Moctezuma y Kahl, 2000; Weising y cols. 2005).

Un marcador molecular ideal debe cumplir con ciertas características para garantizar una conclusión sólida para la problemática estudiada: debe ser moderado o altamente polimórfico, con herencia codominante (capaz de distinguir entre homocigotos y heterocigotos), presencia frecuente a lo largo del genoma, ausencia de efectos pleitrópicos, experimentalmente sencillo, económico y con una alta reproducibilidad (Weising y cols. 2005 y Segman y cols. 2006).

Pese a que el uso de los marcadores moleculares representa la mejor alternativa para abordar el estudio de la dinámica poblacional, el análisis conjunto de la variación morfológica y molecular provee un marco de comparación más amplio que permitirá el establecimiento de inferencias más precisas de los patrones de variabilidad intra e interpoblacionales (Hillis, 1989).

2.5 Marcadores ISTR

Los elementos transposables (TEs) representan una porción considerable de las secuencias interespecíficas repetitivas de los genomas de mucho organismos eucariotas (Kalendar y cols. 2011). Por la forma en la que se insertan en el genoma, los TEs se dividen en dos clases: los transposones Clase I que son secuencias que se movilizan a través del genoma utilizando un intermediario de ARN, el cual es sintetizado vía una ARN polimerasa, de tal forma que la secuencia original conserva su lugar original en el genoma (Havecker, y cols. 2004; Kalendar y cols. 2011). Los elementos Clase I se dividen a su vez en retrotransposones de terminales largas (LINES) y en retrotransposones espaciados cortos y largos (SINES). Los LINES se encuentran entre los elementos más abundantes en los genomas vegetales (Pearce y cols.1996). Los transposones Clase II por su parte se movilizan por el genoma mediante un mecanismo corte-pegado, por lo que la secuencia encuentra una nueva posición en el genoma (Wessler, 2006).

Se han desarrollado diferentes técnicas de marcaje de ADN basadas en los elementos transponibles. Entre ésta serie de técnicas se encuentran los ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat). Los ISTR son marcadores dominantes (no se discriminan entre homocigotos y heterocigotos), son detectables vía síntesis *in vitro* por PCR y utilizan la propiedad de los elementos repetidos en las regiones terminales de los retrotransposones (LTR) de los cuales se generaron. Los elementos LTR son considerados una herramienta valiosa en el estudio de la diversidad genética, evolución del genoma, mutación y expresión génica (Lightbourn y cols. 2007).

Teóricamente la técnica de ISTR se basa en la detección de polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones en el genoma, lo que crea nuevas conexiones entre el ADN genómico y las secuencias altamente específicas que se encuentran en los extremos del elemento transponible (Fig. 2) (Rhode, 1996; Torres-Morán, 2009 y 2011).

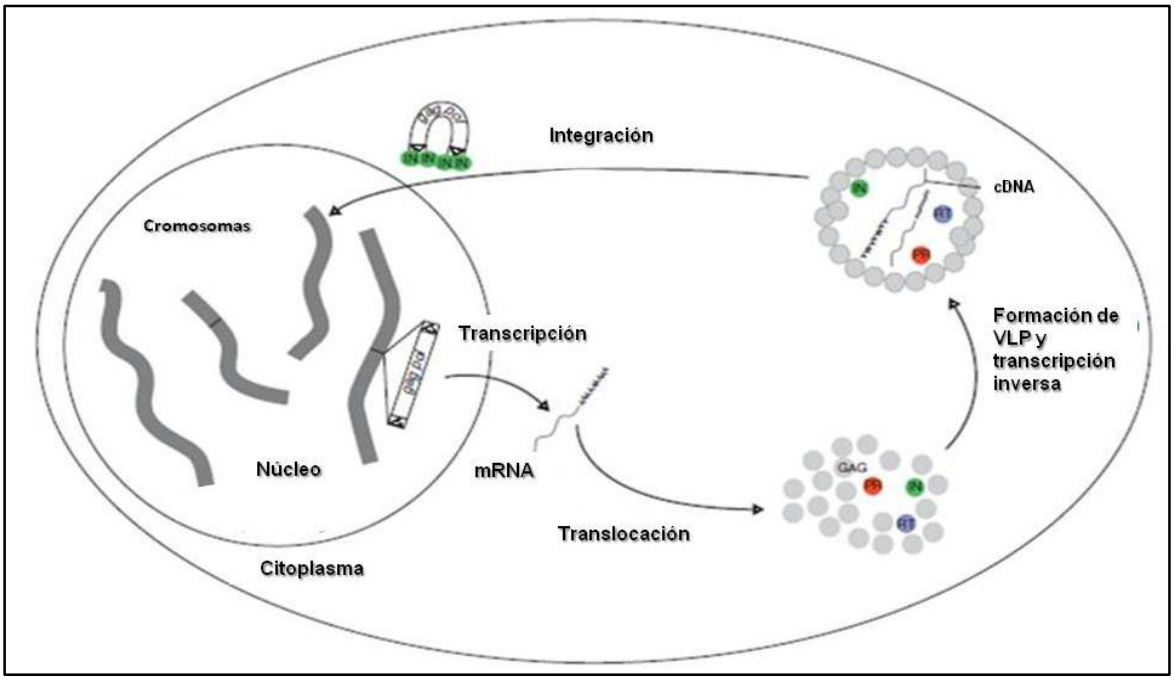

Figura 2. Esquema de transposición de los retrotransposones en una célula. IN, Integrasa; RT, Retrotranscriptasa; PR, Proteasa; VLP, *virus-like* partícula, Triángulos blancos indican la posición de los LTRs (Tomado de Havecker y cols. 2004)

Los ISTR presentan una serie de ventajas técnicas con respecto a otras técnicas moleculares, por ejemplo: uso de iniciadores universales, visualización del patrón de bandeo sin necesidad de radioactividad, amplificación de un gran número de *loci* (entre 5 y 100), detección de niveles considerables de polimorfismo, reproducibilidad alta, no es necesario ADN de alta calidad ni en grandes cantidades para llevar a cabo la amplificación por PCR y son aplicables a un amplio rango de organismos (Lightbourn y cols. 2007).

Los ISTR han sido probados con distintas especies frutales como vid (Sensi y cols. 1996), manzana (Tignon y cols. 2001), pera (Shi y cols. 2002), coco (Alonso-Esquivel y cols. 2008) y aguacate (Rodríguez-Medina y cols. 2009).

2.6 Marcadores ISSR

Los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) o intermicrosatélites son marcadores moleculares que permiten identificar polimorfismo en las secuencias que se encuentran entre microsatélites (González y Aguirre, 2007).

Las regiones amplificadas entre los microsatélites tienden a ser secuencias altamente variables entre un individuo y otro, esto se debe a que las tasas de mutación por adición o deleción de nucleótidos durante la replicación suelen ser muy altas en los microsatélites, lo que hace que la probabilidad de encontrar alelos polimórficos sea muy alta, por esta razón resultan de gran utilidad en el estudio de la variabilidad genética (Pradeep-Redy y cols. 2002).

Los intermicrosatélites son marcadores dominantes, que se obtienen por amplificación *in vitro* vía PCR mediante oligonucleótidos que consisten en un motivo repetido de di o tri nucleótidos complementarios a la secuencia del microsatélite, a veces es posible agregar una secuencia de dos nucleótidos arbitrarios que servirán de anclas para asegurar una amplificación en sentido 5' o 3' del microsatélite según sea el caso (Zietkiewicz y cols. 1994).

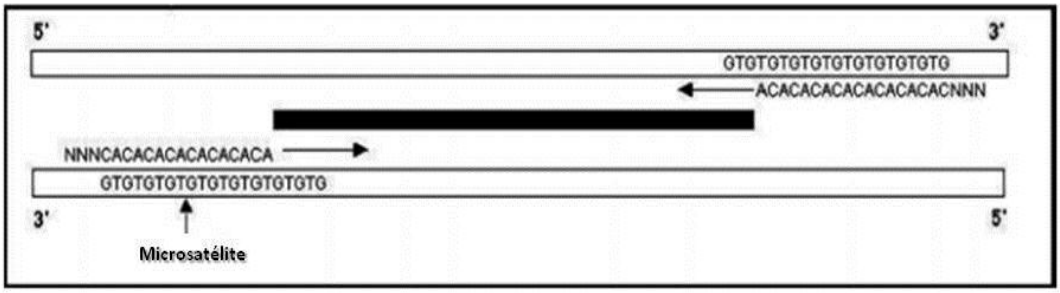

Figura 3. Amplificación de un segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélite (rectángulo negro) con un oligonucleótido (CA_n) anclado en el extremo 5' (Tomado de González y Aguirre, 2007).

La principal ventaja para la utilización de ésta técnica, es la detección de altos niveles de polimorfismo. Sin embargo, existen otras que favorecen su empleo: alta reproducibilidad por elevadas temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos, no se requieren grandes concentraciones de ADN, no es necesario tener conocimiento previo del genoma para el diseño de los oligonucleótidos, los fragmentos amplificados se pueden visualizar en geles de agarosa o poliacrilamida, no es necesario el uso de radioactividad, son económicos, experimentalmente sencillos y de montaje rápido (González y Aguirre, 2007).

El nivel de polimorfismo que detectan los intermicrosatélites resulta útil para la resolución de muchos problemas biológicos en especial para la distinción intraespecífica, por ejemplo individuos pertenecientes a variedades distintas (Wolfe, 2000). En frutales los ISSR han sido utilizados en

una gran cantidad de cultivos, entre los que destacan cítricos (Fang y cols. 1997), papayo (Saxena y cols. 2005) y palma datilera (Hamza y cols. 2013).

2.7 Antecedentes del estudio de la variabilidad genética de mamey

Aunque existe un acervo importante de información con respecto a diferentes características del cultivo de mamey como: producción (Pohlan y cols. 2000; Nava-Cruz y Ricker, 2004 y Arcos-López, 2011) y manejo postcosecha (Díaz-Pérez y cols. 2000, 2001 y Gómez-Jaimes, 2012), los trabajos de variabilidad genética (molecular) y fenotípica (morfoagronómica y bioquímica), han sido relativamente escasos (Bayuelo-Jiménez y cols. 2007).

2.7.1 Variabilidad isoenzimática

Se han llevado a cabo algunos trabajos utilizando marcadores bioquímicos (enzimas) para conocer aspectos de la diversidad y variabilidad genética de muestras de mamey bajo condiciones de cultivo en Guatemala. En éstos se reporta que cada individuo puede ser identificado por la obtención de zimogramas procedentes de la combinación de enzimas polimórficas. Además existe un amplio rango de variación entre los individuos estudiados, lo que según los autores, confirma que en esta zona la especie no ha sido sometida a un proceso de domesticación (Azurdia y cols. 1999 y Azurdia 2006).

Azurdia en 1997, llevó a cabo otro estudio con enzimas para materiales provenientes de cultivares y de poblaciones silvestres. En esta investigación se pudo observar que no existe una separación clara entre las plantas silvestres y cultivadas. Se concluyó que dichos resultados se debieron a que los individuos cultivados fueron obtenidos a partir de genotipos silvestres, provienen de sistemas agroforestales, o son remanentes de la vegetación original.

2.7.2 Variabilidad a nivel morfológico

La variabilidad morfológica, especialmente a nivel de fruto, ha sido ampliamente estudiada. Los trabajos realizados al respecto abarcan poblaciones silvestres y cultivares dentro y fuera de la zona de origen.

Gazel-Filho y cols. (1999) estudiaron la variación presente en las plantas de mamey depositadas en la colección del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) de Costa Rica. Se caracterizaron 63 plantas provenientes de poblaciones silvestres desde México hasta Nicaragua con base en caracteres morfológicos, agronómicos y de calidad (variables fisicoquímicas) mediante el uso del Análisis Canónico Discriminante (ACD) para buscar diferenciación entre grupos. El ACD mostró la formación de seis grupos, donde las tres primeras funciones canónicas explican el 80% de la variación acumulada. Las variables más significativas para la formación de grupos fueron características cuantitativas del fruto y las características fisicoquímicas.

Espinoza y cols. (2005) realizaron una caracterización morfológica de fruto para árboles que crecen en el este de Guerrero. Se midieron seis características con la finalidad de identificar genotipos promisorios para selección. Se encontró que los caracteres que presentan una mayor variabilidad son: aspecto externo del fruto: (textura de la cáscara) y proporción del fruto (porcentaje de cáscara, pulpa y semilla con respecto al total).

Bayuelo-Jiménez y cols. (2007) realizaron una caracterización para los árboles pertenecientes a diferentes cultivares del estado de Michoacán. Se evaluaron 23 características del árbol, del fruto y fisicoquímicas. Las muestras fueron evaluadas mediante un ACD para identificar diferencias morfológicas entre los grupos formados *a priori* (poblaciones de origen de cada material). El ACD reveló la formación de siete grupos, y los caracteres que más contribuyeron a las funciones canónicas fueron las características del fruto y las fisicoquímicas.

Gaona-García y cols. (2008) estudiaron la variabilidad existente en distintas plantaciones mamey en el estado de Morelos. Consideraron siete características morfológicas y químicas del fruto con el objetivo de identificar genotipos promisorios para posteriores programas de selección. Se realizó un análisis de conglomerados con índice de Distancia Taxonómica Media donde se identificó la formación de siete grupos, tres de los cuales presentaron potencial hortícola (frutos pequeños o medianos, alargados y con una sola semilla). En adición al análisis de conglomerados se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), donde se observó que los tres primeros

componentes explicaron el 70% de la variación total. Las características que más contribuyeron en la formación de los tres componentes principales fueron: longitud, ancho y masa del fruto.

Elias-Nascimiento y cols. (2008) estudiaron la variabilidad morfológica y química de una población en Sao Paulo, Brasil, con la finalidad de elegir genotipos aptos para la selección. Evaluaron cuatro características morfológicas y cinco fisicoquímicas. Mediante el análisis de conglomerados (para las características morfológicas y para las fisicoquímicas) se llegó a la conclusión de que las los atributos que más contribuyen a la formación de grupos son grosor de la pulpa y el contenido de ácido ascórbico.

Arellano-Durán (2012) realizó una caracterización morfológica de accesiones provenientes de los estados de Puebla, Veracruz y Yucatán. Fueron tomadas en cuenta 35 características cuantitativas del árbol, hoja, fruto y semilla así como 8 caracteres cualitativos de semilla, fruto y árbol. Se llevó a cabo un ACP en el que los cuatro primeros componentes explicaron el 81 % de la variación total. Se observó que la mayoría de las variables involucradas en los 4 componentes correspondían a valores del fruto (peso y grosor de la pulpa), la semilla y el tallo.

Ibarra-Estrada (2012) estudió 23 variables químicas y morfológicas del fruto y la semilla para 13 selecciones de mamey provenientes de Guerrero, Veracruz y Yucatán, realizó un ACP y los cuatro primeros componentes explicaron el 76% de la variación total; las variables que más aportaron para la formación de dichos componentes fueron: longitud del fruto, peso de la semilla, longitud de la semilla, número de semillas y grosor del epicarpio, grosor del fruto, contenido de ácido linoleico y esteárico.

2.7.3 Variabilidad a nivel molecular

El estudio de la variabilidad genética del mamey utilizando marcadores moleculares es relativamente reciente. En los últimos 10 años se han llevado a cabo únicamente tres trabajos de variación molecular.

Carrara y cols. (2004) estudiaron la variación molecular de dos colecciones de germoplasma del Fairchild Tropical Botanical Garden (FTBG) y del Tropical Research and Education Center (TREC)

en Florida, EUA mediante el uso de AFLPs (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados, por sus siglas en inglés). El total de las accesiones se dividió en tres grupos por el origen del material: Cuba, Costa del Pacífico en Centroamérica y Península de Yucatán. El análisis de agrupamiento mostró que las muestras de Cuba y la Península de Yucatán presentaron alto grado de similitud y las muestras de Cuba fueron poco similares a las de la costa del Pacífico. A pesar de que no se encuentra bien representada la zona de origen en las colectas de este trabajo, la variabilidad genética fue alta, lo que sugiere que para tener una colección representativa de la variabilidad genética total es necesario llevar a cabo una colecta extensiva.

Arellano-Durán (2012) evaluó la capacidad de discriminación del marcador AFLP entre plantas de la zona de origen y plantas provenientes de los estados de Puebla, Veracruz, Yucatán y Guerrero. Se encontró que entre las muestras analizadas existe un bajo número de bandas polimórficas. Sin embargo, al analizar poblaciones cultivadas dentro y fuera de la zona de origen, no existe diferenciación plena con respecto a su ubicación geográfica.

Ibarra-Estrada (2012) evaluó la variabilidad genética que existe entre 14 selecciones de mamey provenientes de los estados de Yucatán y Guerrero. Utilizó marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA, de sus siglas en inglés) y RAMP (Randomly Amplified Microsatellite Polymorphism de sus siglas en inglés). Mediante la técnica RAPD amplificaron 80 *loci* con un nivel de polimorfismo de 75%, mientras que con RAMP fueron amplificados 40 *loci*, 87% de los cuales resultaron polimórficos. Se realizó un análisis de agrupamiento con los datos obtenidos para cada una de las técnicas, con la formación consecuente de cinco y seis grupos respectivamente. Con ninguno de los dos marcadores se pudo distinguir, mediante la formación de grupos, la procedencia de las selecciones.

III. JUSTIFICACIÓN

El entender el papel de los recursos fitogenéticos en el desarrollo de la sociedad humana y ser conscientes de la importancia de su preservación, no es suficiente para generar la materia prima necesaria para cubrir las necesidades básicas de consumo. Para hacer eficiente el uso de éstos recursos es necesario en primera instancia otorgarles un valor económico y sociocultural real así como describir los beneficios asociados a su uso, esto justifica el estudio de su diversidad genética (Rubenstein y cols. 2005).

En los países que conforman la zona de origen y diversidad del mamey, el cultivo de esta especie se ha convertido en una actividad que ha adquirido importancia en los últimos años. Sin embargo, por la falta de conocimiento sobre su selección y manejo agronómico la especie ha sido clasificada como un recurso subutilizado.

La importancia de este trabajo reside en evaluar la variabilidad genética del amey con datos moleculares que permitirán caracterizar adecuadamente este recurso. La caracterización morfológica del fruto por su parte, contribuirá a observar si esta población presenta una correlación entre sus niveles de variación genética y variación fenotípica.

3.1 Hipótesis

En la población del estado de Colima al igual que en otras zonas tropicales de México, donde el mamey ha sido introducido, existen altos niveles de variación genética y fenotípica.

El análisis de estructura genética de la población analizada será un indicador de la variabilidad presente en la población. Además de mostrar une separación de individuos en función de los factores genéticos que componen su estructura.

3.2 Objetivo General

Detectar los niveles de variación genética mediante los marcadores ISTR e ISSR y la variación fenotípica del fruto mediante una Análisis de Componentes Principales de una población de mamey en Comala, Colima.

3.3 Objetivos Particulares

I. Evaluar la capacidad de los marcadores moleculares para establecer relaciones entre los individuos colectados en Colima y en Yucatán.

II. Determinar la estructura genética de la población de mamey ubicada en el Municipio de Comala, Colima con base en los datos obtenidos de los marcadores ISTR e ISSR y compararla con los individuos de Mérida, Yucatán.

III. Analizar la posible correlación entre la variación morfológica y molecular a nivel intrapoblacional.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Se colectó el material vegetal de mamey en una localidad del municipio de Comala, Colima. Los individuos que conforman la población de Comala fueron establecidos de semillas hace 114 años procedentes de árboles silvestres del municipio de Mérida, Yucatán.

De los 30 individuos colectados en la población, 15 consistieron en árboles sexualmente maduros usados para fines prácticos y los 15 restantes eran árboles jóvenes, sexualmente inmaduros, denominados plántulas. Para llevar a cabo la colecta de los ejemplares adultos se seleccionaron individuos que tuvieran una separación espacial de al menos 50 metros. El material colectado fue colocado en bolsas plásticas, etiquetado y conservado a una temperatura de -20°C en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Manejo de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Para la caracterización morfológica de fruto, fueron consideradas las 15 plantas adultas de la localidad de Colima. Fueron registrados los parámetros de 6 variables cuantitativas y 1 cualitativa de 50 frutos maduros de cada uno de los árboles seleccionados. Los parámetros morfológicos fueron seleccionados con base a la capacidad de separación de grupos o a la variabilidad intrapoblacional reportada en la literatura (Gazel-Filho y cols. 1999, Espinoza y cols. 2005, Bayuelo-Jiménez y cols. 2007, Gaona-García y cols. 2008, y Arellano-Durán 2012).

Adicionalmente a la población de Comala fueron seleccionados 8 individuos de una plantación de traspatio del municipio de Mérida, Yucatán con la finalidad de inferir asociación genética entre las árboles de Colima y Yucatán.

4.2 Variabilidad Genética

4.2.1 Extracción del ADN genómico

El material vegetal para la obtención del ADN, consistió en 300 mg de tejido foliar. Se extrajo ADN de 30 muestras foliares mediante el uso del protocolo reportado por Keb-Llanes y cols (2002), que usa el detergente CTAB (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio) como elemento regulador en la extracción y lisis; además prescinde de solventes orgánicos para la purificación del ADN.

El ADN de cada una de las muestras se cuantificó y se evaluó su calidad mediante espectrofotometría. La integridad de cada muestra de ADN se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Con base en la cuantificación espectrofotométrica de ADN, se prepararon diluciones de trabajo a concentraciones de 100 y 25 ng/µL (Sambrook y Russell, 2001).

4.2.2 Amplificación de marcadores ISTR

La amplificación de los fragmentos a analizar se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se siguió el protocolo reportado por Osorio y cols. (2006) para ISTR en un volumen final de mezcla de reacción de 20 µL. Se utilizaron 25 ng de ADN, amortiguador para PCR 1 X [pH 7.2 Tris-HCl], 3 mM de $MgCl_2$, 0.03 µM de cada iniciador, 0.25 mM de dNTPs y 1U Taq Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 3 s; alineación a 45°C por 1 min y extensión a 72°C durante 2 min, por último una extensión final a 72°C durante 10 min. Una vez finalizada la reacción, las muestras fueron almacenadas a 4°C.

Para cada una de las muestras fueron utilizadas dos combinaciones de oligonucleótidos: F1/B31 y F91/B1, donde la letra F indica el iniciador sentido y B el iniciador antisentido. La secuencia de cada uno de los iniciadores ISTR está indicada en el cuadro 1.

Los productos de la PCR fueron resueltos mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6% a 200 volts durante 5 h. Los geles fueron teñidos con sales de plata según el protocolo reportado por Sanguinetti y cols. (1994). Se utilizó un sistema de fotodocumentación Kodak ® 100 para la visualización y captura de los geles.

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores utilizados en este trabajo para la amplificación de los marcadores ISTR.

Oligonucleótido	Secuencia 5'- 3'
F1	GCA CTC CAC CAA GAA TAC C
B31	ATT CCC ATC TGC ACC AAT
F91	ATA TGG ACT TAA GCA AGC CA
B1	ATC AGG AAG GTC TGT AAA GC

4.2.3 Amplificación de marcadores ISSR

Al igual que los marcadores ISTR, los fragmentos obtenidos para el marcador ISSR fueron amplificados mediante PCR. La reacción fue llevada a cabo según el protocolo reportado por Sica y cols. (2005) en un volumen final de 20 µL. Se utilizaron 25 ng de ADN, amortiguador para PCR 1 X [pH 7.2 Tris-HCl], 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.8 µM del oligonucleótido, 0.25 mM de dNTPs y Taq Polimerasa 0.5 U. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización de 95 °C durante 45 seg; alineamiento de los iniciadores a 52 °C durante 45 seg y una extensión a 72°C durante 1 min con 30 seg, finalmente una elongación final a 72 °C durante 10 min. Los productos obtenidos fueron almacenados a 4 °C. Para la amplificación de cada una de las muestras se utilizaron 3 oligonucleótidos: 899, 901 y 902. La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos está indicada en el cuadro 2.

Los fragmentos amplificados fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución 1.5% a 100 volts durante 1 hora con 30 minutos. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). El patrón de bandeo de los geles fue visualizado y capturado usando el sistema de fotodocumentación Kodak ® 100.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados en este trabajo para la amplificación de los marcadores ISSR

Oligonucleótido	Secuencia 5'- 3'
899	CAC ACA CAC ACA-RG
901	GTG TGT GTG TGT-YR
902	GTG TGT GTG TGT-AY

4.2.4 Análisis de datos moleculares

Con base en el patrón de bandeo obtenido para cada uno de los iniciadores de los dos marcadores utilizados se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia conjunta. Los datos de dichas matrices sirvieron de base para los análisis posteriores. Se calculó el porcentaje de bandas polimórficas detectado por cada uno de los iniciadores bajo el criterio de considerar como monomórficas aquellas bandas presentes en más del 95 % de los individuos.

A continuación se calculó el índice de similitud de Jaccard entre las muestras. El coeficiente fue seleccionado por ser uno de los más adecuados para la estimación de similitudes genéticas obtenidas a partir de marcadores dominantes (Lowe y cols. 2004). Además se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA (Media aritmética sin ponderación, por sus siglas en inglés). El cálculo del coeficiente de similitud así como el análisis de agrupamiento se hicieron con el programa NTSyS versión 2.11 (Rohlf, 2002). Para confirmar la confiabilidad de la topología obtenida en el dendrograma se utilizó la técnica de remuestreo con un 95% de confianza y 10,000 repeticiones mediante el uso del programa Free Tree (Pavlicek y cols. 1999).

Por último se realizó un análisis de la estructura genética de la población de Colima y de las muestras de Yucatán. Este análisis consiste en el uso de modelos Bayesianos basados en métodos de agrupamiento que determinan la probabilidad de que un individuo provenga de un grupo genético determinado (Pritchard y cols. 2000), en el presente trabajo se utilizaron 15,000 simulaciones y 15,000 iteraciones. Se usó el método de Evanno y cols. (2005) para determinar el número óptimo de grupos genéticos (K) con base en la prueba estadística **Δ** en el análisis de

estructura genética de la población. Se calculó el grado de diferenciación genética en términos de frecuencias alélicas (Fst). El máximo valor de este estimador es de 1 e indica la fijación de alelos alternativos en diferentes poblaciones o subpoblaciones y 0 indica la no diferenciación; esto es, cuando el valor de Fst se encuentra entre 0 y 0.05, la diferenciación genética es pequeña, valores entre 0.05 y 0.15 indican una diferenciación moderada; entre 0.15 y 0.25 es grande y mayor que 0.25 muy grande. El análisis de estructura genética y el grado de diferenciación genética (Fst) se llevó a cabo con el programa STRUCTURE versión 2. La prueba estadística **Δ** se llevó a cabo mediante el uso del programa en línea STRUCTURE HARVESTER (Earl y van Holdt, 2012; y Earl, 2013).

4.3 Variabilidad morfológica del fruto

Para llevar a cabo el análisis de variabilidad fenotípica observada en el fruto se tomaron medidas de 7 variables de los árboles seleccionados: peso total, longitud total y diámetro total del fruto, número de semillas, grosor de la pulpa en corte longitudinal, grosor de la pulpa en corte transversal y forma del fruto. Las medidas fueron tomadas con un vernier. La forma del fruto se incluyó en tres estados de caracter: redondo, ovalado y alargado, para facilitar el análisis los valores cualitativos fueron transformados a cuantitativos mediante la asignación de un número del uno al tres a cada estado de caracter. Se construyó una base de datos y se obtuvieron los parámetros de estadística descriptiva para cada variable. Las variables evaluadas fueron estandarizadas con la finalidad de que todas tuviesen el mismo peso y no fuesen afectadas por las unidades de medida. Finalmente se realizó un ACP con el programa NTSyS 2.11 (Rohlf, 2002).

4.4 Análisis de correlación de matrices

Con la finalidad de observar correlaciones entre los datos obtenidos por el análisis molecular y el fenotípico se hizo un análisis de correlación de matrices mediante el uso de la prueba de Mantel (Mantel, 1967; Manifiesto y cols., 2001; Arellano-Durán, 2012) en el programa NTSyS 2.11 (Rholf, 2002).

V. RESULTADOS

5.1 Variabilidad genética

5.1.1 Nivel de polimorfismo

La amplificación para los 38 individuos de mamey con las dos combinaciones de oligonucleótidos del marcador ISTR y los tres oligonucleótidos del marcador ISSR en los geles de poliacrilamida (Figura 4) y agarosa HR (Figura 5) produjo un total de 138 bandas, 102 bandas para el marcador ISTR y 36 para el marcador ISSR (Cuadro 3). De estas 126 resultaron polimórficas, 95 bandas para ISTR y 31 bandas para ISSR, lo que representa un 91.3% de polimorfismo detectado. Los niveles de polimorfismo para cada combinación de iniciadores de ISTR oscilan entre 92.5 y 93.5% mientras que para los ISSR se encuentran entre 85.7% y 90%.

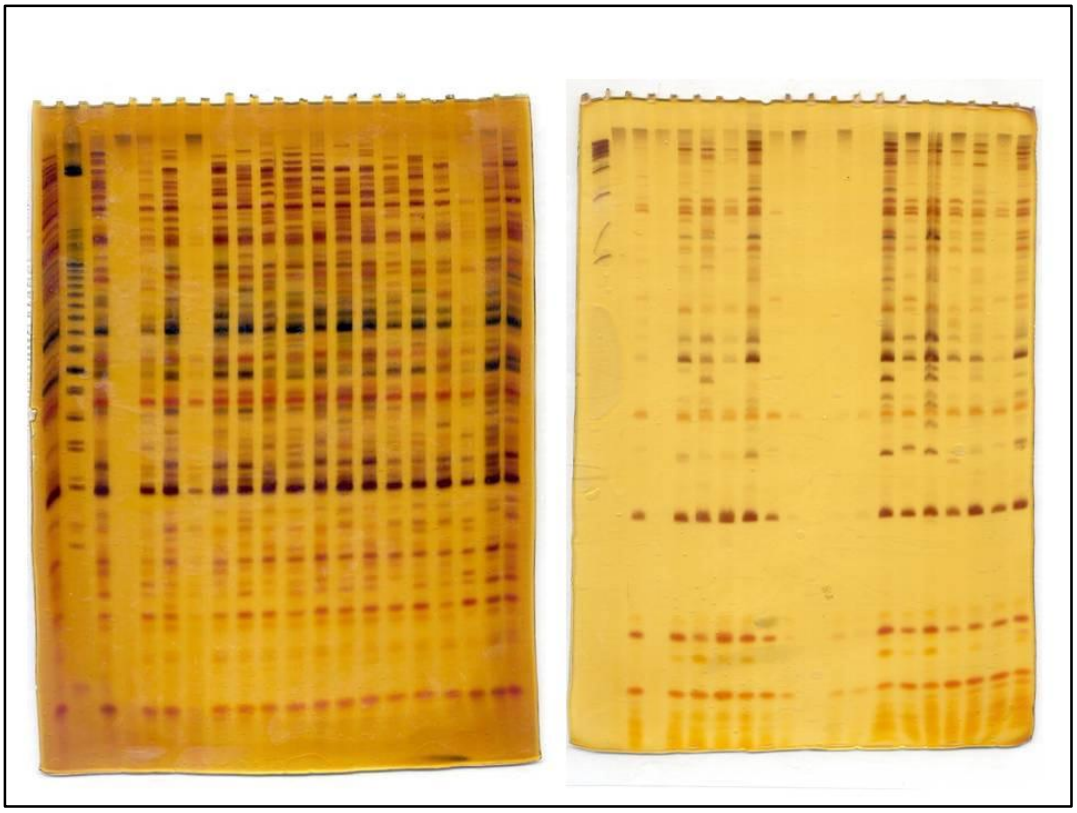

Figura 4. Patrón de amplificación en geles de poliacrilamida 6% para la combinación de iniciadores F1/B31 de ISTR de muestras de mamey colectadas en Comala, Colima (izquierda) y en Mérida, Yucatán (derecha).

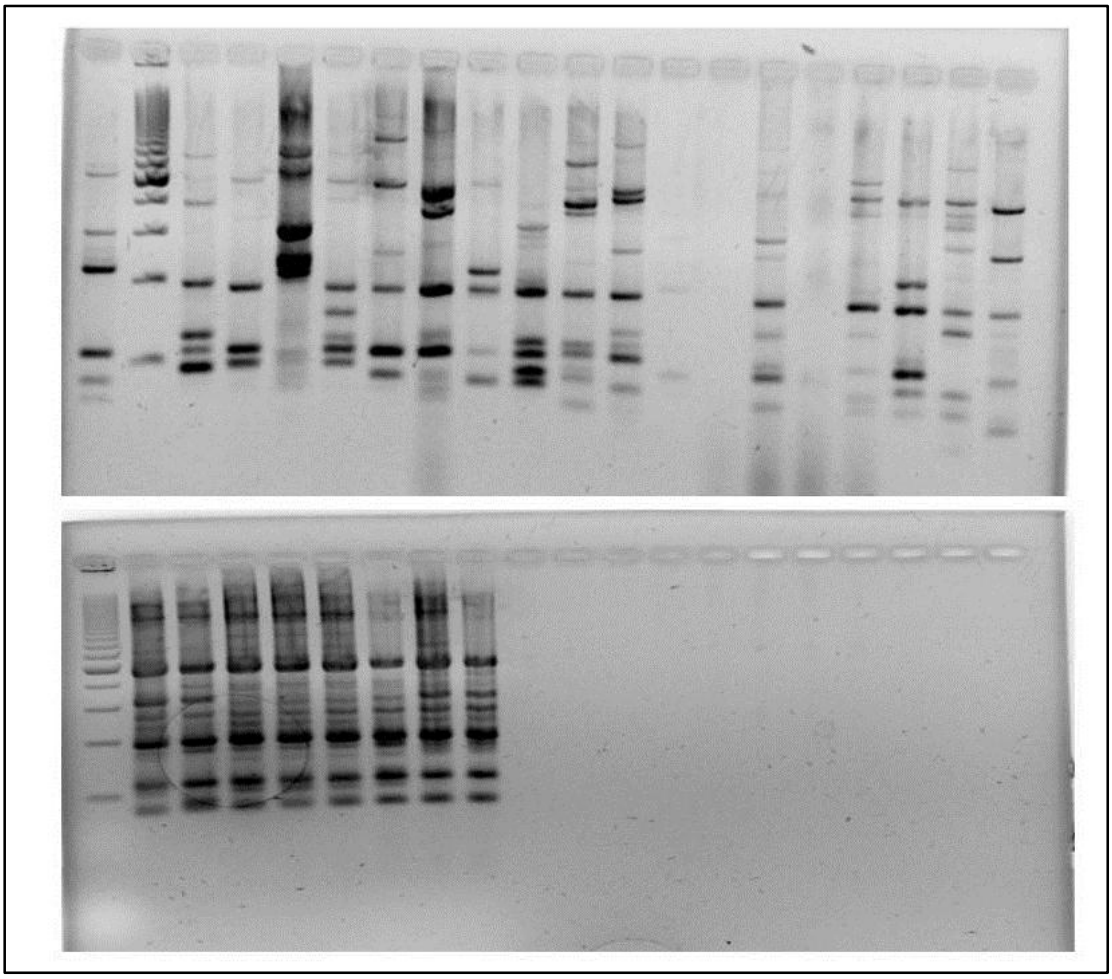

Figura 5. Patrón de amplificación en geles de agarosa de alta resolución 1.5% para el primer 899 de ISSR de las muestras de mamey colectadas en Comala, Colima (arriba) y Mérida, Yucatán (abajo).

Cuadro 3. Porcentaje de Polimorfismo detectado por cada combinación de iniciadores para ISTR y para cada iniciador de ISSR.

Oligonucleótidos	Bandas producidas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas
F1/B31	62	58	93.5
F91/B1	40	37	92.5
899	14	12	85.7
901	12	10	83.3
902	10	9	90
Total	138	126	91.3

5.1.2 Análisis de agrupamiento

El coeficiente de Jaccard mostró el valor máximo de similitud entre plantas colectadas en Yucatán con 0.94 y su valor mínimo con 0.33 entre individuos de la población de Colima.

El análisis de agrupamiento con el método UPGMA mostró la formación de cinco grupos en un punto de corte de 0.41. En estos grupos no se observó una separación clara entre plántulas y árboles adultos. Sin embargo, las ocho muestras provenientes de Yucatán formaron un grupo (grupo II) que se asoció al grupo principal de plantas de Colima (grupo I) con un nivel de 0.39 de de similitud. El resto de las plantas de Colima formaron tres grupos (grupos III, IV y V) que fluctuaron en nivel de similitud de 0.33 a 0.51 (Figura 6).

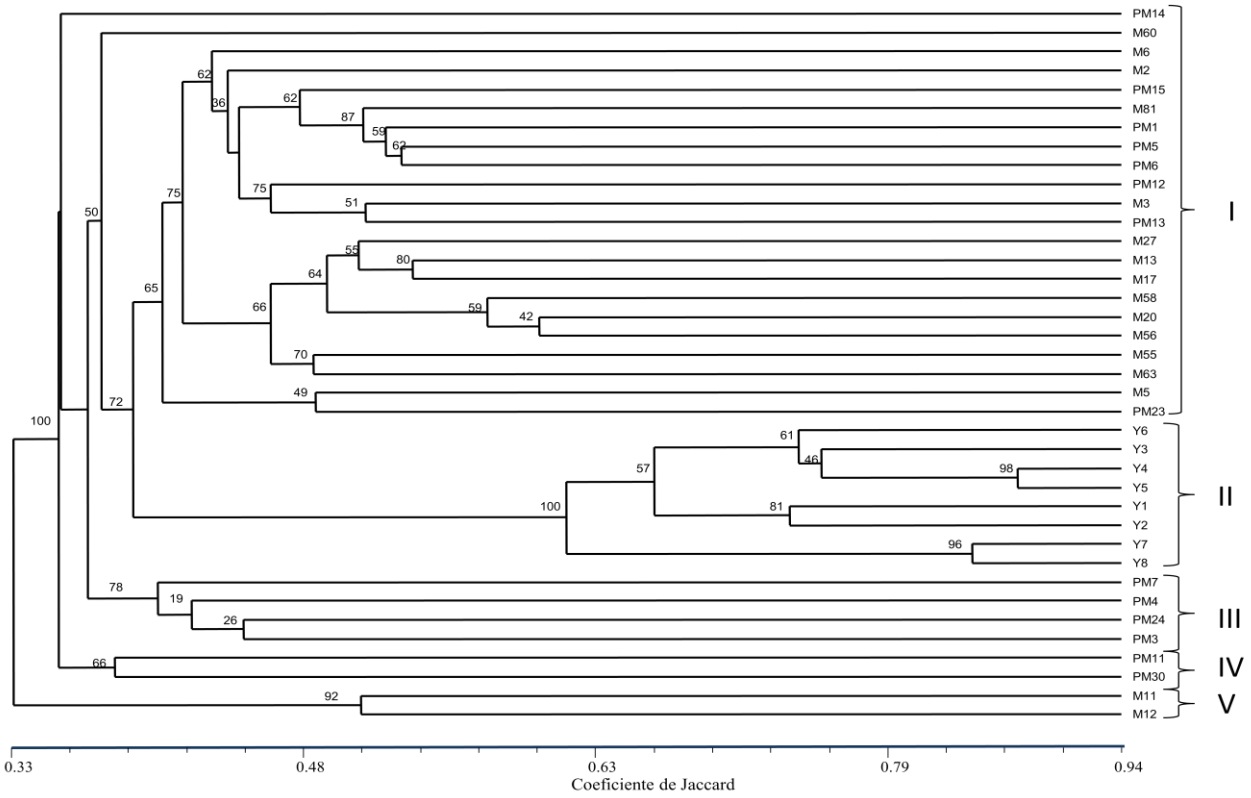

Figura 6. Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA para las muestras de mamey colectadas en los estados de Colima y Yucatán usando el coeficiente de similitud de Jaccard. Los valores de remuestreo aparecen indicados en la parte superior izquierda de cada ramificación. Se Indica con numeración romana los cinco grupos formados en el análisis de agrupamiento. En las muestras los prefijos P= plántula, PM= planta adulta y Y=muestra de Yucatán.

Los valores del análisis de remuestreo oscilaron entre 19% y 100%. La proporción de valores mayor a 60% fue de 74.2% y menor a 50% fue de 25.8%, por lo que se puede afirmar que el dendrograma obtenido es confiable. Se observó que los cinco grupos principales de plantas

presentan valores de remuestreo mayores al 60% por lo que representan grupos bien soportados. Los valores más bajos de remuestreo se encontraron en las ramas más externas del grupo tres, donde oscilaron entre 19% y 27%.

5.1.3 Estructura genética de la población

Los resultados de estructura genética indican que la formación óptima fue de 5 grupos (*K*= 5). Este número fue estimado con base en el valor más elevado de **Δ***K* (Cuadro 4 y Figura 7).

Cuadro 4. Valores de Δ*K* para determinar el número óptimo de grupos genéticos formados en el análisis de estructura genética. En negritas se muestra el valor que determinó el número óptimo de grupos formados.

K	Δ*K*
2	—
3	0.946200
4	2.409401
5	**5.786761**
6	—

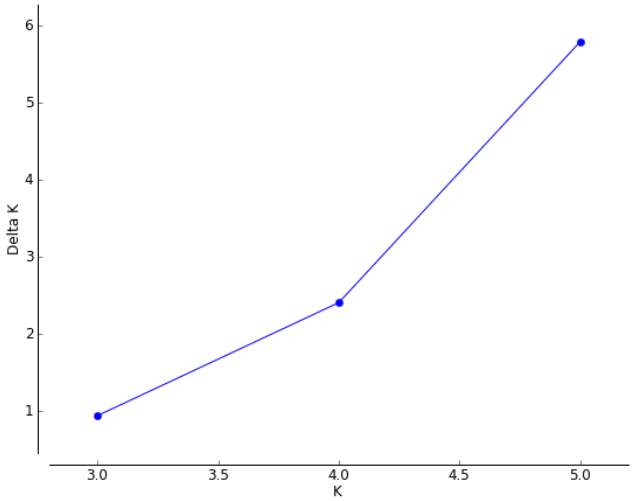

Figura 7. Grafico que muestra el número óptimo de grupos genéticos para las plantas de Colima (*K*=5) según el método de Evanno y cols (2005).

Con base en los valores probabilísticos del análisis de estructura genética, se construyó un gráfico para cada una de las simulaciones realizadas (*K*= 2 a *K*= 5) (figura 8).

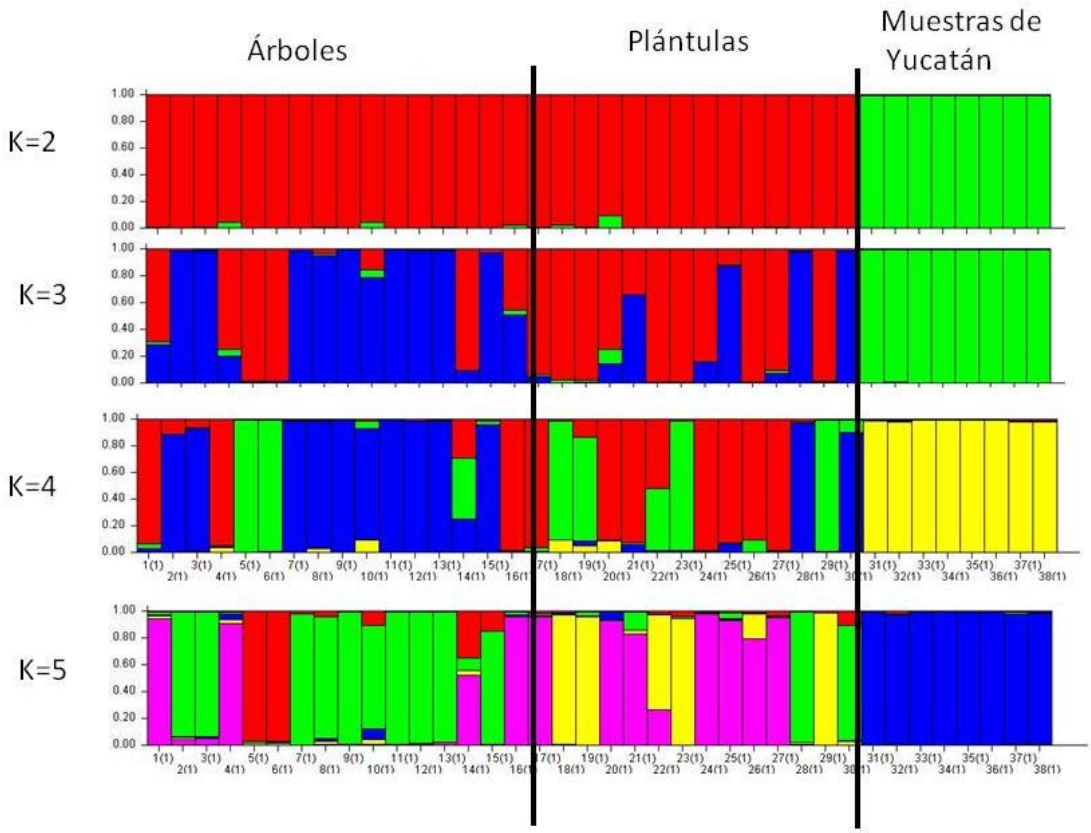

Figura 8. Representación gráfica de cada una de las simulaciones probabilísticas realizadas con el programa STRUCTURE. El número de grupos es equivalente al número de colores en cada gráfico. La probabilidad de pertenecer a cada grupo aparece indicada en el eje Y, las muestras en el eje X.

Los valores de diferenciación genética (Fst) fluctuaron entre 0.0857 (grupo 1) y 0.5609 (grupo 4), lo que sugiere una separación significativa entre grupos. Se observa también que cada uno de los grupos analizados (plántulas, árboles de Coloma y árboles de Yucatán) presenta componentes genéticos representativos. Para la población de Colima se puede apreciar que no existen componentes genéticos en común entre paltas adultas y plántulas. Los valores de Fst de cada grupo, el color que lo representa en el gráfico y heterocigosidad se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Valores de diferenciación genética (Fst) para cada uno de los grupos obtenidos usando el programa STRUCTURE.

Grupo (*K*)	Color	Diferenciación genética (Fst)	Hetrocigosidad (HE)
1	Rojo	0.0747	0.2291
2	Verde	0.5818	0.3671
3	Azul	0.1014	0.1921
4	Amarillo	0.0015	0.3361
5	Rosa	0.2277	0.3669

5.2 Variabilidad morfológica del fruto

5.2.1 Caracterización morfológica

De los siete caracteres evaluados, cinco fueron los que presentaron valores mayores en coeficiente de variación: número de semillas con 52.27%, forma del fruto con 41.40%, grosor longitudinal del mesocarpio con 38.96%, grosor lateral del mesocarpio con 30.6% y peso del fruto con 25.53%. Las medidas de estadística descriptiva se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de estadística descriptiva para cada una de las 7 variables de fruto consideradas para las 15 muestras de Colima. *S*= Desviación estándar, S^2= Varianza, Mín.= Valor mínimo, Máx.= Valor máximo y CV (%)= Porcentaje de coeficiente de variación.

Variable	Media	*S*	S^2	Min.	Máx.	CV (%)
Diámetro del fruto (cm)	11.71	1.80	3.24	9.3	16	15.38
Longitud del fruto (cm)	26.15	2.06	4.28	21	29	15.91
Número de semillas	1.37	0.71	0..51	1	3	52.27
Peso del fruto (g)	369.53	101.25	10252.39	235	705	25.53
Grosor lateral del mesocarpio (cm)	1.5	0.45	0.21	0.7	2.5	30.6
Grosor longitudinal del mesocarpio (cm)	1.50	0.58	0.34	0.7	2.7	38.96
Forma del fruto	2.06	0.85	0.74	1	3	41.40

5.2.2 Análisis de componentes principales

El ACP mostró que el porcentaje de la varianza explicada es de 76.20, la cual fue explicada en los primeros tres componentes, con un valor propio menor a 2.9 (Cuadro 7).

El componente principal 1 (CP1) explicó el 34.72% de la variabilidad total y estuvo determinado por las variables: longitud del fruto, peso del fruto y por grosor longitudinal del mesocarpio. El componente principal 2 (CP2) por su parte explicó el 22.88% de la variación total. Las variables más relevantes fueron: Diámetro del fruto, numero de semillas y forma del fruto. El componente principal 3 (CP3) por su parte explicó 18.59 % de la variabilidad total. La variable que formó el componente fue: grosor lateral del mesocarpio (Cuadro 8).

Cuadro 7. Valores propios, varianza absoluta y varianza acumulada obtenidos con base en la matriz de correlaciones de 7 variables cuantitativas de los 15 individuos seleccionados de la población de mamey del estado de Colima. En negritas el porcentaje de varianza explicada con los primeros tres componentes principales.

Componente Principal	Valor propio	Porcentaje de proporción de varianza explicada	
		Varianza absoluta	Varianza acumulada
1	5.5555	34.7222	34.7722
2	3.6619	22.8871	57.6092
3	2.9751	18.5948	**76.2040**
4	2.0407	12.7548	88.9588
5	1.5330	9.5816	98.5404
6	0.2335	1.4596	100.00

Cuadro 8. Vectores propios de siete variables para los tres primeros componentes principales en los 15 individuos estudiados de mamey provenientes del estado de Colima.

Variable	Componentes Principales (CP)		
	CP1	CP2	CP3
Longitud del fruto	6.9805	1.8270	6.7366
Diámetro del fruto	6.5084	-5.8570	-2.4666
Número de semillas	-5.0610	-7.3476	-3.0487
Peso del fruto	9.2288	-1.4539	1.9951
Grosor lateral del mesocarpio	4.5674	5.4265	-65571
Grosor longitudinal del mesocarpio	7.5235	2.2425	-2.2093
Forma del fruto	3.2944	-7.5507	-1.3222
Valor Propio	**5.5555**	**3.6619**	**2.9751**

Con base en los dos primeros componentes principales se construyó un gráfico de dispersión, en el que se distinguió la formación de cuatro grupos de plantas. El grupo 1 (G1) se conformó por las muestras: M2, M5, M16, M27, M56 y M60; el grupo 2 (G2) por las muestras: M3, M11, M20 y M81; el grupo 3 (G3) por las muestras: M63 y M55; y el grupo 4 (G4) por las muestras: M12, M13, M17, M55, M58 y M63 (Figura 9).

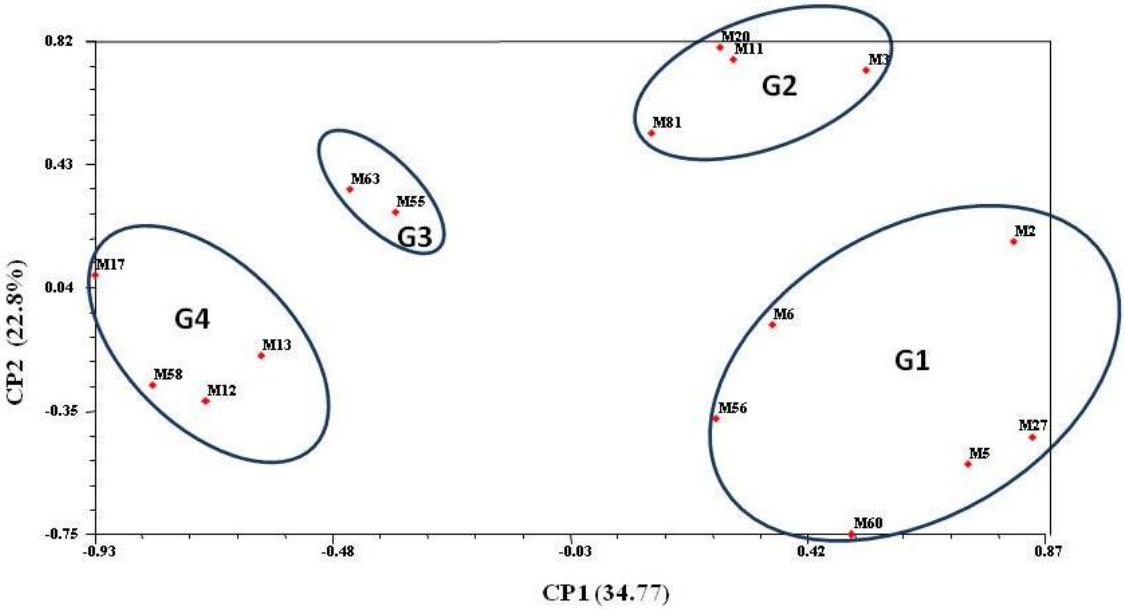

Figura 9. Gráfico de dispersión con base en los dos primeros componentes principales para las 15 muestras seleccionadas de la población de Colima. Entre paréntesis la cantidad en porcentaje de la variabilidad total explicada por cada uno de los componentes y abajo las variables que contribuyeron a la formación de cada componente.

5.3 Análisis de correlación de matrices

En la prueba de Mantel para la comparación de matrices para los 15 individuos evaluados con los dos marcadores moleculares y la morfología del fruto se encontraron bajos valores de significancia (<0.7) de coeficiente de correlación (r). En el cuadro 9 se observan los valores de coeficiente de correlación "r" para cada una de las matrices.

Cuadro 9. Valores de coeficiente de correlación "r" obtenidos por el programa NTSyS en la comparación de cada una de las matrices de datos moleculares y morfológicos. Las iniciales "DC" hacen referencia a la matriz de variables cuantitativas obtenidas a partir de los datos morfológicos.

Matriz	ISTR	ISSR	DC
ISTR	1		
ISSR	0.212	1	
DC	-0.053	-0.063	1

VI. DISCUSIÓN

6.1 Variabilidad genética

6.1.1 Nivel de Polimorfismo

Se encontró un nivel de polimorfismo en las bandas obtenidas por ambos marcadores, entre 85.7% y 91.3% para los marcadores ISSR y entre 92.5% y 93.5% para los marcadores ISTR. La elevada tasa de bandas polimórficas es indicativo de la alta variabilidad genética presente en la población de mamey de Colima debido probablemente a que la totalidad de los materiales analizados fueron propagados a partir de semilla. En el caso de las plántulas la alta variabilidad se debe a que no ha existido un programa de selección y manejo agronómico de la población analizada.

Los altos niveles de polimorfismo detectados con marcadores moleculares concuerdan con los encontrados por Ibarra-Estrada (2012), donde se observaron niveles de polimorfismo del 75% con marcadores RAPD y 92% con marcadores RAMP.

En el caso de los marcadores ISTR, el porcentaje de polimorfismo (90%), concuerda con el obtenido en otras especies cultivadas. Alonso y cols. (2008) detectaron un 84% de bandas polimórficas con base en amplificaciones de 5 pares de iniciadores en la caracterización de ecotipos de palma cocotera. Torres-Morán (2009) mediante el uso de tres combinaciones de iniciadores ISTR detectó un nivel del polimorfismo del 88% en el complejo *Agave durangensis*. Castellanos-Enríquez (2011) por su parte usó dos combinaciones de iniciadores y observó 87.9% de polimorfismo entre poblaciones de frijol común.

El nivel de bandas polimórficas detectado por los marcadores ISSR, concuerda parcialmente con los resultados reportados en la literatura. Por un lado los niveles de polimorfismo detectados en este trabajo se asemejan a los reportados por Hamza y cols. (2013), donde al hacer uso de siete iniciadores se encontraron que el nivel de polimorfismo oscila entre el 60 y 100%. Por otro lado se observan bajas tasas de polimorfismo en los estudios llevados a cabo en *Cymbopogon*

winterianus, donde el porcentaje de bandas polimórficas va de 33.3% a 57.1% (Bhattacharya y cols. 2010).

6.1.2 Análisis de agrupamiento y estructura genética de la población

En las 38 muestras se observan valores de similitud entre (0.33 a 0.94). Estos resultados, sugieren que existe una variabilidad genética considerable entre las muestras analizadas. Los altos valores de variabilidad genética en mamey han sido encontrados también por Rodríguez-Rojas y cols. (2012) con marcadores amplificados al azar (RAPD), así como por Arellano-Durán (2012) mediante el uso marcadores AFLP y por Ibarra-Estrada (2012) con RAMP y RAPD. Los altos niveles de variabilidad encontrados en este y otros trabajos para poblaciones cultivadas fuera y dentro de la zona de origen sugieren que es necesario llevar a cabo estudios sistemáticos que incluyan un mayor número de marcadores moleculares así como una mejor representación de las poblaciones cultivadas con la finalidad de tener un panorama más claro de la diversidad genética de esta especie.

Los agrupamientos obtenidos con base en el coeficiente de similitud y por la representación gráfica del análisis de estructura genética de la población concuerdan en la separación de las muestras según su origen de colecta. La capacidad de diferenciación de las muestras obtenida con el uso de los marcadores moleculares ISTR e ISSR difiere con los resultados encontrados por Carrara y cols. (2004), Arellano-Durán (2012) mediante el uso de marcadores AFLP e Ibarra-Estrada (2012) con RAMP y RAPD.

El análisis llevado a cabo con el programa STRUCTURE muestra además que existe un alto grado de diferenciación entre las muestras colectadas en cada una de las dos localidades en función de sus frecuencias genotípicas, por lo que se descarta que exista una relación de procedencia de las muestras de Colima con respecto a las de Yucatán. El análisis de estructura genética de la población mostró además que no hay un componente genético común que sea claramente visible para las muestras de Colima, sin embargo existen componentes genéticos característicos si las muestras son separadas entre árboles adultos y plántulas, lo que sugiere que existe un grado considerable de autopolinización entre los individuos que componen la población.

Fst es una medida relacionada directamente con la varianza en la frecuencia alélica entre las poblaciones e inversamente relacionada al grado de similitud entre individuos dentro de la población, si su valor es pequeño significa que la frecuencia alélica dentro de la población es muy similar.

6.2 Variabilidad morfológica del fruto

6.2.1 Caracterización morfológica

Al igual que lo encontrado por Bayuelo-Jiménez (2006), Gaona-García (2008), Arellano-Durán (2012) e Ibarra-Estrada (2012) la variabilidad encontrada en las características del fruto fue significativa, entre las variables que destacaron por sus altos niveles de variación fueron: número de semillas, grosor longitudinal del mesocarpio, grosor lateral del mesocarpio y peso del fruto. Lo anterior sugiere que existe una amplia tasa de variación en las medidas que dimensionan la masa aprovechable del fruto, que según Arellano-Durán (2012), poseen de importancia agronómica y son fundamentales para llevar a cabo la selección de materiales atractivos para propagación vegetativa.

6.2.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Las características que contribuyeron en mayor medida a explicar la variabilidad total en el ACP fueron: longitud del fruto, peso del fruto, grosor longitudinal del mesocarpio, diámetro del fruto, numero de semillas y forma del fruto. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Bayuelo-Jiménez (2007), Gaona-García (2008), Ibarra-Estrada (2012) y Arellano-Durán (2012), donde se mencionan que el análisis de las características que afectan las dimensiones del mesocarpio y la semilla, son de utilidad en la formación de grupos en el ACP.

Se observó además que las características que en mayor medida contribuyeron a la formación de componentes principales presentan también altas tasas de variación en el análisis de estadística descriptiva. La concordancia entre los altos niveles variabilidad y la significancia en la formación de CP de las variables analizadas se observó solo de manera parcial por Arellano-Durán (2012).

6.3 Análisis de correlación de matrices

La prueba de Mantel realizada para comparar las tres matrices de datos obtenidas en este trabajo mostró que existe poca correlación entre la variabilidad detectada por un lado entre los dos marcadores moleculares y la morfología del fruto; y por otro, entre la detectada entre los dos marcadores moleculares.

La baja correlación observada entre marcadores morfológicos y moleculares se puede explicar porque las secuencias amplificadas de ISTR (basadas en retrotransposones) e ISSR (secuencias entre microsatélites) no corresponden a fragmentos que codifiquen para alguna proteína que influya en las características fenotípicas.

Los resultados encontrados en este trabajo en cuanto a bajos niveles de coeficiente de correlación a nivel genético-fenotípico (-0.053 / -0.063 entre ISTR e ISSR respectivamente) concuerdan con los encontrados por Arellano-Durán (2012). En dicho trabajo se obtuvo un valor r= -0.49 en la comparación genética mediante AFLP y fenotípica, a nivel morfológico y bioquímico. Dicho valor indica un bajo nivel de correlación entre la variación encontrada a nivel genético y a nivel fenotípico.

La baja correlación existente entre marcadores morfológicos y moleculares ha sido observada en otros cultivares como: yuca (Damey y cols. 2003), *Lolium perenne* (Roldán-Ruíz y cols. 2001) y *Citrus* spp. (Tapia-Campos y cols, 2005).

Además de la poca relación existente entre la matriz obtenida con base en los datos moleculares y la obtenida con morfología de fruto, se observó también una baja correlación en la comparación de las matrices de los dos marcadores utilizadas en este trabajo. Estos niveles de correlación se explican por el tipo de secuencias amplificadas para cada uno de los marcadores. Lo que sugiere que cada tipo de marcador está sometido a diferentes presiones de selección.

VII. CONCLUSIONES

El alto número de bandas polimórficas detectadas por los marcadores ISTR e ISSR indica que estos marcadores moleculares son apropiados para abordar el estudio de la variabilidad genética del mamey.

El bajo nivel de similitud encontrado por el coeficiente de Jaccard entre las muestras analizadas de mamey es indicativo de la existencia de altas tasas de variabilidad genética intrapoblacional.

Los análisis de agrupamiento UPGMA y de estructura genética de la población, realizados con base en los datos moleculares, muestran que los marcadores ISTR e ISSR son capaces de separar las muestras por su procedencia.

Con base en el alto nivel de polimorfismo y la baja similitud encontrada entre las muestras se infiere que es necesario analizar un mayor número de individuos para obtener un panorama más claro de la variabilidad a nivel interpoblacional.

Las variables morfológicas en las que se basó la formación de grupos en los individuos analizados de mamey fueron: longitud del fruto, peso del fruto, grosor longitudinal del mesocarpio, diámetro del fruto, numero de semillas y forma del fruto.

La prueba de Mantel para la comparación de matrices mostró una baja correlación entre los datos morfológicos y moleculares así como entre los dos marcadores moleculares utilizados.

VIII. LITERATURA CITADA

Almaraz-Abarca, N. 2011. *Agave durangensis*. Instituto Politécnico Nacional. México, DF

Alonso-Esquivel, M., J.R. Cueto-Rodríguez, Y. Santos-Rodríguez, R. Llauguer-Riverón, M. Rodríguez y W. Rhode. 2008. Estimación de la variabilidad genética entre ecotipos de cocoteros presentes en Cuba por ISTR. Revista Colombiana de Biotecnología. 10 (2): 6-13

Arcos-López, E. 2011. Caracterización del Sistema de Producción de Mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) del municipio Huamuxtitlán, Gro. Tesis para obtener el grado de: Maestro Tecnólogo. Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo

Arellano-Durán, N. 2012. Caracterización morfológica, estudio molecular y determinación de azúcares en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). Tesis para obtener el grado de: Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo

Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: Aplicaciones a frutales del trópico. Agronomía mesoamericana. 17(2): 221-242

Azurdia, C., L. Mejía y B. Nufio. 1997. Variabilidad en frutales tropicales nativos de *Pouteria*, Sapotaceae, utilizando marcadores isoenzimáticos. Ciencia y Tecnología. 2 (1): 105-114

Azurdia, C., H. Ayala, L. Mejía, M. Grum, E. Figueroa, N. Colindres y S. Ayala.1999. Tasa de cruzamiento y estructura genética de una población de zapote (*Pouteria sapota*). Tikalia. 17 (1): 59-80

Azurdia, C. y A. Ortiz. 2003. Sapotáceas de Guatemala: Diversidad Genética, Conservación y Utilización. Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Guatemala

Azurdia, C. 2006. Tres especies de zapote en América Tropical. Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton. Southampton

Bayuelo-Jiménez, J.S. y I. Ochoa. 2006. Caracterización morfológica del zapote mamey [*Poueria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn] en el centro occidente de Michoacán, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 29 (1): 9-17

Bayuelo-Jiménez, J.S., N. Rivera-Alcantar, y I. Ochoa. Sapote Mamey. 2007. [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn]: A potential crop for subtropical regions of Michoacan, Mexico. Canadian Journal of Plant Science. 87: 537- 544

Bhattacharya, S., T.K. Bandopadhyay y P.D. Ghosh. 2010. Efficiency of RAPD e ISSR markers in assessment of molecular diversity in elite germoplasms of *Cymbopogon winterianus* across west Bengal, India. Emirates Journal of Food and Agriculture. 22 (1): 13-24

Borys W.M. y H. Leszczyñska. 2001. El Potencial genético frutícola de la República Mexicana. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C.-CONACYT. México, DF

Carrara, S., R. Campbell y R. Schnell, 2004. Genetic Variation among cultivated selections of mamey sapote (*Pouteria* spp. [Sapotaceae]). Proceedings of the Florida State Horticulture Society. 117: 195-200

Castellanos-Enríquez, G. 2011. Relaciones genéticas entre formas silvestres, cultivadas e intermedias de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) del occidente de México basadas en ISTRs. Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Biología. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

CFF (Crops for the Future). 2004. Pouteria: Fruits for the future. http://www.cropsforthefuture.org/publication/Factsheets/Factsheet-pouteria.pdf. Consultado en noviembre de 2013.

CFF (Crops for the Future). 2013. What are “Neglected and Underutilised species”. http://www.cropsforthefuture.org/about-us/what-are-neglected-and-underutilised-species/. Consultado en noviembre de 2013

Díaz-Pérez, J.C., S. Bautista, y R. Villanueva. 2000. Quality changes in mamey sapote fruit during ripening and storage. Postharvest Biology and Technology. 18: 67-73

Díaz-Pérez, J.C., A. Mejía, S. Bautista, R. Zavaleta, R. Villanueva y R. López-Gómez. 2001. Response of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn] fruit to hot water treatments. Postharvest Biology and Biotechnology. 22: 159-167

Earl, D. y B. M. van Holdt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation genetic resources. 4:359- 361

Earl, D. 2013. STRUCTURE HARVESTER. http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/. Consultado en Junio de 2014.

Elias-Nascimiento, V., A.B. Geraldo-Martins y Hassayuki Hojo. 2008. Caracterização física e química de frutos de mamey. Revista Brasileira de Fruticultura. 30(4): 953-957

Espinoza, Z., C. Saucedo, A. Villegas y M. Ibarra. 2005. Caracterización de frutos de zapote mamey (*Pouteria* sapota (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) en Guerrero, México. Proceedings of the Interamerican Society of Tropical Horticulture

Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology. 10: 1743-1750

Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance Inferred for metric distances from DNA Haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131: 479-491

Fang, D.Q. M.L. Roose, R.R. Krueger y C.T. Federici. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germoplasm accessions with isozymes, RFLPs and Inter Simple Sequence Repeat markers. Theorical and Applied Genetics. 95: 211-219

FAO (Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y Agricultura). 2013. Comisión de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. http://www.fao.org/docrep/012/al384s/al384s00.pdf. Consultado en noviembre de 2013

Fraleigh, B. 2006. Global overview of crop genetic resources. En: Ruane, J. y A. Sonnino, Eds. 2006. The Role of Biotechnology in exploring and protecting agricultural Genetic Resources. FAO. Roma

Galván, B. y R. Núñez. 1994. Parámetros de identificación y selección de materiales sobresalientes de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) en la Sierra Nor-oriental del estado de Puebla. Interamerican Society for Tropical Horticulture. 38: 150-151

Gaona-García, A., I. Alia-Tejacal, V. López-Martínez, M. Andrade Rodríguez, M.T. Colinas-León y O. Villegas-Torres. 2008. Caracterización de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) En el sureste del Estado de Morelos. Revista Chapingo Serie Horticultura. 14 (1): 41-47

Gazel-Filho. A.B., J. Morera, P. Ferreira, J. León y J. Pérez. 1999. Diversidad Genética de la Colección de zapote [*Pouteria sapota* (Jacquin) H.E. Moore & Stearn] del CATIE. Plant Genetic Resources Newlestter. 117: 37-42

Gómez-Jaimes, R., D. Nieto-Aguilar, D. Téliz-Ortiz, J.A. Mora-Aguilera, C. Nava Díaz, M.T. Martínez-Damián y M. Vargas-Hernández. 2012. Manejo postcosecha del zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) y su impacto en la calidad de la fruta. Revista Chapingo, Serie Horticultura. 28 (2): 253-262

González, A. y X. Aguirre. 2007. Inter Simple Sequence Repeat (ISSRs). En: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre. 2007. Ecología Molecular. INECOL-CONABIO. México, DF

Gazel, A., J. Morera, P. Ferreira, J. León y J. Pérez. 1999. Diversidad Genética de la colección de zapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) del CITAE. Plant Genetic Resources Newsletter. 117: 37-42

Hamza, H., M.A. Ben Abedarrahim, M. Elbekkay y A. Ferchichi. 2013. Comparison of the effectiveness of ISSR and SSR markers in determination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) agronomic traits. Australian Journal of Crop Science. 7 (6): 763-769

Havecker, E.R., X. Gao y D.F. Voytas. 2004. The diversity of LTR Retrotransposons. Genome Biology. 5 (6): 1-6

Hillis, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches in systematics. Annual Review of Ecology and Systematics. 18: 23-42

Ibarra-Estrada, M.E. 2012. Morfología de frutos, perfil de ácidos grasos en semilla y diversidad genética molecular en selecciones de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Morre & Stearn). Tesis para obtener el grado de: Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo

Kalendar, R., A.J. Favell, T.H. Ellis, T. Sjakste, C. Mois y A.H. Schulman. 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity. 106: 520-530

Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero y D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. Plant Molecular Biology Reporter. 20: 299

Lamb, R.C. 1974. Future germoplasm reserves of pome fruits. Fruits Variety Journal. 28 (4): 75-79

Lightbourn, G.J., J.G. Jelesko y R.E. Veilleux. 2007. Retrotransposon-based from potato monoploids used in somatic hybridization. 2007. Genome. 50 (5): 492-501

Lowe, A., S. Harris y P. Ashton. 2004. Ecological genetics, design, analysis and application. Blackwell. UK

Martín-Martínez, I. 2005. Conservación de Recursos Fitogenéticos. Centro de Recursos Fitogenéticos Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. http://www.llavorsdaci.org/assets/documents/Recursosfito.pdf

Manifiesto, M.M., A.R. Schaltter, H.E. Hopp, E.Y. Suárez y J. Dubkovsky. 2001. Quantitative Evaluation of the Genetic Diversity in Wheat Germoplasm Using Molecular Markers. Crop Science 41: 682-690

Mantel, N. 1967. The Detection of Disease Clustering and Generalized Regression Approach. Cancer Research. 27 (2): 209-220

Mondini, L., A. Noorani y M.A Pagnotta. 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. Diversity. 1:19-35

Morrone, J.J. 2013. Sistemática: Fundamentos, métodos y aplicaciones. UNAM. México, DF

Nava-Cruz, Y. y Ricker, M. 2004. El Zapote Mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn] un fruto de la selva mexicana con alto valor comercial. En: Alexiades, M.N. y P. Shanley, Eds. 2004. Productos Forestales, medios de subsistencia y conservación: Estudios de Caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Vol. 3. Centro para la Investigación Forestal Internacional. Indonesia

Osorio, Z., D. Infante y S. Molina. 2006. Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de marcadores moleculares. Boletín de la Sociedad Jalisciense de Cactología, Nakari. 17 (1): 1-7

Pavlicek, A., S. Hdrá y J. Flegr. 1999. Free-Tree: Freeware program for construction of Phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia.* Folia Biologica. 45 (3): 7-9

Pearce, S.R., D. Harrison, D. Li, J.S. Heslop-Harrison, A. Kumar y A.J. Flavell. 1996. The Ty1-copia group retrotransposons in *Vica* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. Molecular Genetics and Genomics. 250: 305-315

Pohelman, J.M. y Allen Seleper, D. 2005. Mejoramiento genético de las cosechas. Limusa. México DF

Pohlan, J., J. Borgman y M.R.V. Gehrke. 2000. Perspective of Sapotaceae species for fruit production in the Soconusco Region, Chiapas, Mexico. Acta Horticulturae. 531: 42-52

Rentería-Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre. 2007. Ecología Molecular. INECOL-CONABIO. México, DF

Rodríguez-Medina, N.N. J.L. Fuentes-Lorenzo, O. Coto-Arbelo, V.R. Fuentes-Fiallo, I.M. Ramírez-Pérez, D. Becker, I. Rodríguez-García, C. González-Arencibia, X. Xiqués-Martín, M.I. Román Gutiérrez, B. Velázquez-Palenzuela y W. Rhode. 2009. Agro-morphological traits, isoenzyme and DNA markers for estimating the polymorphism levels, discriminating capacity and informativeness in avocado. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 40 (1): 63-74

Rodríguez-Rojas, T.J., M. Andrade.-Rodríguez, I. Alia-Tejacal, V. López-Martínez, S. Espinoza-Zaragoza, H. Esquinca-Avilés. 2012. Revista de la Facultad de Agronomía. 29:339-354

Roldán-Ruiz, I., F.A. van Euwijk, T.J. Gilliland, P. Drobeuil, C. Dillman, J. Lallemand, M. de Loose y C.P. Baril. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theorical and applied genetics. 103 (8): 1138-1150.

Rohlf, J.2002. Introduction to the exploration of multivariate biological data. Quarterly Review of Biology. 77: 50-51

Rubenstein, K.D., P. Heisey, R. Shoemaker, J. Sullivan y G. Frisvold. 2005. Crop Genetic Resources: An Economical Appraisal. United States Department of Agriculture.http://ers.usda.gov/publications/eib-economic-information-bulletin/eib2.aspx#.UoBQ_nAyIfg. Consultado en noviembre de 2013

Sanguinetti, C.J., E. Dias Neto y A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques. 17: 915-919

Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

Saxena, S., R. Chandra, A.P. Srivastava, M. Mishra, R.K. Pathak y S.A. Ranada. 2005. Analysis of the genetic diversity among papaya cultivar using Single Primer Amplification Reaction (SPAR) methods. The Journal of Horticulture Science and Biotechnology. 80 (32): 291-296

Segura-Ledesma, S., D. Zavala-Robles, C. Equihua-Cervantes, J. Andrés-Agustín, y E. Yepez-Torres. 2009. Los Recursos Genéticos de frutales en Michoacán. Revista Chapingo, Serie Horticultura. 15 (3): 297-305

Sensi, E., R. Vignani, W. Rhode y S. Biricolti. 1996. Characterization of biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovense and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. Vitis. 35 (4): 183-188

SINAREFI (Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura). 2013. http://snics.mx/sinarefi/index.html. Consultado en noviembre de 2013

SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013 a. Cierre de la producción anual por cultivo. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. Consultado en noviembre de 2013

SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013 b. Cierre de la producción anual por estado. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Consultado en noviembre de 2013

Pradeep-Redy, M., N. Sarla y E.A. Saddiq. 2002. Inter Sample Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in the plant breeding. Euphytica. 128: 9-17

Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure usin multilocus genotype data. Genetics. 155: 945-959

Rhode, W. 1996. Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. Journal of Genetics and breeding. 50: 249-261

Sanguinett, C.J., E. Díaz-Neto y A.J. Simpson. 1994. Rapid silver staning and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. Biotechniques. 17: 14-21

Segman, K. Å. Bjørnstand y M.N. Ndjiondjop. 2006. An Overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 5 (25): 2540-2568

Shi, Y.Z., T. Yamamoto y T. Hayashi. 2002. The Japanese pear genome program III. *Copia-like* retrotransposones in pear. Acta Horticulturae. 587: 247-252

Sica, M., G. Gamba, S. Stefania, L. Gaudio y S. Aceto. 2005. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius*. BMC Genetics. 6: 17

Tapia-Campos, E., M.A. Gutiérrez-Espinoza, M.L. Warburton, A. Santacruz.Varela y A. Villegas-Monter. 2005. Caracterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia. 30 (11): 687-693

Tignon, M., B. Watillon y R. Kettmann.2001. Identification of *copia like* retrotransposable element by apple. Acta Horticulturae. 546: 515-520

Torres-Morán, M.I. 2009. Caracterización molecular del complejo *Agave durangensis* por medio de marcadores ISTR. Tesis para obtener el grado en Doctor en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

Torres-Morán, M.I. 2011. Variabilidad Genética. En: Almaraz-Abarca, N. 2011. *Agave duranguensis*. Instituto Politécnico Nacional. México, DF

Valdez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas: Teoría y protocolos de laboratorio. Mundiprensa. México, DF

Weising, K., H. Nybom, K. Wolf y G. Kahal. 2005. DNA Fingerprint in plants: Principles, Methods and Applications. Taylor & Francis Press. Florida

Wessler, S.R. 2006 Eukaryotic Transposable Elements: Teaching old genomes new tricks. In: Caporale, L.H. 2006. The Implicit Genome. Oxford University Press. New York

Wolfe, A. 2000. ISSR resource website. http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html. Consultado en noviembre de 2013

Zagaja, S.W. 1988. Explotación de los recursos fitogenéticos. En: Moore, J.N. y J. Janick. 1988. Métodos Genotécnicos en Frutales. AGT. México, DF

Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20:176-183