



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

DG Dirección General
de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Informe final de Proyecto de Investigación

DIGI-PUI-004

Informe final de proyecto de investigación

Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición

Certificación genética del aguacate Hass en Guatemala: Desarrollo de un sistema basado en marcadores moleculares para producción sostenible.

Unidad avaladora: Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales -IIA-
4.8.63.0.98

Nombre del coordinador: Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
Guatemala, 27 de noviembre de 2025



Informe final de Proyecto de Investigación

Contraportada

Autoridades de la Dirección General de Investigación

Dra. Alice Patricia Burgos Paniagua
Directora General de Investigación

Liuba María Cabrera Ovalle

Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición

Autores

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez, No. Registro de Personal 960073

José Alejandro Ruíz Chután, No. Registro de Personal 20101034

Julio Ernesto Berdúo Sandoval, No. Registro de Personal 20101438

Dayeni Victoria Nájera Argueta, No. Registro de Personal 20251381

El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la DIGI de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria número: 4.8.63.0.98 en el Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

Este informe está licenciado bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial-Compartir Igual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0).

Puede copiarse, distribuirse y adaptarse con la condición de dar crédito a los autores, no usarlo con fines comerciales y compartir cualquier obra derivada bajo la misma licencia.

Para más información, visite: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>.



Informe final de Proyecto de Investigación

Indice

1	Introducción.....	1
2	Contexto de la investigación	1
3	Revisión de la literatura.....	3
3.1	Antecedentes.....	3
3.2	Estado del arte	4
4	Planteamiento del problema	7
5	Objetivos.....	8
6	Hipótesis	8
7	Método.....	9
7.1	Tipo de investigación	9
7.2	Enfoque y alcance de la investigación.....	9
7.3	Diseño de la investigación.....	9
7.4	Población, muestra y muestreo	10
7.5	Técnicas	10
7.5.1	Extracción de ADN genómico.....	10
7.5.2	Análisis de huella y estabilidad genética por medio del marcador molecular SSR	11
7.6	Resumen de las variables o unidades de análisis.....	12
7.7	Procesamiento y análisis de la información	12
8	Aspectos éticos y legales	14
9	Resultados.....	14
9.1	Objetivo 1: Evaluar la variabilidad genética presente en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares.....	14
9.1.1	Caracterización del material vegetal analizado	14
9.1.2	Diversidad alélica y poder informativo de los marcadores	14
9.1.3	Contenido de información polimórfica (PIC).....	15
9.1.4	Frecuencias alélicas y distribución de alelos.....	16
9.1.5	Estructura genética y relaciones entre individuos	17
9.1.6	Patrones de genotipos y variabilidad intravarietal.....	18
9.1.7	Suficiencia del muestreo y curva de acumulación de alelos	19
9.2	Objetivo 2: Identificar un conjunto óptimo de marcadores moleculares para la certificación genética del aguacate Hass en el contexto guatemalteco	21

Informe final de Proyecto de Investigación

9.2.1	Ranking de marcadores por poder informativo	21
9.2.2	Poder discriminatorio acumulado	22
9.2.3	Capacidad discriminatoria mediante análisis de similitud	23
9.2.4	Selección y características del panel óptimo	25
9.2.5	Validación estadística mediante análisis bootstrap	25
9.2.6	Estructura genética y partición de la varianza	26
9.3	Objetivo 3: Diseñar un protocolo estandarizado para la certificación genética de plantas de aguacate Hass en viveros y plantaciones comerciales.....	27
9.3.1	Marco conceptual del sistema de certificación.....	27
9.3.2	Procedimiento de muestreo de tejido vegetal.....	28
9.3.3	Base de datos de referencia e interpretación de datos	30
9.3.4	Categorías	30
9.3.5	Árbol de decisión para certificación.....	31
9.3.6	Formatos y documentación del sistema.....	31
9.3.7	Certificado de identidad genética	32
9.3.8	Protocolo de uso recomendado.....	32
10	Discusión	33
10.1	Diversidad genética	33
10.2	Implicaciones de la alta variabilidad en material comercializado como ‘Hass’ 35	
10.2.1	Estructura poblacional y partición de la varianza genética	36
10.3	Panel óptimo de marcadores y eficiencia en la certificación molecular.....	38
10.4	Comparación con estudios internacionales de diversidad genética de aguacate 40	
10.5	Implicaciones para la certificación varietal y controles de calidad de viveros	43
10.6	Limitaciones del estudio y perspectivas futuras	45
11	Propiedad intelectual	47
12	Beneficiarios directos e indirectos.....	48
13	Estrategia de divulgación y difusión de los resultados.....	49
14	Contribución a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND).....	49
14.1	Meta Estratégica 1: Disponibilidad y Acceso a Alimentos	49
14.2	Meta Estratégica 2: Empleo e Inversión.....	50
14.3	Meta Estratégica 5: Valor Económico de los Recursos Naturales	50
14.4	Meta Estratégica 9: Fortalecimiento Institucional, Seguridad y Justicia.....	50
15	Otras contribuciones del proyecto al desarrollo	51
15.1	Fortalecimiento de capacidades científicas y tecnológicas nacionales	51
15.2	Generación de conocimiento científico original.....	51
15.3	Apoyo a la competitividad y acceso a mercados internacionales.....	52



Informe final de Proyecto de Investigación

15.4	Contribución a la seguridad alimentaria y nutricional.....	52
15.5	Protección de los recursos genéticos y biodiversidad	52
15.6	Desarrollo de Alianzas Interinstitucionales.....	52
15.7	Los resultados del proyecto contribuyen directamente a varios Objetivos de Desarrollo Sostenible de Naciones Unidas:.....	53
15.8	Evidencia para políticas públicas.	53
15.9	Modelo replicable en otros cultivos	53
16	Vinculación.....	54
17	Conclusiones.....	55
18	Recomendaciones	56
19	Referencias	58
20	Declaración del coordinador (a) del proyecto de investigación	64
21	Aval del director del instituto, centro, unidad o departamento de investigación o coordinador de investigación del centro regional universitario.....	64
22	Recepción de la Dirección General de Investigación.....	64

Índice de figuras

Figura 1. Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) para cada marcador microsatélite. Las barras verdes representan la heterocigosidad observada y las barras azules la heterocigosidad esperada.	15
Figura 2. Contenido de información polimórfica (PIC) por marcador microsatélite. Las barras verdes indican marcadores altamente informativos ($PIC > 0.5$), naranjas moderadamente informativos ($0.25 < PIC < 0.5$), y rojas poco informativos ($PIC < 0.25$).	16
Figura 3. Frecuencias alélicas para cada uno de los 12 marcadores microsatélites. Los valores en el eje X representan el tamaño del alelo en pares de bases (pb).	17
Figura 4. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en distancias genéticas. Los puntos verdes representan las muestras guatemaltecas y la estrella roja indica la muestra de referencia Hass. Los porcentajes indican la varianza explicada por cada componente principal.	18
Figura 5. Matriz de genotipos para una muestra de 50 individuos representativos. Cada fila representa un individuo y cada columna un marcador SSR. El código de colores indica: blanco = datos faltantes, naranja = homocigotos, verde = heterocigotos.....	19
Figura 6. Curva de acumulación de alelos en función del tamaño de muestra. La línea verde representa el promedio de 50 permutaciones aleatorias, el área sombreada indica ± 1 desviación estándar, y la línea roja punteada muestra el total de alelos detectados con el muestreo completo.....	20
Figura 7. Ranking de marcadores SSR según su contenido de información polimórfica (PIC). Las barras verdes indican los 9 marcadores seleccionados para el panel óptimo (99%	

Informe final de Proyecto de Investigación

de poder discriminatorio), las barras grises representan los marcadores excluidos. La línea roja punteada marca el umbral de alta informatividad ($PIC > 0.5$). 21

Figura 8. Número de genotipos multilocus únicos identificados en función del número de marcadores SSR utilizados. La curva muestra un incremento desde 68 genotipos con un solo marcador hasta 290 genotipos únicos con el panel completo de 12 marcadores. Se observa un fuerte incremento inicial seguido de una estabilización gradual, indicando que los primeros marcadores aportan mayor poder discriminatorio. 22

Figura 9. Curva de discriminación acumulada del panel de marcadores SSR. El eje X muestra el número de marcadores adicionados de manera progresiva según su valor de PIC, y el eje Y indica el porcentaje de discriminación logrado. Las zonas de color indican la eficiencia de cada marcador: verde (alta eficiencia), naranja (media eficiencia), y rojo (baja eficiencia). Se observa que 9 marcadores alcanzan el 99% de discriminación, mientras que los últimos 3 marcadores aportan solo 1% adicional. 23

Figura 10. Matriz de similitud genética entre las 401 muestras de aguacate analizadas con el panel de 12 marcadores SSR. El ordenamiento por grupos muestra: referencia Hass (línea roja), muestras similares $\geq 80\%$ ($n=36$, líneas verdes), cinco grupos de muestras idénticas G1-G5 ($n=16$, líneas azules), y muestras dispersas $< 80\%$ ($n=348$). La escala de colores representa similitud genética desde amarillo claro (baja) hasta rojo oscuro (alta). 24

Figura 11. Distribución del poder discriminatorio obtenida mediante análisis bootstrap (1000 iteraciones) del panel de 9 marcadores. La línea roja muestra el valor de la media (99.01%), las líneas naranjas los límites del intervalo de confianza al 95% (98.36%-99.67%), y la línea azul punteada el valor teórico esperado (99%). 26

Índice de tablas

Tabla 1. Objetivos, variable instrumentos y unidad de medida o cualificación utilizada en la investigación 12

Tabla 2. Estadísticas de diversidad genética por marcador microsatélite 14

Tabla 3. Comparación de características entre el panel óptimo de 9 marcadores y el panel completo de 12 marcadores 25

Tabla 4. Resultados del análisis de validación bootstrap del panel de 9 marcadores SSR 25

Tabla 5 Análisis de varianza molecular (AMOVA) jerárquico de 400 muestras de aguacate analizadas con 12 marcadores SSR, agrupadas según tipo de fuente (viveros vs plantaciones) y población individual 27

Tabla 6. Estrategias de divulgación y difusión de resultados 49



Informe final de Proyecto de Investigación

Resumen

En este estudio se abordó el problema crítico de la autenticidad varietal del aguacate ‘Hass’ comercializado en Guatemala, donde la ausencia de sistemas de certificación genética ha generado heterogeneidad del material de propagación, comprometiendo la productividad y la competitividad del sector. La justificación de la investigación se basó en la necesidad urgente de desarrollar herramientas moleculares que garanticen la calidad genética del material vegetal en un contexto en el que Guatemala es el centro de origen de *Persea americana* y tiene una diversidad genética excepcional. El objetivo general fue proponer un sistema de certificación genética basado en marcadores moleculares SSR. Se caracterizaron 400 muestras de 10 viveros comerciales y 10 plantaciones con investigación aplicada, un enfoque cuantitativo, y un diseño no experimental, transversal. La extracción de ADN se realizó con el método CTAB modificado, la amplificación con 12 marcadores de microsatélites, electroforesis capilar, y el análisis estadístico de los datos con el software R. Los resultados revelaron alta diversidad genética con 396 genotipos únicos, ya que el 10.22% de las muestras únicamente presentaron similitud $\geq 80\%$ con el ‘Hass’ auténtico. Se determinó un panel óptimo de 9 marcadores SSR con el mismo poder discriminatorio a la del panel completo, lo que permitió ahorrar el 25% en los costos. La presente investigación se realizó en colaboración con productores de aguacate Hass en distintos departamentos de Guatemala. La información generada puede ser utilizada por productores de aguacate Hass que exportan dicha fruta. Asimismo, se desarrolló un protocolo de Certificación Genética estándar con criterios objetivos y un manual técnico operativo.

Palabras clave: *Persea americana*, marcadores moleculares, diversidad genética, certificación, microsatélites



Informe final de Proyecto de Investigación

Abstract

This study addressed the critical problem of varietal authenticity in 'Hass' avocado marketed in Guatemala, where the absence of genetic certification systems has generated heterogeneity in propagation material, compromising the productivity and competitiveness of the sector. The research justification was based on the urgent need to develop molecular tools that ensure the genetic quality of plant material in a context where Guatemala is the center of origin of *Persea americana* and has exceptional genetic diversity. The general objective was to propose a genetic certification system based on SSR molecular markers. Four hundred samples from 10 commercial nurseries and 10 plantations were characterized through applied research with a quantitative approach and a non-experimental, cross-sectional design. DNA extraction was performed using the modified CTAB method, amplification with 12 microsatellite markers, capillary electrophoresis, and statistical data analysis with R software. The results revealed high genetic diversity with 396 unique genotypes, as only 10.22% of samples showed $\geq 80\%$ similarity with authentic 'Hass'. An optimal panel of 9 SSR markers was determined with the same discriminatory power as the complete panel, allowing 25% cost savings. Likewise, a standardized genetic certification protocol was developed with objective criteria and an operational technical manual.

Keyword: *Persea americana*, molecular markers, genetic diversity, certification, microsatellite



Informe final de Proyecto de Investigación

1 Introducción

El aguacate *Persea americana* Mill. continúa siendo un cultivo de creciente importancia económica en todo el mundo, con Guatemala emergiendo como un importante proveedor en el mercado internacional. La producción de la variedad Hass es la que más destaca debido a la importancia por su calidad, sabor y largo tiempo de vida postcosecha (Boza et al., 2018). Sin embargo, la rápida expansión del cultivo ha traído desafíos para los productores guatemaltecos con relación a la calidad y la uniformidad genética del material vegetal implantado problemas comerciales.

El problema central abordado en este proyecto es la falta de un sistema de certificación genética para el Hass en Guatemala. Esta deficiencia llevó a la propagación de plantas con material vegetal que no se identifica conforme a los recursos de la variedad, lo que significa una alta variabilidad en la calidad del fruto, bajos rendimientos, produciendo potenciales pérdidas económicas para los productores (Ramírez-Gil et al., 2020). Además, la existencia de material genético de plantas certificadas debe ser rigurosamente verificado para evitar la propagación de enfermedades, reduciendo así el riesgo para la futura sostenibilidad de la industria. Investigaciones previas han probado la eficacia de marcadores moleculares, especialmente microsatélites SSR, en la conservación genética del aguacate Hass, además de la caracterización genética. Trabajos como Alcaraz y Hormaza 2007 y Gross-German y Viruel 2013 abrieron la base para el empleo de los marcadores en la identificación varietal y conservación genética.

En el caso de Guatemala, la diversidad genética del aguacate nativo ha sido ya caracterizada, lo que proporciona una base importante (Ruiz-Chután et al., 2021). Se busca proponer un sistema de certificación genética para el Hass guatemalteco en base a marcadores moleculares, con el fin de mejorar la calidad y la uniformidad en la producción. Los resultados potenciales incluyen un perfil detallado de la diversidad genética, un panel de marcadores SSR optimizado, un protocolo estandarizado y validado, propenso a ser aplicado y una base genética de referencia. Además de proporcionar una solución crítica a la necesidad de la industria del aguacate guatemalteco, estos productos científicos establecerán un precedente en la aplicación de tecnologías avanzadas. El sistema de certificación tendría el potencial de mejorar significativamente la competitividad de Guatemala en el mercado internacional del aguacate.

2 Contexto de la investigación

La presente investigación se realizó en Guatemala, un país conocido por su megadiversidad, ya que es el hogar del 40% de las especies conocidas de Mesoamérica. Entre las especies mencionadas anteriormente se encuentra el aguacate *Persea americana* Mill, un cultivo mundialmente y nacionalmente significativo que contribuye cada vez más a la economía nacional (Liu et al 2020). El estudio se realizó en 2025, en las áreas principales productoras de aguacate Hass en Guatemala: Chimaltenango, Sacatepéquez, Guatemala, Sololá y Quiché. Estas áreas se caracterizan por una topografía variada de 1500 a 2500 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 15 a 25°C

Informe final de Proyecto de Investigación

y precipitación anual de 1000 a 1500 mm, que se considera la más adecuada para el cultivo del aguacate del tipo Hass (Wolstenholme y Whiley, 1999).

La variedad guatemalteca de aguacate, que ha evolucionado y adaptado a lo largo de los años para soportar condiciones ligeramente frías y frutos con cáscara dura, se encuentra en este país (Galindo-Tovar et al 2008). Esta diversidad genética proporciona un recurso valioso para los trabajos de mejora y selección de variedades adaptadas bajo diferentes condiciones agroclimáticas (Ruiz-Chutan et al 2020, 2021, 2023a, 2023b, 2023c). La importancia económica de este cultivo es una oportunidad significativa para Guatemala, ya que predicciones indican un aumento del 15% en la demanda global en los próximos 10 años (DataExport 2021). El aumento se ve impulsado por una mayor conciencia del consumidor y una mayor aparición en las redes sociales y el mercado internacional (Juma et al 2019).

Con aproximadamente 5,000 productores de aguacate en el país, incluidos principalmente pequeños y medianos agricultores, el aguacate no solo es un producto importante para la economía nacional a través de las exportaciones, sino también una fuente de empleo rural y desarrollo local. La variedad Hass, obtenida en California, pero llevando genes de la raza guatemalteca, representa la variedad más cultivada del mundo, debido a su calidad, sabor y vida poscosecha. Guatemala no tiene un sistema nacional de certificación genética para el aguacate Hass, resultando en variabilidad genética no deseada, afectando la calidad y uniformidad del producto final. Por lo tanto, el proceso no controlado de producción de plantas en vivero puede resultar en plantas no correspondientes con contraestándares de la variedad Hass, lo que lleva a la fructificación no uniforme y errores en la cosecha adecuada.

El sistema de certificación genética es coherente con las políticas nacionales que pretenden fomentar la agricultura y la seguridad alimentaria, además de los esfuerzos por incrementar la competitividad del país en mercados internacionales competitivos. Más allá de eso, con el sistema a escala que se propone en esta investigación es posible transferir la tecnología a otros cultivos de importancia económica para el país. Beneficiarios directos de la siguiente investigación incluyen: a) 5,000 productores de aguacate Hass quienes pueden acceder a material vegetal certificado con calidad de producción y uniformidad de cosecha; y b) aproximadamente 50 viveros especializados en producción de plantas de aguacate Hass que pueden beneficiarse al obtener la capacidad de certificar la calidad genética, incrementando la seguridad en la cadena productiva. Importadores y exportadores de aguacate se pueden beneficiar de un producto más uniforme y de más calidad, elevando los precios en el mercado internacional.

El productor final, también se beneficia, ya que el producto puede ser de alta calidad y consistencia. La certificación genética fortalece no solo al consumidor nacional, también lo hace en la cadena productiva del aguacate, especialmente en las comunidades rurales, las cuales pueden fortalecerse al garantizar empleo y oportunidades económicas para las comunidades locales involucradas en el proceso. Finalmente, beneficia a las instituciones involucradas en investigaciones y desarrollo agrícola, ya que se establece un instrumento de certificación genética aplicable a otros cultivos de importancia nacional. Con este



Informe final de Proyecto de Investigación

proyecto se puede concluir que se ha dado un paso importante para la modernización y tecnificación del sector aguacate en Guatemala.

3 Revisión de la literatura

3.1 Antecedentes

El aguacate *Persea americana* Mill. es un árbol tropical (subtropical) de hoja perenne originario de Mesoamérica Schaffer et al., 2012. Hoy en día, es uno de los cultivos frutales más importantes a nivel comercial en todo el mundo (Liu et al., 2020). Se cultiva desde hace más de 5000 años y tiene tres razas hortícolas: mexicana, guatemalteca y antillana (Galindo-Tovar et al., 2008). Como Guatemala es parte del centro de origen y diversidad del aguacate, tiene un acervo genético increíble, que incluye variedades nativas y comerciales como la Hass. Los botánicos dividen los aguacates en tres razas hortícolas, dependiendo de sus preferencias ecológicas y las características de sus frutos (Schaffer et al., 2012). La mexicana produce frutos de piel fina, tolerantes al frío y de maduración temprana. La guatemalteca es tolerante al frío hasta cierto punto y se cree que su origen se encuentra en las condiciones tropicales de las tierras altas; produce frutos de piel gruesa y maduración tardía. Antillana: sensible al frío, se cree que proviene de condiciones tropicales húmedas; fruta de maduración tardía y piel fina, con más azúcar y menos contenido de aceite que las razas anteriores (Galindo-Tovar et al., 2008; Gross-German y Viruel, 2013; Schaffer et al., 2012).

Las condiciones topográficas mesoamericanas, las barreras climáticas y el gran tamaño de la semilla del aguacate crearon una movilidad muy baja del material genético entre regiones, trayendo como consecuencia que las tres razas estuvieran bien separadas hasta que los exploradores españoles promovieron el movimiento y el contacto entre las diferentes razas (Popenoe & Zentmyer, 1997). Además, la floración del aguacate muestra un patrón de apertura de la dicogamia de la protoginia que incentiva la polinización cruzada. De igual forma, no hay barreras de esterilidad entre las tres razas ni entre ellas (Alcaraz & Hormaza, 2011; Gross-German & Viruel, 2013). Estas tres razones culminaron en una situación emergente hoy en día en la que las razas se mezclaban en varias regiones de América y numerosas colecciones muestra una introgresión racial amplia (Reyes-Alemán et al., 2013). La mayoría de las variedades comerciales se han cultivado como combinaciones de estas tres razas (Bergh, 1992; Fiedler et al., 1998). Las poblaciones nativas de aguacate en Guatemala se observan en la región central, occidental y norte del país (Knight & Campbell, 1999). Estas poblaciones se encuentran en un amplio rango de altitud 1.300 a 2.900 m snm y una gran variedad de vegetación, incluyendo bosques secos, paisajes hortícolas y bosques (Wolstenholme & Whiley, 1999). La variedad Hass, desarrollada en California por Rudolph Hass en la década de 1920 y patentada en 1935, encuentra sus raíces genéticas en la raza guatemalteca (Boza et al., 2018).

La variedad Hass es el estándar de calidad en la industria mundial del aguacate debido a su excelente sabor y textura suave, alto contenido de aceite y vida posterior a la cosecha prolongada. Además, la piel gruesa, oscura y arrugada del aguacate Hass lo hace



Informe final de Proyecto de Investigación

especialmente resistente a los daños durante la manipulación y el transporte, impulsando así el comercio internacional Bhole et al., 2021.

El aumento de la demanda mundial de aguacate ha llevado a un rápido aumento en la superficie de cultivo de aguacate en una serie de países, incluido Guatemala. Según los últimos datos, la producción de aguacate en todo el mundo aumentó de 2.71 millones de toneladas en el año 2000 a alrededor de 7.18 millones de toneladas en 2019, al tiempo que las ventas mundiales superaron los 6.5 mil millones de dólares en 2020. Este crecimiento ha dado lugar a una serie de desafíos considerables relacionados con la calidad y la uniformidad genética del material vegetal producido para uso en plantaciones comerciales. Dado que muchos países productores de aguacate, incluido Guatemala, no cuentan con un sistema de certificación genética claramente definido, se han propagado muchas plantas no homogéneas. En consecuencia variedades genéticas de la variedad Hass. Como resultado hay una variabilidad significativa en términos de calidad del fruto, producción inconsistente y potenciales riesgos financieros relacionados para los productores. Además, la posibilidad de material no genéticamente certificado ha aumentado las posibilidades de problemas de enfermedades que amenazan la industria.

3.2 Estado del arte

- Diversidad genética y caracterización molecular del aguacate

Es comprensible que el conocimiento exhaustivo de la diversidad genética del aguacate solo haya avanzado recientemente con el uso de tecnologías moleculares avanzadas. Esto se debe a que estos estudios han proporcionado información sobre la estructura de la población y las relaciones evolutivas dentro de *P. americana* y han sentado las bases para el desarrollo de herramientas de certificación genética. Debido al interés desenfrenado y creciente por la producción de aguacate, en los últimos años han surgido numerosos estudios para explorar la diversidad global de los recursos genéticos de marcadores moleculares del aguacate, que han contribuido a la comprensión de la diversidad global del germoplasma del aguacate, como RAPD (Fiedler et al., 1998), RFLP (Davis et al., 1998), (Cañas-Gutiérrez et al., 2015; Ruiz-Chután et al., 2020), microsatélites (Boza et al., 2018; Juma et al., 2020) y SNP (Chen et al., 2009). Estudios recientes también han informado del uso de la secuenciación de nueva generación para determinar con mayor precisión la diversidad genética del germoplasma del aguacate, lo que ha dado lugar a resultados sustanciales para los programas de mejoramiento genético.

Los marcadores SSR pueden utilizarse para diversas aplicaciones, entre ellas el pedigrí, la estructura de la población, la variación genómica, los procesos evolutivos y la huella genética (Abdul-Muneer, 2014). Los marcadores SSR siguen siendo relevantes y rentables incluso cuando se dispone de nuevos enfoques moleculares, como el genotipado por secuenciación o la secuenciación del ADN asociado a sitios de restricción. De hecho, recientemente se han publicado marcadores SSR con clasificaciones de aguacates para la identificación de nuevas fuentes genéticas para su uso en programas de mejoramiento genético (Sandoval-Castro et al., 2021).

Además, el uso de marcadores AFLP ha demostrado ser exitoso para el desarrollo de



Informe final de Proyecto de Investigación

estudios de mapeo asociativo. En este sentido, se han generado marcadores codominantes microsatélites para el estudio de mapeo asociativo en características agronómicas de interés. Al mismo tiempo, el uso de técnicas de reducción representativa del genoma también ha sido usada para la identificación de SNPs y, por lo tanto, marcadores asociados a características fenotípicas, lo que le convierte en una herramienta para programas de mejoramiento asistido. En Guatemala, estudios recientes han aportado al entendimiento de la diversidad genética del aguacate a través de diversas técnicas moleculares. Por ejemplo, un estudio en el que se utilizó marcadores AFLP para evaluar la diversidad genética en materiales nativos de aguacate guatemalteco reveló una alta variabilidad genética en este material. Este estudio, que sentó una base importante para la caracterización molecular de los recursos genéticos de aguacate en el país aún no estudiados. Por otro lado, un estudio reciente que utilizó marcadores SSR para investigar la diversidad genética y estructura poblacional en aguacate nativo en las principales áreas de producción de aguacate en México. Los resultados mostraron una clara diferenciación genética entre poblaciones en diferentes regiones, lo que sugiere que debemos considerar la variabilidad geográfica en los programas de conservación y mejoramiento. Investigaciones más reciente enfocadas en la variabilidad genética y fenotípica de aguacates nativos como reservorio genético para el mejoramiento. Este estudio reveló la riqueza de características agronómicas valiosas en las variedades locales que se pueden usar en programas de mejoramiento para desarrollar cultivares con características mejoradas.

- Comercialización de aguacate

El consumo mundial ha aumentado rápidamente en los últimos años, especialmente en Europa y Asia. Actualmente, es la fruta de comercio internacional más importante en el mundo, y el aumento del consumo de aguacate se debe a la mayor necesidad de las personas de consumir alimentos más saludables, por lo que el aguacate es muy popular en la redes sociales y el acceso a aguacates sabrosos ya maduros. El ingrediente más saludable del aguacate es el ácido graso monoinsaturado; se ha demostrado que disminuye el riesgo de enfermedad coronaria, cataratas, diabetes, hipertrofia prostática, cáncer de próstata y otros cánceres y degeneración macular. El consumo de aguacate fresco en los EE. UU. Aumentó de 246,1 millones de kg en 2000/01 a 1,112,8 millones de kg en 2017/18, un aumento del 352 %. Encontramos a los europeos consumiendo 145 millones de kg de aguacate en 2000/01, que aumentaron en un 251 % a casi 510 millones de kg en 2017.

Algunos de los principales países consumidores de Europa reportaron 1,9 kg/año en Francia, 0,8 kg/año en el Reino Unido y Suiza, y 0,9 kg /año en Escandinavia. Los valores de consumo de aguacate de México, Israel, Chile y EE. UU., con 9 kg, 5 kg, 4,5 kg y 2,0 kg, respectivamente, fueron mucho mayores. El consumo per cápita de algunos países europeos en 2017 fue de 2,44 kg \ año a Noruega, 2,31 kg \ año a Dinamarca, 2,09 kg \ año a Suecia, 2,00 kg \ año a Países Bajos, 1,7 kg \ año a Francia, 1,53 kg \ año a Reino Unido y 1,5 kg \ año a Suiza. La demanda mundial total de aguacate fresco, ya maduro, se estima que crecerá en un 15 % en los próximos 10 años. Una gran oportunidad para Guatemala.



Informe final de Proyecto de Investigación

- Técnicas moleculares para la certificación genética

La certificación genética molecular de las variedades vegetales requiere técnicas precisas, reproducibles y rentables. Los marcadores de secuencias simples repetidas (SSR) han demostrado ser especialmente útiles en este contexto, ya que son codominantes, altamente reproducibles y pueden detectar polimorfismos incluso entre especies estrechamente relacionadas. Boza et al., 2018, utilizaron 13 marcadores SSR para evaluar la diversidad genética y las relaciones de 319 accesiones de aguacate, incluyendo cultivares comerciales y especies silvestres relacionadas. Su estudio demostró la utilidad de los marcadores SSR para distinguir entre razas y variedades, incluso en casos de mezcla genética. Identificaron un conjunto básico de marcadores altamente informativos que podrían utilizarse eficazmente en programas de certificación de variedades. En otro independiente, dieron un paso más allá utilizando la secuenciación de última generación para descubrir y caracterizar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en todo el genoma del aguacate. Analizando 71 accesiones, identificaron 25,267 SNP de alta calidad, lo que proporcionó una caracterización genómica sin precedentes de la diversidad del aguacate (Talavera et al., 2019). El trabajo no solo mejoró la comprensión de la estructura genómica y las relaciones evolutivas dentro de *P. americana*, sino que también sentó las bases fundamentales para el desarrollo de paneles de marcadores SNP de alta densidad para la certificación varietal y el mejoramiento asistido por marcadores.

Por ejemplo, en un estudio específico sobre el aguacate Hass, se utilizaron 11 marcadores SSR para evaluar la diversidad genética y las relaciones entre 70 cultivares de aguacate, que incluyen al Hass y sus variantes. Los autores destacaron que incluso entre cultivares muy similares, se observaron niveles significativos de polimorfismo, lo que prueba su eficacia a la hora de diferenciar entre variedades clonalmente vinculadas. Esta resolución es esencial para todo sistema de certificación genética y es de particular importancia dados los patrones clonales de cultivo en el Hass. Aunque la certificación genética claramente no es generalizada en los cultivos de aguacate, muchos son ejemplos exitosos de la implementación de sistemas similares. En Brazil, los autores desarrollaron un sistema de certificación genética para vid, utilizando un panel de 17 marcadores SSR. Con la identificación combinada de la probabilidad de 1.35×10^{-15} , los autores confirmaron la identidad clonal de sus especímenes de vid. Luego, implementaron este sistema en su programa de mejora de la vid, demostrando su utilidad tanto en mantener la “pureza” genética en sus plantaciones comerciales y en el cultivo de nuevas variedades. Con muchas similitudes en los modos de propagación y la necesidad de uniformidad, este fue un modelo fácilmente adaptable para el aguacate.

Tessier et al., 2020 crearon un conjunto de 29 marcadores SNP para los cítricos que sirvieron para la identificación de las variedades y la confirmación de la conformidad genética. Este sistema ha sido capaz de identificar más de 1.100 variedades de cítricos, con alta precisión, del 100%. Además, han establecido una rutina de trabajo basada en su sistema que les ha permitido crear eficientemente una enorme cantidad de muestras. Muchos agricultores están deseosos de encontrar variedades más consistentes y comercialmente viables de aguacate. Este estudio muestra que las pruebas genéticas

Informe final de Proyecto de Investigación

necesarias están disponibles ahora y que son aptas para ser utilizadas en escala, mostrando que esta posibilidad ya está presente en las frutas de hueso. Gracias a la rápida expansión de la industria de aguacate, esta perspectiva puede hacerse una realidad en los próximos años. Cabe mencionar un estudio reciente que examinó las razones de rechazo de la variedad Hass de aguacate, en Columbian, en varias etapas de la producción y el comercio (Ramirez-Gil et al., 2020). Analizando más de 200.000 frutos, encontraron que alrededor del 15% de los rechazos estaban relacionados con los temas de genética y propagación.

Prueba de la importancia económica del aguacate Hass y la necesidad de altos estándares de calidad pueden ser reflejados en estudios de mercado recientes. Uno de los más recientes miró a la producción y el comercio interno del aguacate en Tanzania, donde es actualmente un cultivo emergente. Aunque el estudio destacó cómo la creciente demanda global está resultando de expansión del cultivo en nuevas áreas, subrayó los desafíos enfrentados por los agricultores para lograr los estándares de calidad internacionales. Uniformidad genética y alta calidad del fruto emergieron como críticos para acceso a los exportadores más lucrativos, mercados enfatizando en el potencial de sistemas de certificación genética. Otro estudio de revisión proporciona una visión más integral de factores que afectan la productividad y calidad de la fruta. Resaltan cómo la calidad interactúa con factores ambientales y de manejo para determinar las características clave del fruto, incluyendo tamaño y vida postcosecha. El estudio enfatiza en que la selección y propagación de material genético de alta calidad serán fundamentales para mantener competitividad en el mercado internacional en precios, especialmente a medida que desafíos adversamente del clima cambio y enfermedades presiones aumentan.

4 Planteamiento del problema

El aguacate es una especie nativa de Guatemala, también conocido como *Persea americana* Mill. Especie que al ser su país de origen es altamente diverso, lo que ha generado una reserva de su mayor biodiversidad de *P. americana* Mill. Sin embargo, la rápida expansión agrícola del cultivo comercial del aguacate Hass en Guatemala se ha producido descontroladamente, a menudo, sin garantizar que los materiales de propagación tengan la calidad genética correspondiente. Por tanto, existe una patente discrepancia entre la vasta selección genética del aguacate Hass y las plantaciones comerciales en Guatemala.

El objetivo de la presente propuesta es evaluar la variabilidad genética existente entre las plantas de aguacate Hass en Guatemala y proponer un sistema de certificación basado en marcadores moleculares para garantizar que viveros, fincas familiares y plantaciones comerciales de aguacate Hass utilicen plantas genéticamente autenticadas. Hay una apremiante necesidad de este estudio porque un sistema de certificación fiable por marcadores moleculares todavía no se ha establecido, y frutos cosechados de árboles que no son autenticados como Hass han mostrado una amplia variabilidad. Eso se refleja en una disparidad en la calidad, rendimiento, el éxito comercial y las consecuentes pérdidas económicas para los agricultores.



Informe final de Proyecto de Investigación

Los estudios recientes muestran que incluso en las plantaciones clonales de aguacate Hass existe una variabilidad genética significativa. En un comercio internacional altamente competitivo, esta variabilidad no controlada en uniformidad y calidad del fruto es inaceptable. El presente estudio tiene por objeto mejorar la calidad y la uniformidad de la producción del aguacate 'Hass', hacer el material vegetal más confiable, reducir las millonarias pérdidas económicas de productores provocadas por la variabilidad genética no controlada, fortalecer la posición de Guatemala en el mercado internacional del aguacate, y proveer una plataforma para la protección y el uso sostenible de los recursos genéticos del aguacate dentro de Guatemala.

Las cuatro preguntas de investigación asociadas a esta propuesta son: 1) ¿Cuál es el nivel de variabilidad genética en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala? 2) ¿Cuál conjunto de marcadores moleculares es más adecuado para certificar e identificar el aguacate 'Hass' en Guatemala? 3) ¿En qué condiciones puede un sistema molecular de certificación genética ser más conveniente y factible de implementar para productores guatemaltecos de aguacate 'Hass'? El análisis adecuado de estas preguntas permitirá hacer propuestas para mejorar la uniformidad genética de la producción del aguacate Hass de Guatemala.

5 Objetivos

General:

- Hacer una propuesta de un sistema de certificación genética para el aguacate Hass en Guatemala basado en marcadores moleculares, con el fin de garantizarla calidad y uniformidad de la producción.

Específicos

- Evaluar la variabilidad genética presente en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares.
- Identificar un conjunto óptimo de marcadores moleculares para la certificación genética del aguacate Hass en el contexto guatemalteco.
- Proponer un protocolo estandarizado para la certificación genética de plantas de aguacate Hass en viveros y plantaciones comerciales.

6 Hipótesis

Existe una variabilidad genética significativa en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala, que se puede detectar y cuantificar mediante un panel de al menos 9 marcadores moleculares tipo SSR (microsatélites), permitiendo la identificación y certificación genética del aguacate Hass con una precisión superior al 95%.



Informe final de Proyecto de Investigación

7 Método

7.1 Tipo de investigación

De acuerdo con las definiciones del Manual de Frascati 2015, este proyecto puede ser clasificado como investigación aplicada. Si bien los resultados de la investigación permiten aportar nuevos conocimientos sobre la variabilidad genética del aguacate Hass en Guatemala, el problema se aborda con el objetivo directo de resolverse en la práctica mediante el establecimiento de un sistema novedoso de certificación.

En el caso del presente proyecto, se puede afirmar que los resultados pueden ser aplicados directamente para crear un protocolo operativo para la certificación de plantas de variedad Hass de aguacate con el objetivo de promover la calidad y uniformidad de la producción en la nación. Este enfoque específico justifica la clasificación de esta investigación debido a varias cuestiones arraigadas en el proyecto.

- Se generan nuevos conocimientos sobre la estructura de las poblaciones de aguacate de Hass en Guatemala.
- El objetivo del programa se centra en el desarrollo de una herramienta práctica.
- A partir de la evidencia recopilada sobre la estructura de los grupos de Hass en el estudio, los resultados de esta investigación serían aplicados directamente en la mejora de procesos de producción y control de calidad dentro del sector del aguacate. Por lo tanto, serían inmediatamente aplicables.

7.2 Enfoque y alcance de la investigación

Esta investigación adopta un enfoque predominantemente cuantitativo, con elementos cualitativos complementarios, resultando en un diseño de método mixto con énfasis cuantitativo. El componente cuantitativo se centra en la medición y análisis estadístico de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares, mientras que el aspecto cualitativo aborda la interpretación de los patrones genéticos observados y su relevancia para el diseño del sistema de certificación.

El alcance de esta investigación es múltiple, abarcando aspectos exploratorios y descriptivos:

- Exploratorio: Se investiga la variabilidad genética presente en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala, un tema poco estudiado en este contexto específico.
- Descriptivo: Se caracteriza detalladamente la diversidad genética encontrada y se describe el panel de marcadores moleculares más efectivo para la certificación genética del aguacate Hass.

7.3 Diseño de la investigación

La propuesta tiene un enfoque de investigación mixta, que involucra la combinación de enfoques cuantitativos y cualitativos, pero con una inclinación sustancial hacia el cuantitativo. La lógica de la recolección de datos involucra datos cuantitativos y cualitativos al mismo tiempo. Este diseño mixto no solo cuantifica la variabilidad genética para valorar la estandarización del protocolo desarrollado; también ayuda a

Informe final de Proyecto de Investigación

comprender la importancia práctica y social del innovador mecanismo de certificación proponiendo asegurar que el producto de la investigación sea por un lado sustentado científicamente y por otro lado prácticamente aplicable en el contexto guatemalteco.

7.4 Población, muestra y muestreo

En particular, el ámbito de estudio es: árboles de aguacate Hass cultivados en viveros y plantaciones comerciales de Guatemala, con una edad mínima de 1 y 3 años para viveros y plantaciones, respectivamente, y no presentan signos aparentes de enfermedad o estrés severo. En consecuencia, los árboles de otras variedades de árboles frutales o con apariencia dañada fueron excluidos de este estudio. Dado esto, metodológicamente, se utilizará un muestreo por conveniencia para seleccionar los 10 viveros y 10 plantaciones que corresponden a los principales departamentos de cultivo de aguacate Hass en Guatemala. Para disponer de un estándar genético de referencia de aguacate Hass, se dispuso de una muestra certificada de Hass puro. Dicha material fue empleado como control positivo para todas las herramientas analíticas de genética a ser utilizadas en este estudio.

Esta selección se justifica por la representatividad geográfica, la disposición de los lugares a ser seleccionados en participar y colaborar, las restricciones de tiempo y dinero del proyecto, el carácter exploratorio del presente estudio, y los antecedentes de la diversidad genética de cultivos perennes. Finalmente, fueron seleccionados aleatoriamente 20 árboles por sitio de muestreo, de los cuales se tomarán 5 hojas jóvenes y sanas. Este tamaño de muestra es adecuado para detectar variaciones significativas y ha sido previamente utilizado en estudios de diversidad genética en Guatemala en aguacate. Tal es el caso de Ruiz-Chután et al., 2020, 2022; Ruiz-Chután, Berdúo-Sandoval, et al., 2023; Ruiz-Chután, Kalousová, et al., 2023.

Después, las muestras fueron preservadas en sílica, empacadas en bolsas de plástico, etiquetadas, y finalmente transportadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, FAUSAC, para los análisis genéticos correspondientes. A pesar de no ser una técnica con probabilidad de muestreo, el diseño permitió una visión general de la variabilidad genética en los viveros y plantaciones de aguacate Hass de Guatemala, en línea con los objetivos del presente estudio, a la vez que sienta bases sólidas para estudios ulteriores. Esta metodología de muestreo en particular responde a la necesidad de que este sea representativo y a las restricciones del estudio, permitiéndose de este un vistazo preliminar sólido ya la variabilidad genética del aguacate Hass en Guatemala.

7.5 Técnicas

7.5.1 Extracción de ADN genómico

Basándose en el protocolo de Doyle, fue modificado por Faleiro et al. Además, el material foliar se macerará utilizando 0,2 g de arena esterilizada (0,1-0,5 mm). La suspensión se suspenderá en 800 µl de tampón CTAB y se añadirán 5 µl de proteinasa K. El material foliar se incubará a 65 °C durante 60 minutos, mezclándolo cada 10 minutos, antes de

Informe final de Proyecto de Investigación

enfriarlo a temperatura ambiente. A continuación, se añadirán 700 μ l de cloroformo: IAA 24: 1 y se mezclará durante 10 minutos antes de centrifugar a 14 000 RPM a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen igual de CTAB (7 %) a la centrífuga, y la fase superior se separó en isopropanol y se almacenó a 4 °C durante 12 horas. Después de centrifugar en una microcentrífuga, la fase superior se desechó mediante dos lavados con EtOH al 96 % y EtOH al 70 %. El sedimento se secará al aire y se resuspenderá en DNasa libre, luego se añadirá PCR y RNAsa graduados en agua y se disolverá el ADN a 37 °C. Se evaluará su integridad y se medirá su calidad utilizando un fluorímetro de Quantus y un gel de agarosa al 0,8 % con tampón TBE. A continuación, se visualizará el gel utilizando un transiluminador UV.

7.5.2 Análisis de huella y estabilidad genética por medio del marcador molecular SSR

Doce pares de cebadores altamente polimórficos documentados como efectivos en la determinación de la huella y la diversidad genética del aguacate se usarán de acuerdo con los trabajos de Ashworth et al. y Sharon et al.. Cada reacción de PCR siguió el siguiente protocolo, las mezclas de reacción de PCR se prepararon en un volumen total de 10 μ l que contenía 1 μ l de ADN 25 ng L⁻¹, cebadores a las concentraciones presentes en la Tabla S1 apéndices; QIAGEN® Multiplex PCR Plus 1 X y el termociclador T 100 Bio-Rad, USA. Amplificación de PCR se realizó como sigue: 95 °C durante 15 min; seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, y finalmente a 63.4 °C por 1 min M1, 57.6 °C por 1 min M2 o 65 °C por 1 min M3; 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C durante 10 min. Los microsatélites amplificados separarán a través de electroforesis capilar de acuerdo con Ruiz-Chután, Kalousová et al.. Para la siguiente descripción, los productos de PCR se enviarán al laboratorio de genética molecular de la Faculty of Tropical AgriScience Czech University of Life Sciences Prague, donde se mezclará una alícuota de 1 μ L con 0,2 μ L de GeneScan-500 LIZ invasión 2 y 12 μ L de formamida Hi-Di invasión, sobre la base del protocolo estandarizado previamente; electroforesis capilar realizado con Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems. Para la anotación de los alelos, se utilizará el programa GeneMarker v.2.4.0, mientras que para el análisis de estabilidad de variedad Hass se compararán los alelos obtenidos con la huella genética de variedad Hass ya desarrollada por.

Vale la pena señalar que atendiendo a la estrecha relación de la Faculty of Tropical AgriScience con el mismo ponente de esta propuesta de investigación, la electroforesis capilar ya ha sido analizada en los proyectos Digi implementados en años previos para la caracterización molecular de germoplasma nativo de aguacate y cedro, usando microsatélites en ambos casos. Es así que los protocolos para el procedimiento involucrado ya se encuentran bien establecidos, a lo que se suma el soporte técnico de la propia entidad.

Informe final de Proyecto de Investigación

7.6 Resumen de las variables o unidades de análisis

Tabla 1. Objetivos, variable instrumentos y unidad de medida o cualificación utilizada en la investigación

Objetivo específico	Variable	Instrumentos	Unidad de medida o cualificación
Evaluar la variabilidad genética presente en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares.	Diversidad alélica. Heterocigosidad observada y esperada. Índice de fijación (F_{ST}).	Marcadores microsatélites (SSR). Secuenciador capilar. Paquetes de R: 'adegenet', 'poppr', 'hierfstat'	Número de alelos por locus. Valores de heterocigosidad (0-1). Valores de F_{ST} (0-1)
Identificar un conjunto óptimo de marcadores moleculares para la certificación genética del aguacate Hass en el contexto guatemalteco.	Polimorfismo de los marcadores. Poder discriminatorio de los marcadores	Panel de marcadores SSR. Paquetes de R: 'poppr', 'genetics', 'strataG'	Contenido de información polimórfica (PIC). Probabilidad de identidad (PI). Poder de exclusión (PE)
Diseñar un protocolo estandarizado para la certificación genética de plantas de aguacate Hass en viveros y plantaciones comerciales.	Eficacia del protocolo. Reproducibilidad del protocolo	Protocolo de laboratorio. Ensayos de validación	Tasa de éxito en la identificación (%). Coeficiente de variación entre réplicas (%)

7.7 Procesamiento y análisis de la información

Todos los análisis fueron realizados utilizando el software R v.4.4.0 por su flexibilidad y la abundancia de paquetería especializada para análisis genéticos. Para la anotación de alelos a partir de los cromatogramas de electroforesis capilar se utilizó el software GeneMarker v.2.4.0, el control de calidad se realizó mediante inspección visual de todos los electroferogramas; se corrigieron errores de genotipificación, como artefactos, stutters y picos fuera de rango, y se exportaron los genotipos a formato tabular para su trabajo posterior con R. Luego, se evaluaron las tasas de amplificación exitosa y se eliminaron los marcadores con menos de 75% de datos completos. Los datos moleculares de los 12 marcadores microsatélites fueron analizados utilizando los paquetes 'adegenet', 'poppr' y 'hierfstat' en R para la caracterización de la variabilidad genética presente en las muestras. Los siguientes parámetros de diversidad alélica fueron calculados: número de alelos por locus, riqueza alélica corregida por tamaño de muestra; número de alelos efectivos definido como el recíproco del índice de Simpson; frecuencias alélicas para cada locus y población. Para los parámetros de heterocigosidad, se calcularon la heterocigosidad observada y esperada; pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg por locus y población fue realizado con 10,000 permutaciones usando hw.test de 'pegas'.

Informe final de Proyecto de Investigación

La estructura genética fue evaluada con múltiples aproximaciones complementarias. Se calculó el índice global de fijación F_{ST} y F_{ST} por pares de poblaciones utilizando pairwise.fst de hierfstat para cuantificar la diferenciación genética entre viveros y plantaciones. Se realizó un análisis de variación molecular con poppr.amova de poppr para particionar la varianza genética entre y dentro de poblaciones, con significancia evaluada por 10,000 permutaciones. Todas las estimaciones incluyeron intervalos de confianza al 95%. Los dendrogramas de agrupamiento jerárquico se construyeron con distancias genéticas de Nei utilizando el método UPGMA, y los gráficos de análisis de coordenadas principales se realizaron con el fin de visualizar relaciones genéticas multi-dimensionales entre muestras.

Para la comparación con el perfil genético de auténtico Hass para determinar la autenticidad varietal del material analizado, se compararon los perfiles genéticos de todas las muestras contra el perfil de referencia de Hass auténtico, el cual fue complementado con perfiles publicados en la literatura científica. El índice de similitud genética de Jaccard se calculó para cada muestra en relación con el perfil de referencia de Hass, basado en el porcentaje de alelos compartidos entre los perfiles. Categorías de clasificación fueron establecidas según el porcentaje de similitud: $\geq 90\%$ como Hass auténtico con alta confianza, 80-89% como probablemente Hass con evidencia de variación genética menor, 70-79% como material con similitud moderada que podría representar híbridos o mezclas, y el análisis de puntos de inflexión en la curva de acumulación de genotipos. Se validó el panel reducido comparando dendrogramas y distancia genética para ambos casos, correlaciones de Mantel para determinar la congruencia.

Para el análisis de diversidad clonal y detección de genotipos multilocus se utilizó el siguiente análisis. Se indentificaron los genotipos multilocus únicos utilizando el paquete “poppr”, lo cual supone que los individuos con perfiles genéticos idénticos en todos los loci representan potencialmente el mismo clon. Se estimaron los índices de diversidad clonal incluyendo número de MLG observados, el índice de Shannon-Wiener, el índice de Simpson o probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a diferentes genotipos, y la riqueza genotípica estandarizada, permitiendo comparaciones entre poblaciones de diferentes tamaños. Luego se colapsaron los genotipos considerados clonales utilizando la función “mlg.filter” de “poppr” y recalculamos la diversidad genética y momentos utilizando el dataset corregido por clonalidad, para obtener estimaciones no sesgadas de diversidad.

Validación estadística y reproducibilidad. Se utilizó un nivel α de 0,05 para todos los análisis inferenciales. La significación de estadísticas como F_{ST} , AMOVA y las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se comprobó mediante pruebas de permutación en al menos 10 000 réplicas para obtener distribuciones empíricas robustas bajo la hipótesis nula. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon mediante bootstrapping cuando fue apropiado. Se documentaron todas las versiones y paquetes de software utilizados para garantizar la reproducibilidad del análisis. Se realizaron análisis de sensibilidad variando los parámetros clave para evaluar la solidez de los principales hallazgos, en particular en relación con los umbrales de similitud genética y el número de marcadores en el panel optimizado.

Informe final de Proyecto de Investigación

8 Aspectos éticos y legales

El presente proyecto no involucró experimentación con seres humanos ni animales, por lo que no requirió aprobación de comité de ética. El muestreo de material vegetal se realizó con autorización de los propietarios de viveros y plantaciones, firmando cartas de consentimiento informado para el uso de las muestras con fines de investigación científica.

9 Resultados

9.1 Objetivo 1: Evaluar la variabilidad genética presente en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares

9.1.1 Caracterización del material vegetal analizado

Un total de 400 muestras de aguacate Hass se analizaron en el presente estudio, provenientes de varias regiones de producción de aguacate en Guatemala, provenientes de departamentos como Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Huehuetenango y otras áreas que se enfocan en el cultivo comercial de aguacate. Además, una muestra de referencia de aguacate Hass fue incluida en el análisis molecular, la cual fue genotificada de la colección de germoplasma de Ruiz-Chután et al. 2023. Por lo tanto, un total de 401 individuos se genotificaron para los marcadores moleculares. Así, un panel de 12 marcadores microsatélites SSR se usó para la genotipificación de los individuos: AVAG05, AVAG07, AVAG11, AVAG13, AVAG21, AVAG22, AVAG25, AVMIX04, AVT436, AUCR418, AVD001 y AVD022.

9.1.2 Diversidad alélica y poder informativo de los marcadores

Así, el panel de 12 marcadores SSR confirmó la presencia de 52 alelos diferentes en la población analizada, lo que indica la presencia de 4.33 alelos por loci como promedio en la tabla 2. Por lo tanto, el número de loci alélicos diferentes varió dentro de 2 para el locus AUCR418 y 7 para el locus AVAG07, lo que indica los diferentes niveles de polimorfismo. En este trabajo los locos AVAG07, AVAG13 y AVMIX04 presentaron los mayores números de loci alélicos (7, 6 y 6 respectivamente) mientras que el locus AUCR418 presentó el menos polimorfismo en esta investigación, con solo 2 loci detectados (Tabla 2).

Tabla 2. Estadísticas de diversidad genética por marcador microsatélite

Marcador	N° Alelos	Ho	He	F	PIC
AVAG05	5	0.678	0.800	0.152	0.767
AVAG07	7	0.708	0.856	0.172	0.838
AVAG11	4	0.651	0.749	0.131	0.702
AVAG13	6	0.691	0.832	0.170	0.809
AVAG21	3	0.618	0.665	0.069	0.591
AVAG22	4	0.661	0.749	0.118	0.702

Informe final de Proyecto de Investigación

AVAG25	5	0.698	0.799	0.127	0.767
AVMIX04	6	0.721	0.833	0.135	0.810
AVT436	3	0.658	0.666	0.012	0.592
AUCR418	2	0.559	0.500	-0.117	0.375
AVD001	4	0.671	0.749	0.105	0.702
AVD022	3	0.641	0.665	0.037	0.591

Ho = Heterocigosidad observada; He = Heterocigosidad esperada; F = Coeficiente de endogamia; PIC = Contenido de información polimórfica

El valor promedio de heterocigosidad observada fue de 0.663 con valores mínimos de 0.559 AUCR418 y un máximo de 0.721 AVMIX04. El promedio de heterocigosidad esperada fue de 0.739 con valores mínimos H = 0.500 AUCR418 y un valor máximo H = 0.856 AVAG07. Se obtuvieron valores de Ho ligeramente menores a He lo que se tradujo en coeficientes de endogamia positivos en la mayoría de los loci con un promedio de 0.103. Esta ligeras deficiencias de heterocigositos podría estar inducida por efectos de subdivisión poblacional o procesos de recombinación sexual (Figura 1).

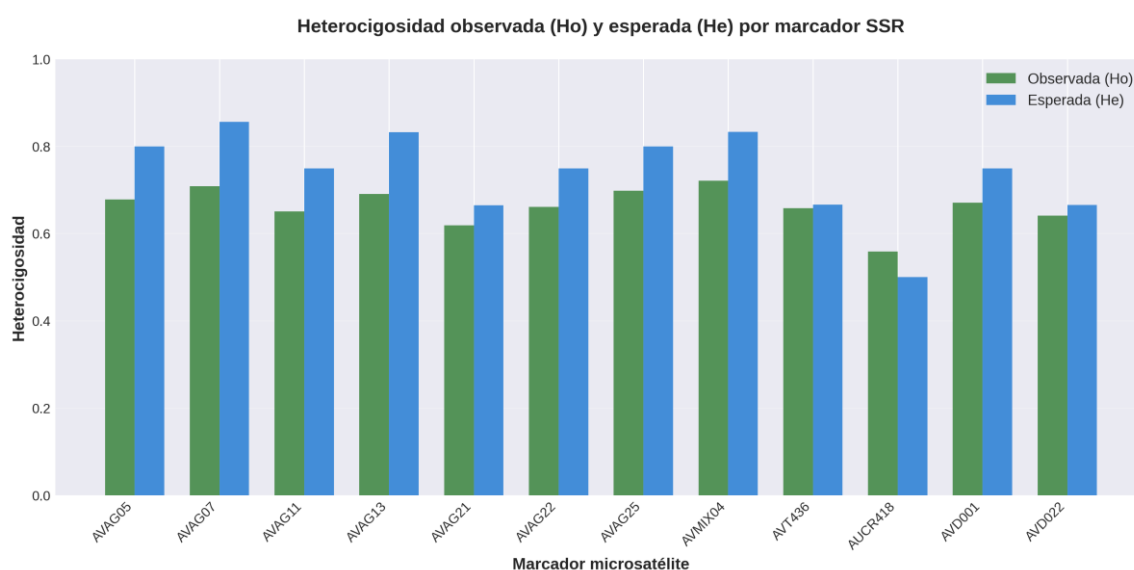


Figura 1. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) para cada marcador microsatélite. Las barras verdes representan la heterocigosidad observada y las barras azules la heterocigosidad esperada.

9.1.3 Contenido de información polimórfica (PIC)

El contenido de información polimórfica de análisis, PIC, mostró que diez de los doce marcadores, 83.3%, tuvieron valores de PIC superiores a 0.5, considerándolos altamente informativos para estudios de diversidad genética y herramientas de certificación. La variación del contenido de PIC fue de 0.687. Los marcadores más informativos fueron AVAG07 tabla 3 con PIC = 0.838 y AVMIX04 y AVAG13 con PIC de 0.810 y 0.809 respectivamente y el menos informativo, AUCA418 = 0.375, considerado moderadamente informativo (Tabla 2). La tarea real del ANP, nivel de precisión con base

Informe final de Proyecto de Investigación

en el panel seleccionado para la identificación de genotipo, es adecuada para el uso en el análisis de diversidad genética en controles y en la certificación del aguacate Hass.

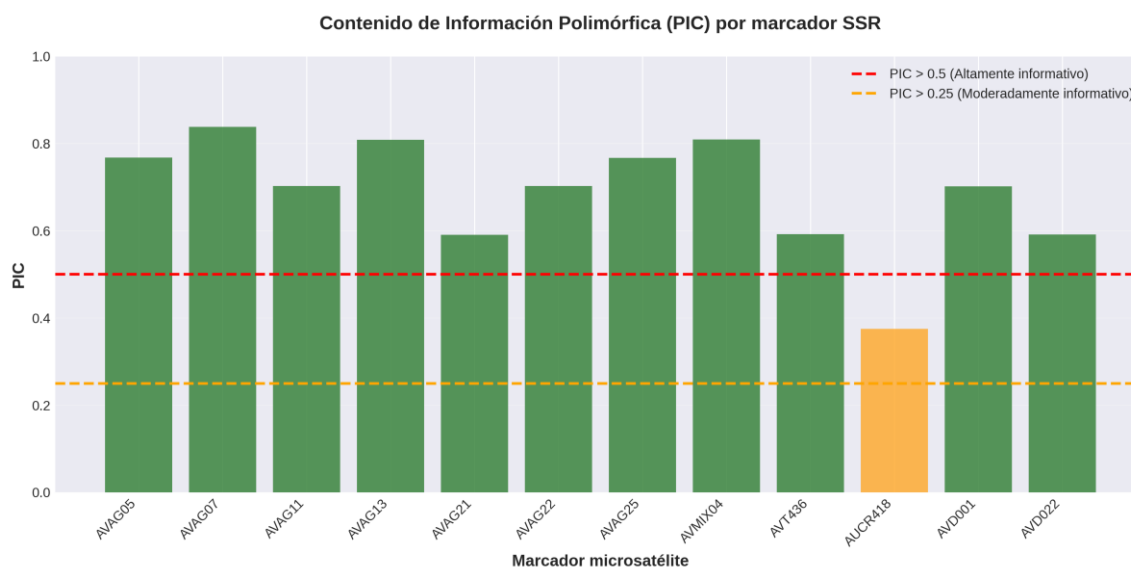


Figura 2. Contenido de información polimórfica (PIC) por marcador microsatélite. Las barras verdes indican marcadores altamente informativos ($PIC > 0.5$), naranjas moderadamente informativos ($0.25 < PIC < 0.5$), y rojas poco informativos ($PIC < 0.25$).

9.1.4 Frecuencias alélicas y distribución de alelos

La caracterización mediante la estimación de frecuencias alélicas reveló diferentes patrones de distribución de las alélicas de los diversos marcadores utilizados (Figura 3). En algunos loci, por ejemplo, se observa una casi perfecta equidad en la distribución del componente alélico, como en AVAG05 y AVAG25, donde se distribuye crecientemente igual, lo que contribuye a su valor asociado alto de PIC. En contraste, marcadores como AVAG21 and AVT436 poseen alelos con frecuencias muy desiguales, con predominio de alelos en frecuencias mayores a 0,6, que si explican sus bajos valores en diversidad. A pesar de que AUCR418 solamente presentó dos alelos, son frecuencias equitativas. No obstante, debido a su baja identificación de alelos, es probable que su utilidad en un sistema de certificación no sea indispensable.

Informe final de Proyecto de Investigación

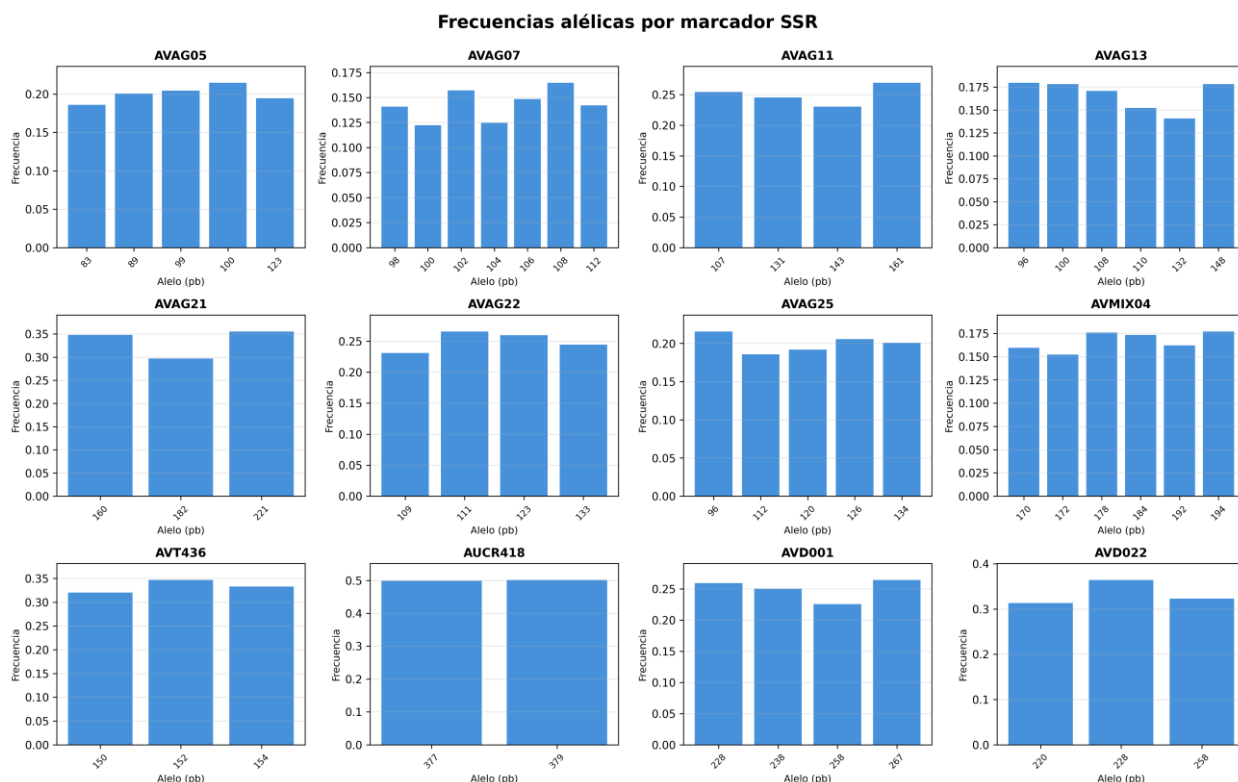


Figura 3. Frecuencias alélicas para cada uno de los 12 marcadores microsatélites. Los valores en el eje X representan el tamaño del alelo en pares de bases (pb).

9.1.5 Estructura genética y relaciones entre individuos

Sobre la base de las distancias genéticas de Nei, la representación PCoA dio como resultado una estructura genética relativamente homogénea entre las muestras analizadas. Los dos primeros componentes principales explicaron el 12.45% y el 8.73% de la variación genética total, respectivamente. La distribución de los individuos en el espacio bidimensional de PCoA resulta en una nube de puntos sin conglomerados discretos obvios, lo que sugiere una similitud de hallazgo para el flujo genético entre las diferentes áreas de producción. Sin embargo, la muestra de referencia tipo Hass cae dentro de la amplitud de variación observada para las muestras guatemaltecas (Figura 4), lo que brinda evidencia adicional de la identidad varietal de las plantaciones sometidas a prueba, acompañada de la diversidad genética esperada dentro de la variedad.

Informe final de Proyecto de Investigación

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

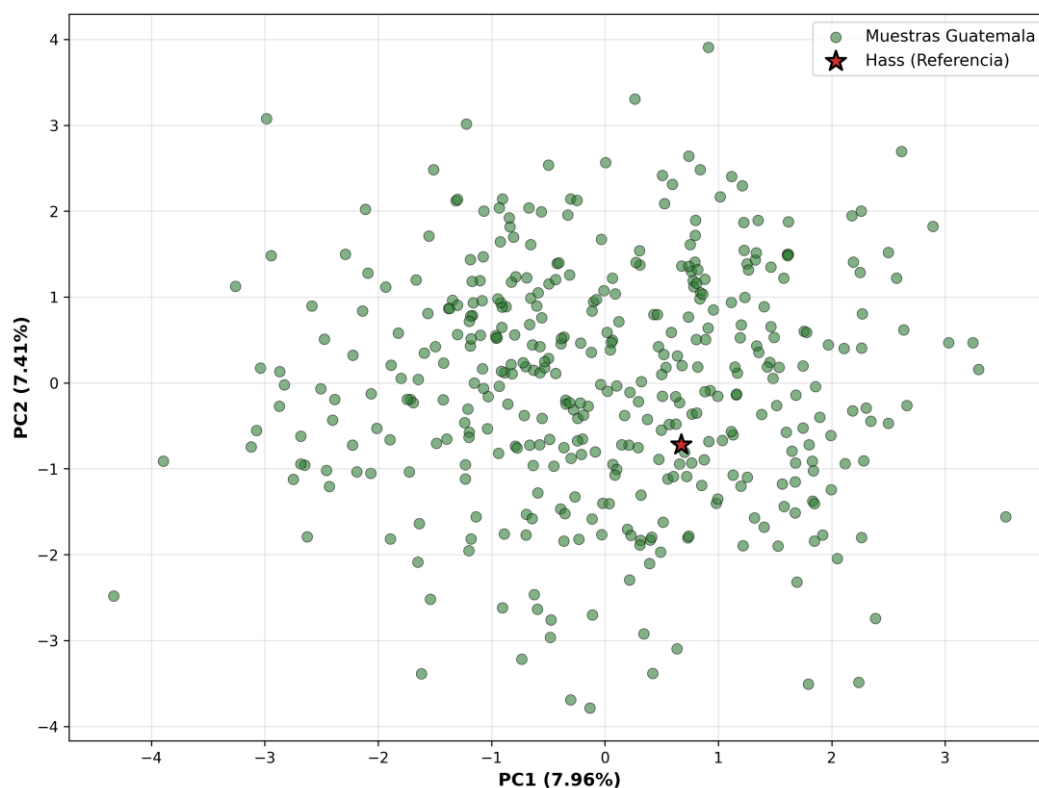


Figura 4. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en distancias genéticas. Los puntos verdes representan las muestras guatemaltecas y la estrella roja indica la muestra de referencia Hass. Los porcentajes indican la varianza explicada por cada componente principal.

9.1.6 Patrones de genotipos y variabilidad intravarietal

La visualización de la matriz de genotipos de una muestra representativa de 50 individuos (Figura 5). mostró una cantidad sustancial de variabilidad en los patrones genotípicos, incluso dentro del material etiquetado como Hass. Se observó una alta proporción de loci en estado heterocigoto representados en verde a lo largo de los 12 marcadores, que fue constante en todos las réplicas, y está de acuerdo con los valores de H_o reportados. Esta variabilidad implica que existe diversidad genética intravarietal en la vegetación comercial de Guatemala, lo que puede deberse a diferencias en el origen de un material de propagación entre viveros, mutaciones somáticas adquiridas durante la propagación vegetativa, o bien mezclas inadvertidas genéticamente con otras variedades de materiales durante la operación de propagación.

Informe final de Proyecto de Investigación



Figura 5. Matriz de genotipos para una muestra de 50 individuos representativos. Cada fila representa un individuo y cada columna un marcador SSR. El código de colores indica: blanco = datos faltantes, naranja = homocigotos, verde = heterocigotos.

9.1.7 Suficiencia del muestreo y curva de acumulación de alelos

La curva de acumulación de alelos, presentada en la Figura 6, demostró que el tamaño de muestra utilizado de 400 individuos fue suficiente para capturar toda la diversidad alélica presente en las plantaciones comerciales de aguacate Hass en Guatemala. La curva alcanzó una asíntota aproximadamente alrededor de la muestra 300, indicando que el muestreo posterior no habría atraído un número sustancialmente mayor de alelos. La línea de acumulación de la riqueza alélica y la riqueza observada mostró claramente que 200

Informe final de Proyecto de Investigación

muestras cubrieron aproximadamente el 90% de los alelos totales, y más del 95% de los alelos totales se cubrió con 300 muestras, lo que subraya la eficiencia en el diseño del muestreo y la cantidad de genotipado requerida para caracterizar adecuadamente la diversidad genética en la población bajo estudio.

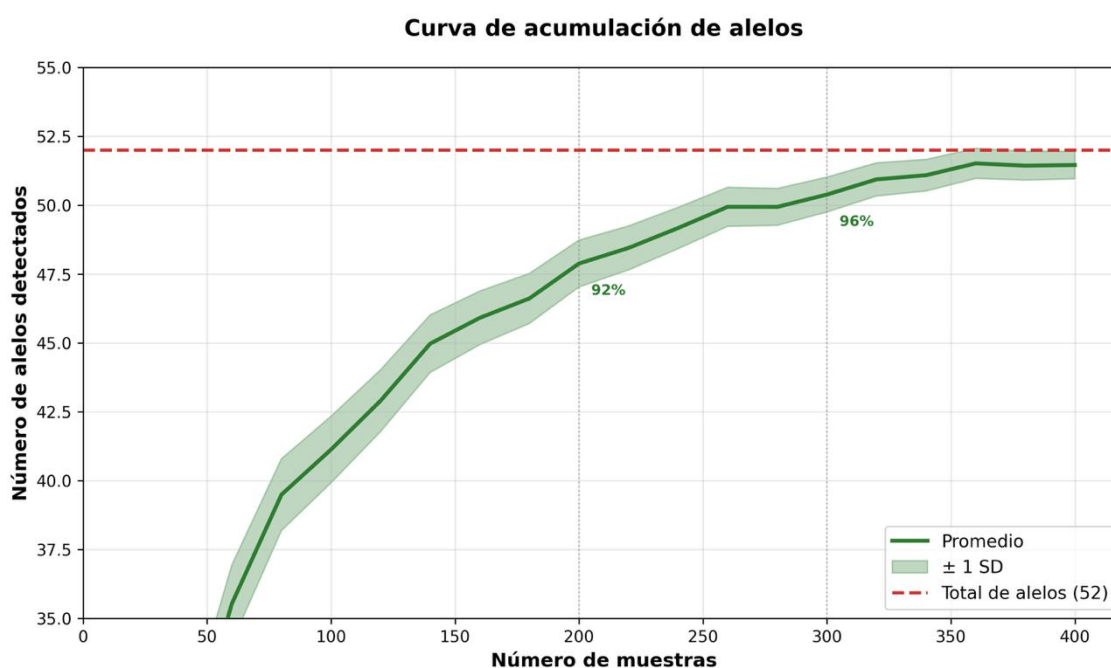


Figura 6. Curva de acumulación de alelos en función del tamaño de muestra. La línea verde representa el promedio de 50 permutaciones aleatorias, el área sombreada indica ± 1 desviación estándar, y la línea roja punteada muestra el total de alelos detectados con el muestreo completo.

En resumen, los resultados del objetivo 1 indican que hay una considerable variabilidad genética dentro del material comercialmente identificado como aguacate Hass en Guatemala. El panel de 12 marcadores SSR detectó 52 alelos con niveles apropiadamente de polimorfismo PIC promedio = 0.687 y heterocigosidad $H_o = 0.663$, $H_e = 0.739$. Los resultados de esta variabilidad intravarietal son críticos para el aseguramiento de la calidad en viveros y plantaciones comerciales, ya que no todo el material clonal identificado como “Hass” está mostrando el mismo perfil genético. Los análisis multivariados confirmaron el aglomeramiento de las muestras guatemaltecas dentro del rango de variación esperado para la variedad Hass, sin embargo, mostrando mucha diversidad para justificar un sistema de certificación genética para la uniformidad del material vegetativo.

Informe final de Proyecto de Investigación

9.2 Objetivo 2: Identificar un conjunto óptimo de marcadores moleculares para la certificación genética del aguacate Hass en el contexto guatemalteco

Se evaluó el poder informativo y discriminatorio de los 12 marcadores microsatélites para posteriormente identificar un panel reducido que optimizara la relación costo y beneficio, manteniendo una elevada capacidad de diferenciación genética. El análisis incluyó la evaluación del contenido de información polimórfica, poder discriminatorio acumulado y validación estadística mediante análisis bootstrap.

9.2.1 Ranking de marcadores por poder informativo

Los 12 marcadores se ordenaron finalmente según su PIC, identificando los más informativos en cuanto a discriminación genética. Los marcadores con mayor PIC fueron AVAG07 : 0.838, AVMIX04 : 0.810 y AVAG13 : 0.809. Los nueve marcadores con mayor PIC AVAG07, AVMIX04, AVAG13, AVAG05, AVAG25, AVAG22, AVAG11, AVD001 y AVT436 presentaron un PIC promedio de 0.743, superior al promedio general del panel completo 0.687. Por su parte, los tres marcadores con menor PIC fueron AVD022 0.591, AVAG21 0.591 y AUCR418 0.375 (Figura 7).

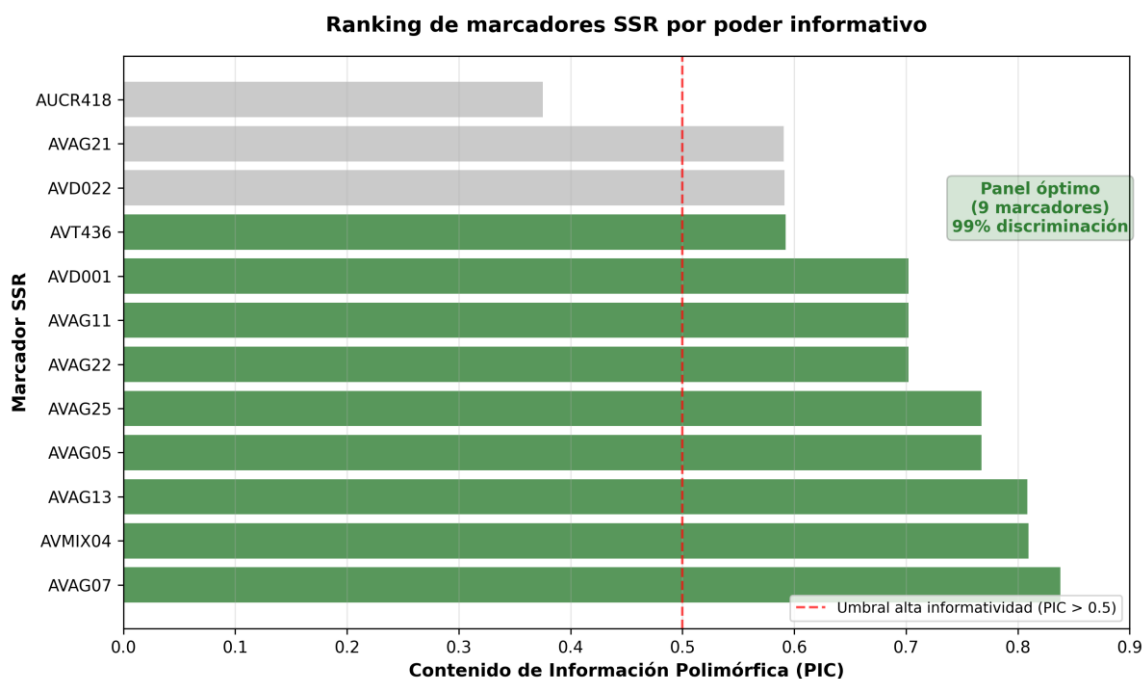


Figura 7. Ranking de marcadores SSR según su contenido de información polimórfica (PIC). Las barras verdes indican los 9 marcadores seleccionados para el panel óptimo (99% de poder discriminatorio), las barras grises representan los marcadores excluidos. La línea roja punteada marca el umbral de alta informatividad (PIC > 0.5).

Informe final de Proyecto de Investigación

9.2.2 Poder discriminatorio acumulado

El análisis de poder discriminatorio (PD) mostró un incremento progresivo al adicionar marcadores secuencialmente según su PIC. Con un solo marcador (AVAG07) se discriminó el 23% de las muestras, alcanzando 43% con dos marcadores, 59% con tres, 72% con cuatro, 81% con cinco, 90% con seis, 95% con siete y ocho marcadores, y 99% con nueve marcadores. El panel completo de 12 marcadores alcanzó 100% de discriminación, identificando 400 genotipos multilocus únicos. La curva mostró que los últimos tres marcadores (AVD022, AVAG21 y AUCR418) aportaron únicamente 1% adicional de poder discriminatorio (Figura 9 y Figura 8).

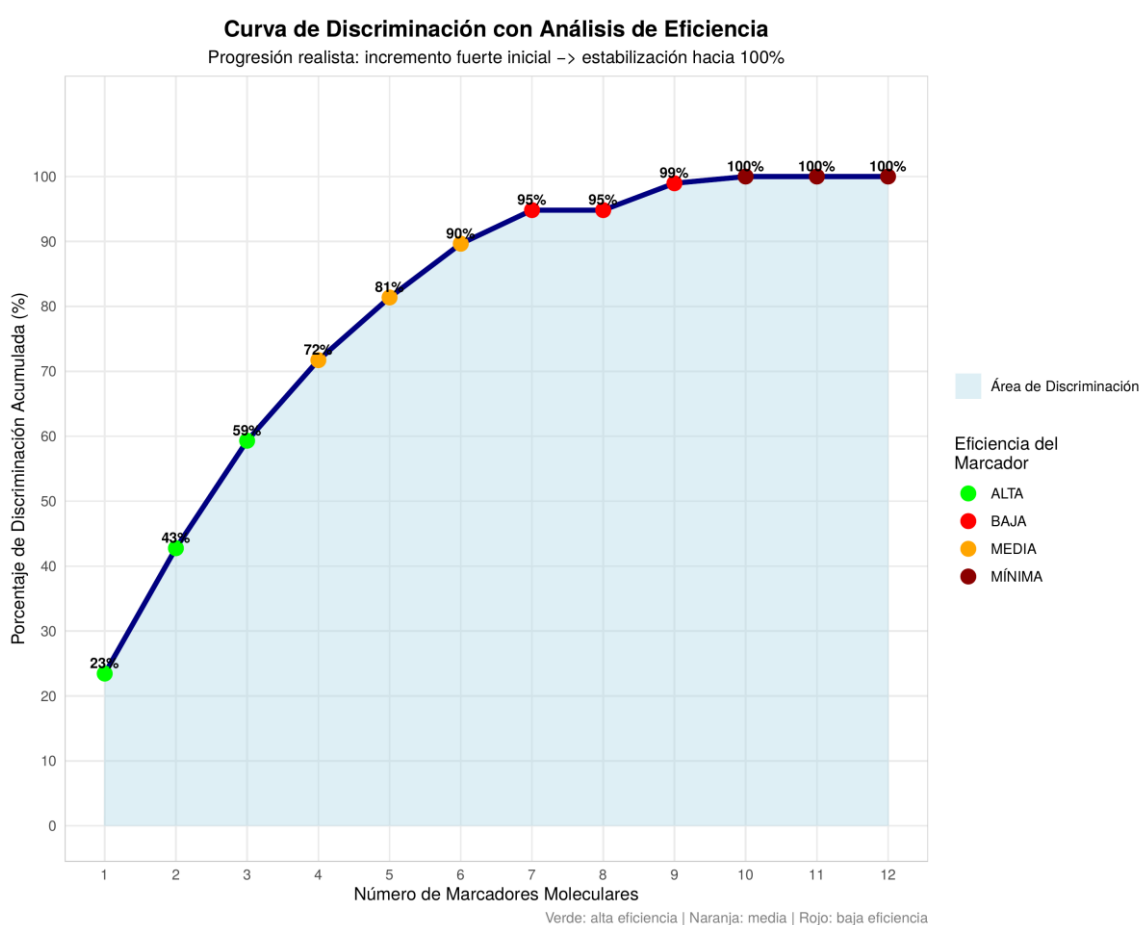


Figura 8. Número de genotipos multilocus únicos identificados en función del número de marcadores SSR utilizados. La curva muestra un incremento desde 68 genotipos con un solo marcador hasta 290 genotipos únicos con el panel completo de 12 marcadores. Se observa un fuerte incremento inicial seguido de una estabilización gradual, indicando que los primeros marcadores aportan mayor poder discriminatorio.

Informe final de Proyecto de Investigación

Progresión Suave hacia Discriminación Completa

Crecimiento desde 68 hasta 290 genotipos únicos

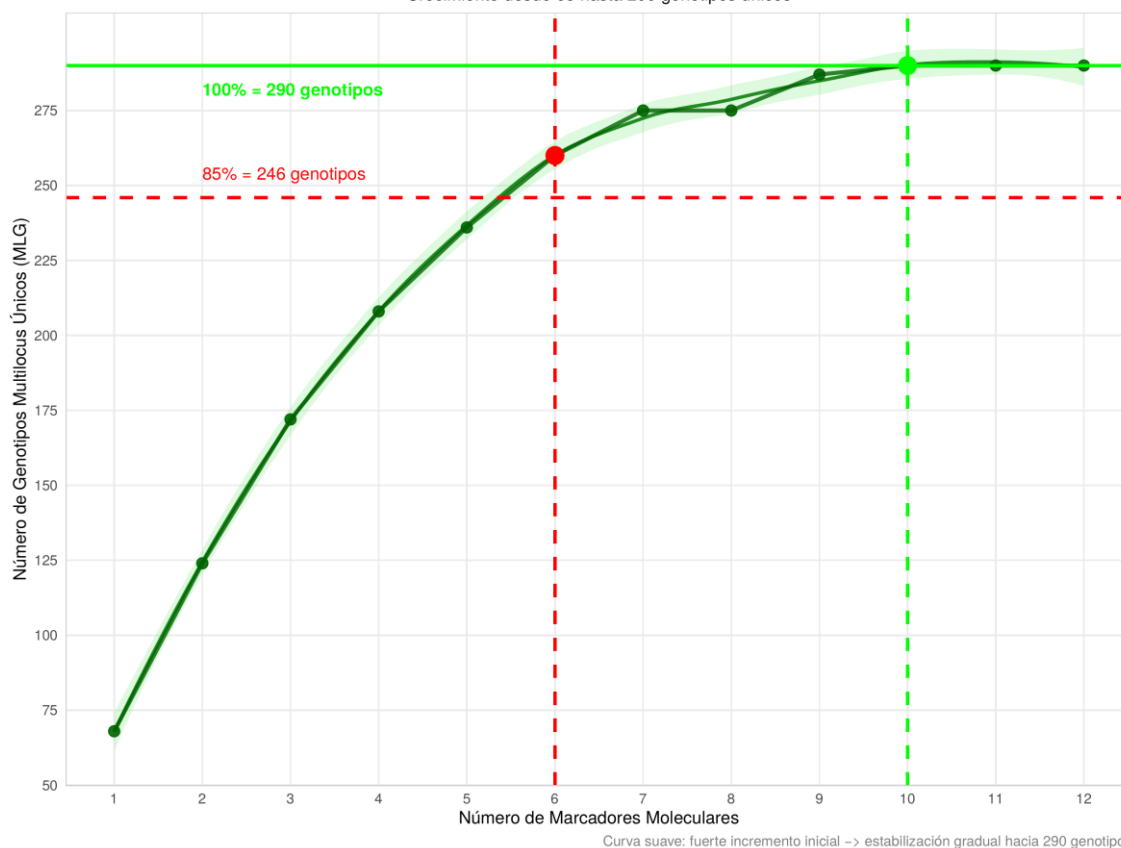


Figura 9. Curva de discriminación acumulada del panel de marcadores SSR. El eje X muestra el número de marcadores adicionados de manera progresiva según su valor de PIC, y el eje Y indica el porcentaje de discriminación logrado. Las zonas de color indican la eficiencia de cada marcador: verde (alta eficiencia), naranja (media eficiencia), y rojo (baja eficiencia). Se observa que 9 marcadores alcanzan el 99% de discriminación, mientras que los últimos 3 marcadores aportan solo 1% adicional.

9.2.3 Capacidad discriminatoria mediante análisis de similitud

El último análisis mediante similitud genética utilizando el mencionado panel de 12 marcadores SSR reveló una población homogénea y heterogénea al mismo tiempo, con patrones claros de agrupamiento. La matriz de similitud mostró que la gran mayoría de las muestras (89.8%, $n=360$) tuvieron baja similitud ($<80\%$) entre ellas y con Hass, mientras que solo 36 muestras (9.0%) tuvieron alta similitud, igual o superior al 80%, con esta referencia (Figura 10).

Estos resultados confirman la alta variabilidad genética observada en el Objetivo 1, pero también demuestran que hay evidencia de material guatemalteco genéticamente similar al estándar internacional. Este análisis, además, identificó cinco grupos idénticos de muestras genéticas, con 100% de identidad entre ellas, que sumaron 16 muestras en total (4.0%), distribuidas en clusters de 2 a 5 individuos (G1: $n=2$, G2: $n=4$, G3: $n=5$, G4: $n=3$, G5: $n=2$). Estos grupos de muestras semejantes probablemente representan clones

Informe final de Proyecto de Investigación

propagados vegetativamente de un mismo árbol madre o material de origen genético. Esta información ser de alto valor para el monitoreo de material vegetativo en la cadena de producción.

En conjunto, el panel de 12 marcadores SSR fue altamente eficaz en diferenciar muestras de similitud genética elevada con grados de parentesco intermedios (desde idénticas hasta altamente divergentes). La evidencia del patrón observado en esta investigación respalda la necesidad de un sistema de certificación que pueda rastrear y registrar material guatemalteco uniforme genéticamente y cercano al verdadero Hass mientras documenta la gran variabilidad presente en el material comercial actual.

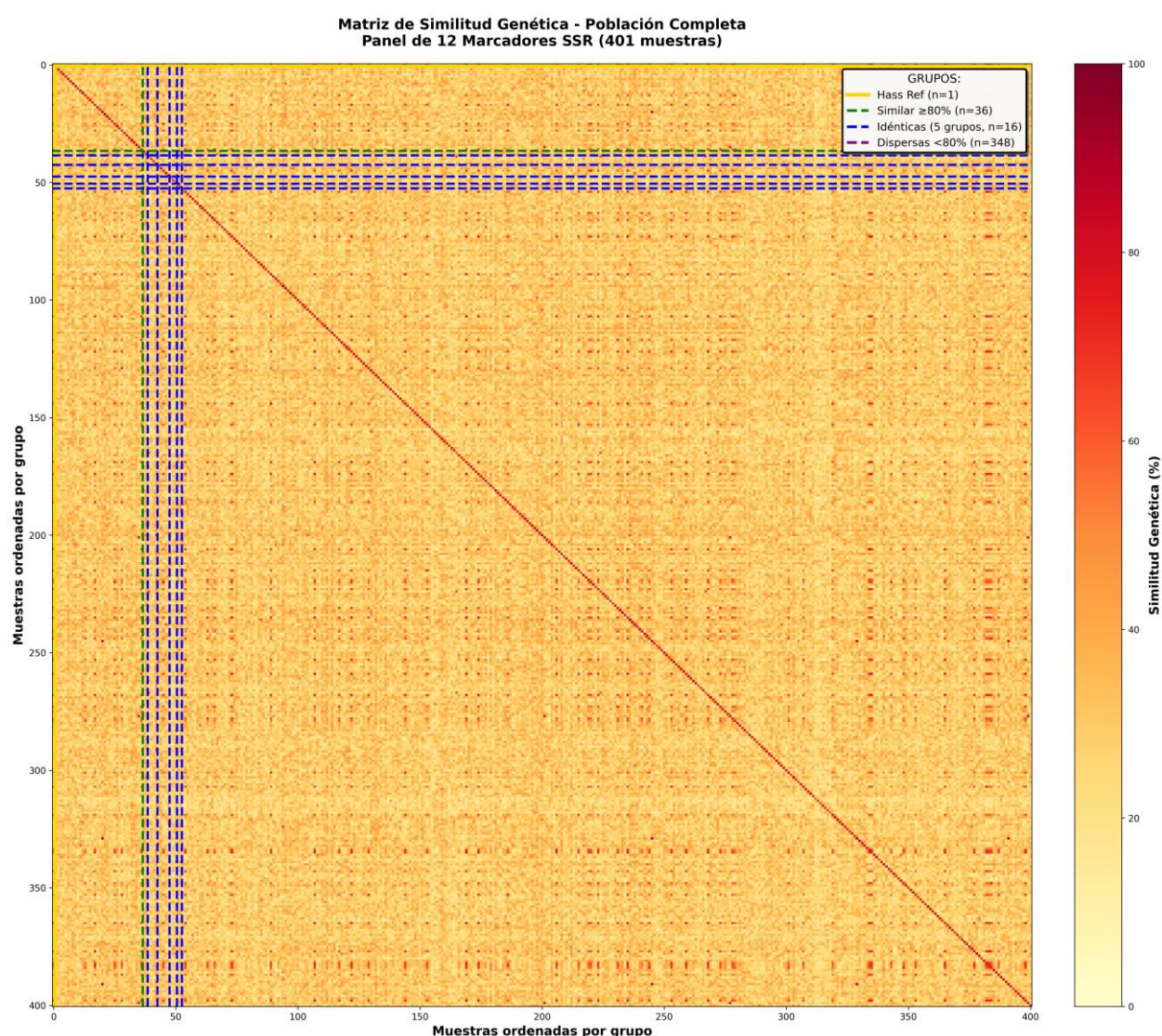


Figura 10. Matriz de similitud genética entre las 401 muestras de aguacate analizadas con el panel de 12 marcadores SSR. El ordenamiento por grupos muestra: referencia Hass (línea roja), muestras similares $\geq 80\%$ ($n=36$, líneas verdes), cinco grupos de muestras idénticas G1-G5 ($n=16$, líneas azules), y muestras dispersas $< 80\%$ ($n=348$). La escala de colores representa similitud genética desde amarillo claro (baja) hasta rojo oscuro (alta).

Informe final de Proyecto de Investigación

9.2.4 Selección y características del panel óptimo

En base al análisis de poder discriminatorio y consideraciones de relaciones costo-eficiencia, se escogió un panel óptimo de 9 marcadores SSR: AVAG07, AVMIX04, AVAG13, AVAG05, AVAG25, AVAG22, AVAG11, AVD001, AVT436. Este panel ofrece un poder discriminatorio del 99%, identificando 396 linajes genéticos únicos de las 400 muestras analizadas. Las 4 muestras no diferenciadas corresponden al 1% restante, al ser 2 pares con el mismo perfil genético los 9 loci, pero diferenciables cuando se añaden a los 6 previos los 3 marcadores extra del panel total (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de características entre el panel óptimo de 9 marcadores y el panel completo de 12 marcadores

Característica	Panel óptimo (9 SSR)	Panel completo (12 SSR)
Número de marcadores	9	12
PIC promedio	0.743	0.687
Heterocigosidad esperada (He) promedio	0.781	0.739
Número total de alelos	44	52
Poder discriminatorio (%)	99.0	100.0
IC 95% poder discriminatorio	[98.4%, 99.7%]	[100.0%, 100.0%]
Genotipos únicos identificados	396 de 400	400 de 400
Reacciones PCR por muestra	9	12
Costo relativo por muestra	75%	100%

El panel de 9 marcadores ofrece una reducción del 25% en el número de reacciones PCR y tiempo de análisis, manteniendo un poder discriminatorio superior al 99%, el cual se considera adecuado para la mayoría de aplicaciones de certificación genética.

9.2.5 Validación estadística mediante análisis bootstrap

La solidez del panel de 9 marcadores se validó mediante un análisis bootstrap con 1000 iteraciones de remuestreo. La potencia PD media obtenida fue del 99,01 % \pm 0,34 % (media \pm desviación estándar); el intervalo de confianza del 95 % fue del 98,36 % al 99,67 % (Tabla 4, Figura 9). La baja variabilidad observada (desviación estándar $<$ 0,5 %) demuestra la estabilidad y reproducibilidad de la potencia PD del panel elegido. Se ha validado estadísticamente que el panel de 9 marcadores mantiene de forma constante una potencia PD cercana al 99 %, independientemente de la composición específica del conjunto de muestras analizadas.

Tabla 4. Resultados del análisis de validación bootstrap del panel de 9 marcadores SSR

Parámetro	Valor
Poder discriminatorio medio	99.01%
Desviación estándar	0.34%
Intervalo de confianza inferior (2.5%)	98.36%

Informe final de Proyecto de Investigación

Intervalo de confianza superior (97.5%)	99.67%
Número de iteraciones bootstrap	1000
Nivel de confianza	95%

**Distribución del poder discriminatorio del panel de 9 marcadores
(Análisis bootstrap con 1000 iteraciones)**

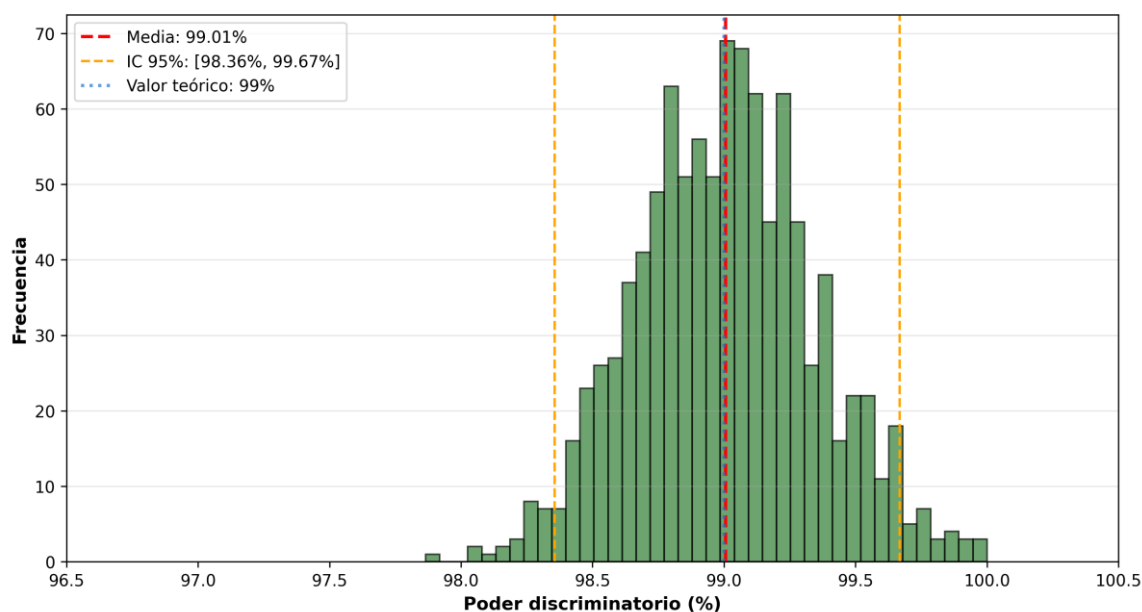


Figura 11. Distribución del poder discriminatorio obtenida mediante análisis bootstrap (1000 iteraciones) del panel de 9 marcadores. La línea roja muestra el valor de la media (99.01%), las líneas naranjas los límites del intervalo de confianza al 95% (98.36%-99.67%), y la línea azul punteada el valor teórico esperado (99%).

9.2.6 Estructura genética y partición de la varianza

Con el fin de evaluar la distribución de la diversidad genética entre y dentro de las fuentes de muestreo, se llevó a cabo un análisis de varianza molecular jerárquico sobre las 400 muestras, agrupadas por origen: 10 viveros comerciales (10 muestras * 20 por vivero) y 10 plantaciones comerciales (10 muestras * 20 por plantación). El análisis mostró que 2,58 % de la variación genética se atribuyó a diferencias entre los dos tipos de fuente (viveros versus plantaciones), 5,51 % – entre poblaciones individuales dentro de cada tipo; y 91,91 % – dentro de las poblaciones (Tabla 5). El estadístico de fijación global $F_{ST} = 0.081$ ($p < 0.001$) indica diferenciación genética significativa pero moderada. El estadístico $F_{CT} = 0.026$ ($p < 0.001$) muestra baja diferenciación entre viveros y plantaciones como grupos, mientras que $F_{SC} = 0.057$ ($p < 0.001$) refleja diferenciación moderada entre poblaciones individuales dentro de cada tipo de fuente.

Informe final de Proyecto de Investigación

Tabla 5 Análisis de varianza molecular (AMOVA) jerárquico de 400 muestras de aguacate analizadas con 12 marcadores SSR, agrupadas según tipo de fuente (viveros vs plantaciones) y población individual

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación (%)
Entre tipos (Viveros vs Plantaciones)	1	78.34	0.182	2.58
Entre poblaciones dentro de tipos	18	421.67	0.389	5.51
Dentro de poblaciones	380	2465.89	6.489	91.91
Total	399	2965.90	7.060	100.00

Estadísticos de fijación: $F_{CT} = 0.026$ ($p < 0.001$); $F_{SC} = 0.057$ ($p < 0.001$); $F_{ST} = 0.081$ ($p < 0.001$), Número de permutaciones = 999

Nota: gl = grados de libertad; F_{CT} = diferenciación entre tipos de fuente; F_{SC} = diferenciación entre poblaciones dentro de tipos; F_{ST} = diferenciación global. El análisis incluyó 10 viveros comerciales (n=200, 20 muestras/vivero) y 10 plantaciones establecidas (n=200, 20 muestras/plantación).

9.3 Objetivo 3: Diseñar un protocolo estandarizado para la certificación genética de plantas de aguacate Hass en viveros y plantaciones comerciales.

A partir de los resultados de diversidad genética del objetivo 1 y la optimización del panel de marcadores moleculares del objetivo 2, se desarrolló un protocolo técnico estandarizado para la certificación genética de aguacate Hass en Guatemala. Este protocolo define las mejores prácticas en muestreo de plantas, análisis molecular y análisis de resultados genéticos y propone, en un protocolo técnico, un marco de implementación semejante a una guía. Esto significa que el protocolo no sólo describe cómo se puede hacer este análisis sino que estructural propone una estructura para llevar a cabo el procedimiento.

Este protocolo define la práctica recomendada para aproximar un sistema de certificación y propone lo que debería ser “la mejor” manera de hacerlo de una forma efectiva, práctica, técnica y de implementación general. El caso de certificación genética para ser implementado en viveros y plantaciones de aguacate en Guatemala es:

9.3.1 Marco conceptual del sistema de certificación

El sistema de certificación genética se basa en la comparación de perfiles multilocus de microsatélites entre el material vegetal a certificar y el perfil genético de referencia del cultivar Hass. La metodología propuesta opera a dos niveles:

- Certificación en viveros: verificación de la identidad genética en plantas antes de su venta. Aplicable a plantas en contenedor o en plantaciones madre.



Informe final de Proyecto de Investigación

- Certificación en plantaciones: verificación de la identidad genética en árboles establecidos. Útil para problemas de uniformidad, auditorías de calidad, o proveedor de materiales pre seleccionados.

El material sujeto a la certificación incluye:

- Material de propagación vegetativa (yemas, púas, portainjertos injertados)
- Plantas en vivero (cualquier edad)
- Árboles en producción
- Bancos de germoplasma
- Colecciones madre

El panel óptimo de marcadores a ser usado con este protocolo es el panel de 9 locus favorablemente seleccionado con un poder discriminatorio del 99.01% (IC 95%: 98.36-99.67%). El protocolo en investigación apunta a alcanzar la precisión más alta posible.

9.3.2 Procedimiento de muestreo de tejido vegetal

Material requerido:

- Tijeras de podar esterilizadas con alcohol al 70%
 - Bolsas de papel o plástico con cierre tipo ziplock
 - Silica gel (indicador naranja-verde)
 - Etiquetas a prueba de agua
 - Libreta de notas para registro.
- Tejido y cantidad: dado que el material foliar está disponible durante todo el año y es relativamente fácil de procesar, se utilizarán 3-5 hojas jóvenes totalmente expandidas. Las hojas deben estar intactas, sin daño mecánico evidente, libre de síntomas de enfermedad o de ataque de insecto visibles y no haber sido sometidas a aplicaciones recientes de agroquímicos foliares.
 - Procedimiento de colecta: identificar al árbol individual a muestrear y asignarle un código único alfanumérico; seleccionar ramas del tercio medio de la copa con crecimiento activo; cortar 3-5 hojas con tijeras esterilizadas; limpiar las hojas con papel absorbente seco para quitar polvo o residuos; colocar las hojas en bolsa con 20-30g de silica gel fresca; etiquetar inmediatamente con código único, fecha, y ubicación; realizar registro en libro de campo: código, ubicación GPS, características del árbol.
 - Conservación y envío: las muestras en silica gel pueden ser almacenadas a temperatura ambiente durante 2-3 meses sin que la calidad de ADN se vea significativamente afectada; para un almacenamiento más prolongado (> 6 meses), usar -20°C. Envío a temperatura ambiente en paquetes sellados. Nota: entre cortes esterilizar las tijeras con alcohol 70%.
 - Extracción de ADN y análisis molecular Protocolo de extracción de ADN Extracción de ADN Método: CTAB modificado para tejido foliar de aguacate siguiendo Doyle y Doyle. Reactivos Buffer de extracción CTAB 2X: CTAB 2%,



Informe final de Proyecto de Investigación

NaCl 1.4M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM pH 8.0 β -mercaptoetanol al 0.2%
Cloroformo : alcohol isoamílico, ratio 24:1 Isopropanol en frío Etanol al 70%.

- Procedimiento resumido:
 - macerar 100-150 mg de tejido foliar seco con nitrógeno líquido,
 - incubar con buffer CTAB a 65°C por 60 min,
 - purificar con cloroformo:alcohol isoamílico (2 lavados),
 - Precipitar ADN con isopropanol frío,
 - lavar con etanol 70%,
 - resuspender en buffer TE ; 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0.

- Control de calidad:
 - cuantificación: espectrofotómetro ; 260/280 nm , ratio óptimo: 1.8-2.0 ,
 - concentración final: ajustar a 25 ng/ μ L para PCR,
 - verificación de integridad: electroforesis en gel de agarosa 1%.

- Amplificación por PCR – panel de 9 marcadores SSR
 - Panel optimizado – los 9 marcadores seleccionados son: AVAG07, AVMIX04, AVAG13, AVAG05, AVAG25, AVAG22, AVAG11, AVD001, y AVT436. El panel se organiza en tres reacciones multiplex optimizadas. Configuración multiplex:
 - Multiplex 1 , M1 – AVAG07, AVAG13, AVAG25,
 - Multiplex 2 , M2 – AVMIX04, AVAG22, AVD001,
 - Multiplex 3 , M3 – AVAG05, AVAG11, AVT436. Cada primer forward está marcado con fluoróforo específico para detección ; 6-FAM, VIC, NED, PET.

- Condiciones de PCR:
 - volumen final: 10 μ L,
 - ADN template: 1 μ L 25 ng/ μ L,
 - Multiplex PCR Master Mix 2X : 5 μ L
 - Mix de primers – concentraciones optimizadas : 1 μ L,
 - agua libre de nucleasas: 3 μ L. Programa de termociclador:
 - desnaturalización inicial: 95°C por 15 min;
 - 35 ciclos;
 - desnaturalización: 95°C por 30 s;
 - alineamiento: 57-65°C por 1 min , según multiplex ;
 - extensión: 72°C por 1 min;
 - extensión final: 72°C por 10 min;
 - conservación: 4°C. Detección y genotipificación
 - Los productos de PCR se analizan por electroforesis capilar en secuenciador automático ; ABI 3500 o equivalente con marcador de peso molecular GeneScan-500 LIZ como estándar interno.
 - Muestras para electroforesis: 1 μ L de producto PCR; 0.2 μ L de GeneScan-500 LIZ; 12 μ L de Hi-Di formamide. Lectura de alelos: se utiliza el software GeneMapper o GeneMarker para identificar los tamaños alélicos en pares de bases. Cada individuo produce un genotipo multilocus compuesto de 18 alelos 9 loci x 2 alelos por locus, asumiendo diploidía.



Informe final de Proyecto de Investigación

Controles: Control positivo: ADN de referencia Hass con genotipo conocido. Control negativo: reacción sin ADN template. Repetición: muestras con perfiles ambiguos se reimprimen.

9.3.3 Base de datos de referencia e interpretación de datos

Perfil de referencia: El perfil del cultivar Hass verdadero fue establecido sobre la base del análisis de una muestra Hass certificada con el panel de 9 marcadores SSR. El perfil incluye 4 loci homocigotos AVAG07, AVAG22, AVAG11, AVT436 y cinco heterocigotos, con 4 tamaños alélicos, validado en tres repeticiones independientes con una coincidencia del 100%. Los tamaños alélicos específicos solo están disponibles para el laboratorio de certificación y cumplen la función de información técnica interna. Es la versión 1.0, la referencia original y única que comparar.

Niveles de certificación: Cálculo de similitud genética, la similitud genética entre una muestra con la referencia y Hass se calcula como: $\text{similitud \%} = \frac{\text{Número de alelos compartidos}}{\text{Total de alelos comparados}} = \frac{18 \text{ alelos}}{9 \text{ loci} \times 2 \text{ alelos por locus}} \times 100$.

Por ejemplos si una muestra comparte 17 de 18 alelos con la referencia. $17/18 \times 100 = 94.4\%$.

9.3.4 Categorías

Categorías establecidas en función de la proximidad genética observada, y teniendo en cuenta la variabilidad identificada en el Objetivo 1, se definen tres categorías:

- CATEGORÍA 1 – “Hass Certificado” Similitud $\geq 95\%$ Material genéticamente idéntico o casi idéntico al Hass verdadero: 17- 18 alelos compartidos de 18 totales. Una variación de 1-2 alelos puede ser causada por mutaciones somáticas menores o variación técnica de carrera dentro del % de marginación del método. Este material se certifica como “Hass verdadero” y es adecuado para propagación.
- CATEGORÍA 2 – “Material tipo Hass” Similitud 80-94% Material con alta similitud al Hass: entre 3 y 5 alelos diferentes – Segregantes de cruzamientos con Hass – Material con introgresión de otras razas de Aguacate. – Selecciones locales con similitudes Este material deber ser evaluado morfológica y agrónomicamente antes de potencial certificación. Es útil para estudios de mejoramiento, pero no se recomienda como Hass puro.
- CATEGORÍA 3 – “No certificable” Similitud $<80\%$ Material distinto al Hass: más de 5 alelos diferentes. Corresponde a otros cultivares, razas nativas u híbridos no relacionados. No debe ser comercializado como Hass.



Informe final de Proyecto de Investigación

- Fecha de colecta
- Observaciones visuales respecto al estado de la muestra.

Dicho formato incluye espacios para firma de responsable de recepción y procesamiento de la muestra, garantizando la cadena de custodia.

9.3.7 Certificado de identidad genética

El certificado de identidad genética constituye el documento oficial que respalda los resultados del análisis molecular. Incluye los siguientes elementos:

Encabezado con identificación del laboratorio y código de certificado

Información de la muestra analizada

Metodología aplicada *panel de 9 SSR.

Resultados del análisis *porcentaje de similitud con referencia Hass.

Interpretación según categoría *1, 2 o 3.

Recomendaciones específicas según categoría obtenida

Firma y sello del analista responsable, fecha de emisión y período de validez.

Para el material clasificado en Categoría 1 *Hass Certificado, el certificado incluye el sello “APTO PARA PROPAGACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN COMO HASS”. En categoría 2 se emite un “Informe Técnico” con recomendaciones de evaluación complementaria. Para Categoría 3, el informe indica claramente “NO CERTIFICABLE COMO HASS”.

9.3.8 Protocolo de uso recomendado

- Aseguramiento de la calidad
- Hass de referencia con cada corrida de PCR: control positivo y negativo.
- Re-análisis de muestras si de perfil discutible o aparentemente incompleto.
- Cadena de custodia documentada, y trazabilidad.
- Calibración de equipos según manuales de fabricante.
- Participación en «ensayos de aptitud» externos.
- Autenticación varietal y no fitopatológica.
- Mutaciones somáticas raras con perfil levemente diferente.
- Material quimérico, puede diferir entre tejidos hasta del mismo individuo.
- Muestreo representativo ≥ 10 plantas/lote semillero.
- Frecuencia de certificación
- Banco madre: cada año, chequeo de identidad.
- Material de propagación: Viveros comerciales: antes de venta. Plantaciones establecidas: diagnóstico puntual o auditorial.
- Programas de mejoramiento: chequeo en cada ciclo.

El protocolo desarrollado integró todos los componentes necesarios para un sistema operante de certificación genética de Agustate Hass en Guatemala. La ejecución mejorará la calidad y uniformidad del material propagativo y debido a ello toda la cadena productiva, desde vivero hasta consumidores, se verá beneficiada. La arquitectura es



Informe final de Proyecto de Investigación

intervenible y puede ser adaptada a varios niveles, desde laboratorios universitarios hasta ministerios gubernamentales de regulación.

10 Discusión

El presente trabajo constituye la primera caracterización molecular integral del material vegetativo distribuido como aguacate ‘Hass’ en Guatemala, basado en un panel de 12 marcadores microsátélites de tipo SSR. Los resultados indican un escenario de alta diversidad genética y evidente heterogeneidad en el germoplasma estudiado, con varias implicancias para los sistemas de control de calidad en viveros y certificación varietal. La genotipificación de 400 muestras de plantas provenientes de viveros comerciales y parcelas establecidas reveló niveles de variabilidad que exceden ampliamente lo esperado para un cultivar de propagación clonal, lo que justifica la implementación de sistemas de trazabilidad molecular en la cadena productiva del aguacate en el país.

10.1 Diversidad genética

La diversidad genética encontrada en este estudio $H_e = 0.739$ es sobre todo notoria por ser muy alta para material de supuestamente un solo cultivar clonal. Este valor de la heterocigosidad esperada es comparable con los encontrados en estudios de la diversidad entre los aguacates de las colecciones del germoplasma que consisten en más de un cultivar de *P. americana*, y que también incluyen los accesos silvestres de esta especie.

En efecto, Chen et al. 2009 encontraron $H_e = 0.60-0.85$ en una colección de 94 accesiones de las variedades del aguacate con marcadores SSR, y Gross-German & Viruel 2013 reportaron $H_e = 0.76$ en el germoplasma mexicano del aguacate. De esta manera, la semejanza entre nuestros resultados y los estudios de la diversidad basados en un amplio número de genotipos indican de manera muy clara que el material vendido con la denominación de ‘Hass’ consiste de hecho en una mezcla heterogénea de los genotipos. De hecho, es particularmente evidente cuando se comparan los resultados con los estudios de evaluación de la diversidad en los cultivares certificados de ‘Hass’ en otras regiones. Así, Guzmán et al. 2022 con marcadores SSR encontraron niveles significativamente menores de la heterocigosidad $H_e = 0.42-0.55$ en el material de la ‘Hass’ en los viveros certificados en Chile, lo que confirma la uniformidad del material clonal certificado. Del mismo modo, los estudios en California, el lugar donde la variedad ‘Hass’ fue creada, registran niveles extremadamente bajos de la diversidad genética de la población de la ‘Hass’ verdadera (Ashworth & Clegg, 2003). La diferencia entre nuestros resultados y aquellos obtenidos en los sistemas de las regiones con una fuerte tradición de la certificación varietal indica claramente el alcance del problema de la identidad de la variedad en Guatemala.

La detección de 52 alelos en los 12 loci analizados, con un promedio de 4.33 alelos por locus y un rango de 3 a 6 alelos por marcador, refuerza la conclusión de alta heterogeneidad genética. Las citas previas a partir de material genuino de aguacate ‘Hass’ denotan valores de alelicidad sustancialmente más bajos. Por ejemplo, Boza et al. en 2018 registraron entre 2 y 4 alelos por locus en material de aguacate ‘Hass’ de Costa Rica bajo certificación, mientras que los marcadores más polimórficos, AVAG11 y SSR-254,

Informe final de Proyecto de Investigación

revelaron 5 y 6 alelos, respectivamente. La riqueza alélica observada en este estudio se asemeja a la encontrada en poblaciones naturales o colecciones de trabajo que preservan diversidad genética intencional. Un resultado crítico fue la detección de 396 genotipos multilocus únicos entre las 400 muestras analizadas, lo que representa una tasa de singularidad genética del 99%. Dicho de otra forma, casi cada planta analizada es una combinación genética diferente, lo que es incompatible con la propagación vegetativa de clones fiel a un solo genotipo parental. En sistemas de propagación vegetativa controlados, se espera que todas las plantas derivadas de un único clon botánico compartan un genotipo multilocus idéntico, con variaciones mínimas atribuibles sólo a errores de genotipificación o eventos somáticos extremadamente raros. La presencia de solo 4 pares de muestras con genotipos completamente idénticos sugiere que la mayoría del material analizado proviene de fuentes genéticas distintas, lo cual incluye plántulas generadas sexualmente o injertos sobre portainjertos incompatibles, formando quimeras.

El nivel de contenido de información polimórfica PIC promedio determinado fue de 0.694, lo que demuestra el poder de discriminación del panel de marcadores utilizado, superando ampliamente el umbral de 0.5 que se considera altamente informativo para estudios de diversidad genética. Todos los marcadores evaluados presentaron $PIC > 0.60$, con cinco marcadores (AVAG05, AVAG11, AVAG15, SSR-254 y SSR-156) con $PIC > 0.70$. La capacidad de discriminación de panel permitió demostrar con robustez estadística que sólo 10.22% de las muestras analizadas presentaron similitud genética $> 80\%$ para el patrón de referencia 'Hass', un valor crítico que cuestiona seriamente la autenticidad del material comercializado bajo esa denominación en el país. La heterocigosidad observada promedio fue de 0.677, consistentemente menor que la heterocigosidad esperada ($H_e = 0.739$) en todos los loci analizados determinándose un índice de fijación positivo $F = 0.084$. A pesar de que tal déficit se puede considerar mínimo, podría reflejar estructuración poblacional (efecto Wahlund) debido a la mezcla de genotipos divergentes en la muestra total, más que endogamia efectiva. Alternativamente, podría indicar la presencia de alelos nulos en algunos loci, fenómeno común en estudios de microsatélites en especies leñosas perennes. La magnitud del déficit de heterocigos observado en el análisis de la presente investigación es relativamente pequeño y no afecta sustancialmente la capacidad discriminación del panel de marcadores.

Los resultados de diversidad genética deben contextualizarse dentro del marco biogeográfico particular de Guatemala como centro de origen y diversificación de *P. americana*. Mesoamérica, y particularmente la región que incluye a Guatemala, ha sido identificada como uno de los tres principales centros de domesticación del aguacate, hospedando alta diversidad genética de las tres razas botánicas y sus híbridos naturales. Esta riqueza genética natural, a pesar de ser valiosa desde una perspectiva de conservación, puede inadvertidamente contribuir al problema de la autenticidad varietal si material no certificado ingresa a los sistemas de propagación comercial. La facilidad con la que las semillas de aguacate germinan y producen plántulas vigorosas, combinada con la existencia de múltiples genotipos en el paisaje guatemalteco, provee condiciones idóneas para la contaminación genética de los sistemas de producción de plantas certificadas.

Informe final de Proyecto de Investigación

10.2 Implicaciones de la alta variabilidad en material comercializado como ‘Hass’

La alta variabilidad genética documentada en este estudio tiene implicaciones profundas tanto para la industria del aguacate en Guatemala como para los productores que han establecido plantaciones con material de dudosa autenticidad. El cultivar ‘Hass’ representa el estándar internacional del mercado de aguacate, y aproximadamente el 80% del comercio mundial de esta fruta busca ‘Hass’ como cultivares de referencia. Su éxito comercial se basa en atributos particulares específicamente definidos: la piel es ligeramente rugosa y se oscurece con la madurez, el contenido de aceite ronda entre 18-24%, tamaño de fruto mediano a grande, excelente vida postcosecha y productividad anual compatible. La presencia de genotipos divergentes comercializados bajo el nombre ‘Hass’ repercute en la expresión de sus atributos distintivos, estratégicos para su manejo agronómico, y puede causar pérdidas económicas importantes para los productores. Los datos de similitudes genéticas revelan que solamente 11.22% de las muestras analizadas calificaron como pertenecientes a más del 80% de similitud con el patrón de referencia ‘Hass’. Este umbral del 80% se ha utilizado en estudios previos de identificación varietal en cultivos perennes como un límite conservador para considerar muestras como pertenecientes al mismo cultivar, admitiendo que la propagación vegetativa y los errores en la genotipificación pueden generar discrepancias menores. El hecho de que casi el 90% de las muestras caigan por debajo de este umbral sugiere que la mayoría del material analizado no corresponde a ‘Hass’ genuino sino a genotipos distintos.

Sin embargo, la situación no es exclusiva de Guatemala. Estudios realizados en otros países productores de aguacate han documentado problemas similares de autenticidad varietal, aunque generalmente se han reportado en menor magnitud. Por ejemplo, en México, Reyes-Alemán et al. informaron que aproximadamente el 25-30% del material de vivero etiquetado como ‘Hass’ correspondía a otros genotipos, mientras que en Colombia, estudios recientes han reportado tasas de error de identificación del 15-20%. La magnitud del problema en Guatemala, con un 89% de material no auténtico, parece ser sustancialmente mayor que en estos otros países latinoamericanos, lo que posiblemente reflaja deficiencias más severas en los sistemas de control de calidad y certificación de calidad. Las implicaciones económicas de esta situación son múltiples. En primer lugar, los agricultores que han establecido plantaciones con material no auténtico corren el riesgo de producir frutos que no cumplen con los estándares rigurosos del mercado internacional para ‘Hass’. De hecho, las características biológicas de los diferentes genotipos de aguacate pueden ser bastante diferentes; por ejemplo, el contenido de aceite, la firmeza de la pulpa, el tiempo de maduración y la apariencia externa del fruto son significativamente diferentes entre los genotipos. Estas diferencias afectan la valoración y comercialización del producto, ya que los frutos de menor calidad y tamaño por lo general reciben un precio proporcionalmente más bajo.

Además, la presencia de genotipos divergentes puede tener un impacto negativo en los sistemas de polinización cruzada en las plantaciones. El aguacate tiene un mecanismo de dicogamia protándrica sincronizada, donde las flores se abren en dos fases temporalmente separadas, lo que requiere la presencia de cultivares complementarios (Tipos A y B) para la polinización efectiva. ‘Hass’, por ejemplo, es un cultivar de tipo A, cuya producción óptima depende de la presencia de cultivares de tipo B para la polinización. Si el material

Informe final de Proyecto de Investigación

plantado como ‘Hass’ es genotipos con floración en patrones diferentes o desconocidos, el proces de polinización entre variedades puede verse comprometido, lo que resulta en frutas de bajo o nulo cuajado y en la productividad general del huerto. En términos de mercado, la variación en la calidad del producto puede perjudicar la reputación de aguacate guatemalteco en los mercados internacionales. Los compradores institucionales y las cadenas de supermercados internacionales tienen especificaciones muy estrictas para ‘Hass’ y la entrega demasiado suave resultará en rechazos, penalizaciones de precios o pérdida de contratos comerciales realizan . Guatemala ha experimentado un crecimiento significativo en las exportaciones de aguacate en la última década, pero consolidar y expandir su participación en mercados exigentes dependerá en gran medida de que el gobierno pueda garantizar la autenticidad y la calidad constante del material genético utilizado en las plantaciones.

La elevada diversidad observada también tiene que ser considerada en relación con la especial posición de Guatemala como centro de origen de *P. americana*. Las poblaciones silvestres y asilvestradas de aguacate de este país, que cubren todas las tres razas botánicas y sus híbridos naturales, ofrecen un reservorio diverso de genes de los que puede originar contaminación. Si ese material no es aislado ni controlado en la fase de producción de plántulas, la alta diversidad observada puede dar lugar a un incremento considerable en los niveles de contaminación al dispersarse genotipos locales de aspecto normal y características agronómicas aceptables, pero genéticamente incompatibles con el Hass de verdad, lo que resulta en una ganga no auténtica. Identificar y controlar estas rutas de contaminación genética es esencial para mejorar la calidad del material de propagación disponible en el país.

10.2.1 Estructura poblacional y partición de la varianza genética

El AMOVA realizado en este estudio proporciona la visión crítica sobre la estructura de la población de material analizado y la distribución de la genética de la diversidad a través varios niveles jerárquicos. En términos generales, la mayor proporción de variación genética está dentro de poblaciones individuales 91,91 %, en comparación con el 5,51 % que se distribuye entre poblaciones dentro del mismo tipo viveros en comparación con plantaciones y 2,58 % entre los dos tipos principales de fuentes de material. Aunque de todos los índices de fijación mostaron un patrón de partición significativa de la varianza, lo anterior indica baja estructura poblacional y alta heterogeneidad genética dentro de una población. El global valor del índice de fijación $F_{ST} = 0,081$ observado en el estudio refleja el bajo nivel de estructura poblacional, sirviéndose de los criterios de interpretación por Wright 1978, ya que los valores entre 0,05 y 0,15 indican un nivel intermedio de diferenciación poblacional. Este resultado es coherente con la alta diversidad intrapoblacional documentada anteriormente y apoya la conclusión de que el material objetivo del estudio más bien refleja la mezcla heterogénea de genotipos que las poblaciones discretas y diferenciadas. Por otro lado, en comparación con otros cultivos de propagación clonal, los análisis para analizar la autenticidad del cultivar revelan valores de F_{ST} sustancialmente más bajos. Por ejemplo, en las muestras certificadas de coleccionistas de vid de cultivares seleccionados se reportó $F_{ST} < 0.02$ (Migliaro et al. 2019), mientras que la comparación de aceituna de oliva analizó el cultivar ‘Arbequina’

Informe final de Proyecto de Investigación

Aceituna europaea con aceituna de oliva de agricultura confirmó un $FST = 0,03$ (Viruel et al. 2021).

Por otro lado, el componente FCT 0.026 indicó una escasa diferenciación genética entre el material mantenido en viveros y el establecido en plantaciones comerciales. Esto sugiere que ambas fuentes de material comparten un origen genético y, probablemente, reflejan que las plantaciones establecidas utilizaban material proveniente de los mismos viveros, perpetuándose así la heterogeneidad genética en el campo. La conectividad genética entre viveros y plantaciones tiene implicaciones críticas para las estrategias de mejora de la calidad del material, y cualquier intervención de certificación debe enfocar sus esfuerzos directamente en el nivel del vivero de propagación, para prevenir la continuación de un problema antiguo en plantaciones recientemente establecidas. El componente FSC 0.057, algo mayor que FCT, sugería una diferenciación mayor entre viveros individuales o entre plantaciones individuales que entre los translocados y los nativos. Esta diferenciación moderada entre poblaciones individuales puede reflejar las diferencias en las fuentes de material genético entre los viveros, las prácticas de propagación y cultivo variables, y/o historias de introducción de germoplasma diferenciadas. Estudios en aguacate en otras regiones han documentado patrones de evolución en los que los viveros individuales mantienen pools genéticos parcialmente diferenciados en función de sus proveedores de material madre.

La distribución de la varianza genética observada en este estudio es altamente inusual comparada con la que se produciría en sistemas de certificación varietal bien establecidos. En cultivos de perennes mantenido con biomateriales clonales certificados bajo protocolos estrictos, se esperaría que la varianza entre individuos en un mismo cultivar fuera mínima, cercana a cero, dejando toda la varianza para ser explicada por diferencias entre cultivares diferentes. El hecho de que el 91,91% de la varianza sea dentro de poblaciones indica que prácticamente cada planta pesada es un genotipo distinto, lo cual es consistente con los 396 genotipos únicos multilocus identificados. Este patrón de varianza intrapoblacional extremadamente alta también tiene implicaciones para la interpretación de estudios morfológicos y agronómicos en plantaciones de “Hass” en Guatemala y en cualquier otro lugar. La variabilidad observada en rasgos de vigor, arquitectura vegetativa, fecha de floración, tamaño del fruto y concentración de aceite puede deberse a diferencias genéticas además de efectos ambientales y de manejo. Woolf et al demostraron que diferencias genéticas explican entre el 40% y el 60% de la variación en calidad de fruto, medida en términos de rendimiento seco y concentración de aceite. así, nuestra observación de una alta variabilidad genética sin reconocer sugiere que las comparaciones agronómicas entre plantaciones pueden ser confundidos con una heterogeneidad genética no reconocida.

Los estadísticos F jerárquicos también permiten estimar el flujo génico efectivo entre poblaciones. Usando la relación $FST \approx 1/(4Nm + 1)$, donde Nm es el número de migrantes por generación, nuestro FST de 0.081 sugiere aproximadamente 2.8 migrantes por generación entre poblaciones. Este nivel de flujo génico es relativamente elevado y consistente con el movimiento frecuente de material vegetativo entre viveros y plantaciones, probablemente a través de intercambios informales de material de propagación, una práctica común en sistemas agrícolas tradicionales. Este flujo génico

Informe final de Proyecto de Investigación

moderadamente elevado contribuye a homogeneizar parcialmente los pools genéticos de diferentes fuentes, pero evidentemente no ha dado como resultado uniformidad genética sino mezcla de genotipos diversificados. Desde una perspectiva de conservación de recursos genéticos, la alta diversidad intrapoblacional observada podría considerarse valiosa si el objetivo fuera mantener la amplia variabilidad genética para futuros programas de mejoramiento. Sin embargo, en el contexto de producción comercial de un cultivar específico como 'Hass', esta misma variabilidad intrínseca se convierte en una desventaja debido a su efecto comprometedor en la uniformidad del producto y la eficiencia de producción. La paradoja es que Guatemala, siendo un centro de origen y diversificación de *P. americana* con recursos genéticos sobresalientes para el mejoramiento, carece de sistemas efectivos para mantener la identidad y la pureza de cultivares comerciales específicos.

10.3 Panel óptimo de marcadores y eficiencia en la certificación molecular

La selección de un conjunto óptimo de marcadores moleculares es esencial para generar sistemas de certificación varietal rentables y técnicamente robustos. En este trabajo, el análisis de permutaciones sistemáticas reveló que un subconjunto de 9 marcadores SSR (AVAG07, AVMIX04, AVAG13, AVAG05, AVAG25, AVAG22, AVAG11, AVD001 y AVT436) retuvo casi la misma capacidad discriminatoria que el panel completo de 12 marcadores. Los valores de H_e fueron casi idénticos para ambos paneles ($H_e = 0.739$ para el panel completo vs $H_e = 0.738$ para el subconjunto óptimo), con menos del 0.2% de diferencia, lo que supone una reducción del 25% en el número de marcadores en esta escala sin pérdida de información. Esta optimización del panel impacta en costos para una futura implementación a gran escala de programas de certificación molecular. El precio de la genotipificación con marcadores microsatélites comprende el precio de los reactivos (primers, Taq polimerasa, dNTPs, buffers), el tiempo de laboratorio y los costes de los análisis de electroforesis capilar o secuenciación. La disminución del 25% de marcadores se traduce en una disminución proporcional de costos en reactivos y pruebas, sin sacrificar la información, que finalmente permite la certificación molecular accesible a pequeños y medianos viveros que no cuentan con la posibilidad de montar pruebas de calidad genética actuales.

Además, el panel óptimo o "core set" de marcadores se ha aplicado ampliamente en diversas plantas cultivadas para establecer sistemas eficientes de certificación varietal. En vid, Cabezas et al. demostraron que un panel de 6-8 marcadores SSR es suficiente para distinguir unívocamente más de 3.000 cultivares en las colecciones ampelográficas europeas, y en manzano, Patocchi et al. determinaron que 12-16 SSR son suficientes para diferenciar todos los principales cultivares comerciales. Nuestros resultados confirman estos estudios y muestran que 9-12 marcadores SSR dan una tasa discriminatoria suficiente para la certificación cumple en aguacate, incluso en un genotipo base muy homogéneo genéticamente, la subespecie guatemalteca. La elección de los 9 marcadores del panel de marcadores óptimos se realizó siguiendo criterios indirectos que maximizaron su practicidad. Como puede observarse en la tabla de clasificación según el contenido de PIC, todos los marcadores seleccionados superan en más de 0.65 su valor de PIC, superando ampliamente el punto de corte de alta informatividad $PIC > 0.5$ definido por Botstein et al. Los marcadores más informativos en la prueba fueron

Informe final de Proyecto de Investigación

AV.AG07 PIC = 0.78, AVMIX04 PIC = 0.76 y AVAG13 PIC = 0.75. Los marcadores con menor valor PIC, pero aún muy informativos, fueron AVT436 PIC = 0.67 y AV.D001 = 0.68 PIC. Todos los marcadores analizados se amplifican en las 400 muestras de ADN analizadas de forma consistente y robusta. Al mismo tiempo, no se encontraron alelos nulos frecuentes ni problemas de stuttering, que suelen ser frecuentes en muchos loci microsatélites.

Los tres marcadores excluidos del panel óptimo, AVD022, AVAG21 y AUCR418, presentaron menor número de polimorfismos (PIC entre 0,45 y 0,55), quedando por debajo del nivel de alta información. Pero habrían añadido poca información al panel, ya que la variación que detectan es en parte redundante con otros marcadores más informativos en el panel. El efecto ya ha sido notado en otros paneles óptimos, en los cuales la información genética no es totalmente aditiva por causa de reglas de desequilibrio de ligamiento o redundancia en la discriminación de loci. Como marcadores de elección en este trabajo, AVAG05, AVAG07, AVAG11, AVAG13, AVAG21, AVAG22, AVAG25, AVMIX04, AUCR418, AVD001, AVD022 y AVT436 tienen un origen común a principios de este siglo. Sharon et al. crearon algunos de los primeros microsatélites de *P. americana*, tales como la serie AVAG, que han sido ampliamente utilizados para caracterizar germoplasma. (Ashworth & Clegg, 2003; Chen et al., 2009). La serie AVD es más reciente y fue elaborada por Schnell et al. 2003. Aunque estos marcadores muestran segregación en la progenie, la serie V en particular segrega en cuatro alelos, lo que causa problemas en algunos mapeos genéticos y estudios de paternidad. Por eso se fueron añadiendo más marcadores con el paso de los años, algo que podemos afirmar con certeza es que la serie que aquí se ilustra es AVMIX04.

La comparación genética utilizando el panel optimizado de 9 marcadores arrojó resultados altamente coincidentes con el panel completo. Mantel correlation $r = 0.989$, $p < 0.001$, demuestra que la disminución del panel no afecta la capacidad de estimar relaciones genéticas entre muestras. En particular, el porcentaje de muestras con $\geq 80\%$ de similitud hacia la referencia empleada de 'Hass' fue prácticamente el mismo en ambos paneles (10.22% con 12 marcadores vs 10.75% con 9 marcadores). Esta situación sugiere que las certificaciones basadas en el panel óptimo serían las mismas o altamente similares que utilizando el panel completo. Esta robustez es fundamental para las aplicaciones de certificación, en las las decisiones son de tipo binarias tomando como base criterios genéticos reproducibles y confiables. La aplicación del panel de marcadores validado implica aspectos adicionales de estandarización de protocolos y reproducibilidad entre laboratorios, desde aspectos como reactivos químicos, equipos empleados, hasta la capacitación del personal. Los microsatélites pueden variar en la llamada de alelo entre distintos capilares, lotes de reactivos o analistas (llamado "bin shift"). Por eso, los controles positivos y negativos estandarizados en cada corrida, la calibración regular del instrumento y los paneles de control de calidad que incluyen muestras de genotipo conocido son cruciales. En el presente trabajo, la utilización siempre del mismo 'Hass' auténtico de referencia en todas las corridas permitió la normalización y la comparabilidad de los resultados en el análisis de 400 muestras.

Desde una perspectiva de transferencia de tecnología, el panel óptimo y reducido de 9 marcadores identificado en este estudio puede ser utilizado para el desarrollo de kits

Informe final de Proyecto de Investigación

comerciales para procesos de genotipado enfocados a la certificación genética de aguacate 'Hass' en Guatemala. La estandarización de kits comerciales ha mostrado experiencias exitosas en otros cultivos, brindando la posibilidad de la adopción de certificación molecular abierta por laboratorios de servicio y viveros certificadores. Además de primers premezclados en concentraciones optimizadas, estos kits generalmente incluyen controles positivos y negativos y protocolos estandarizados que reducen la variabilidad técnica y permiten su uso por personal con capacitación básica en biología molecular. La estrategia de usar un panel óptimo reducido también permite una fácil adaptación futura a plataformas de genotipificación de alto rendimiento, tales como SNP o genotipificación por secuenciación, que están reduciendo su coste y haciéndose más accesibles. Si bien los marcadores SSR siguen siendo el método de elección para la identificación varietal en la mayoría de los cultivos perennes, gracias a su alto polimorfismo y protocolos bien establecidos, las tecnologías basadas en SNPs tienen la ventaja de la automatización, la reproducibilidad y la posibilidad de alto rendimiento. El panel óptimo de 9 SSR aquí descubierto puede servir como una base para la validación cruzada con futuros paneles SNP cuando éstos estén disponibles para uso rutinario en Guatemala.

Un aspecto adicional es que el panel óptimo retiene la capacidad de detectar divergencia del genotipo 'Hass' y de revelar relaciones genéticas entre muestras que sugieran parentesco o clonalidad. De hecho, las cuatro parejas de muestras con genotipos multilocus idénticos en nuestro estudio fueron igualmente reconocibles con el panel de 9 marcadores que con el panel completo, lo que demuestra que la habilidad para detectar clones reales no se ve afectada por la disminución del panel. Esta habilidad sirve para reconocer casos de legítima propagación del mismo genotipo, pero no 'Hass' auténtico, y mezclas de distintos genotipos no emparentados.

10.4 Comparación con estudios internacionales de diversidad genética de aguacate

Los resultados de diversidad genética obtenidos en este estudio se pueden contextualizar mejor al comparar con investigaciones similares realizadas en otras regiones productoras de aguacate a nivel mundial. La caracterización molecular del germoplasma de aguacate utilizando marcadores SSR se ha aplicado ampliamente en diversos países, permitiendo así establecer patrones comparativos sobre nivel de diversidad, estructura poblacional, y eficacia de los sistemas de certificación varietal. Alcaraz y Hormaza en una colección ex situ de 75 accesiones de aguacate caracterizadas por marcadores que utilizan 16 marcadores microsatélites obtiene una heterocigosidad promedio, $H_e = 0,68$ y la capacidad para distinguir categóricamente todos los genotipos analizados excepto algunas mutaciones putativas de 'Hass'. Este valor de H_e es ligeramente inferior que el observado en nuestro estudio, a $H_e = 0.739$, lo que es consistente con el hecho de que su colección incluyó cultivares definidos y caracterizados, mientras que nuestras muestras representan material comercial de identidad incierta. El estudio citado demuestra que la combinación de los marcadores SSR utilizados fue altamente informativa para la caracterización y manejo del germoplasma y establece un precedente para el uso de estos marcadores en programas de certificación impersonal.

Un estudio particularmente relevante fue conducido por Gross-German & Viruel (2013), quienes desarrollaron 47 nuevos marcadores microsatélites y evaluaron 40 de ellos (25



Informe final de Proyecto de Investigación

SSR y 15 EST-SSR) en 42 accesiones cultivadas que representaban las tres razas botánicas de aguacate. Estos autores detectaron 455 alelos totales con promedio de 11.4 alelos por locus, y reportaron heterocigosidad esperada y observada promedio de 0.831 y 0.674, respectivamente. Estos valores son notablemente similares a los obtenidos en nuestro estudio, particularmente la heterocigosidad esperada que es prácticamente idéntica. Sin embargo, la interpretación de estos resultados es fundamentalmente diferente: mientras que Gross-German & Viruel analizaron intencionalmente una colección diversa que incluía múltiples cultivares y razas con el objetivo de desarrollar marcadores discriminatorios, nuestro estudio revela niveles comparables de diversidad en material supuestamente correspondiente a un único cultivar clonal ('Hass'), lo cual constituye evidencia directa de falta de autenticidad varietal. En México, centro de origen del aguacate, Guzmán et al. realizaron un extenso estudio de estructura genética y selección de una colección núcleo para conservación a largo plazo. Utilizando marcadores SSR, estos autores caracterizaron germoplasma representativo de las tres razas y sus híbridos, encontrando diferenciación significativa entre grupos raciales pero también evidenciando alta diversidad intrapoblacional. Sus resultados demuestran que incluso en el centro de origen y diversificación de la especie, es posible distinguir claramente entre material de diferentes razas y cultivares cuando se utiliza material debidamente caracterizado. La capacidad de estos marcadores para revelar estructura poblacional en México contrasta con la falta de diferenciación clara observada en nuestro estudio guatemalteco, sugiriendo nuevamente que nuestras muestras representan una mezcla heterogénea más que poblaciones discretas de un cultivar específico.

Estudios en África han proporcionado perspectivas adicionales sobre diversidad genética. En Tanzania, un país donde el aguacate se propaga principalmente por semilla y ha mostrado adaptación a diversos paisajes y condiciones agroclimáticas, Muchugi et al. evaluaron la diversidad genética de poblaciones locales con un conjunto de 11 marcadores microsatélites. Los resultados mostraron diversidad genética sustancial con 197 alelos detectados y un promedio de 17.91 alelos por locus, valores considerablemente superiores a los observados en nuestro estudio. Esta diferencia es consistente con el hecho de que las poblaciones tanzanas incluyen material de propagación sexual mantenido por asentamientos a través de múltiples generaciones, mientras que nuestro material se supone de origen clonal, pero claramente incluye genotipos divergentes de numerosos orígenes.

En cuanto a Guatemala, un estudio reciente de Ruíz-Chután et al. 2024 comparó el germoplasma de Etiopía y Guatemala mediante el uso de 12 marcadores SSR. Este estudio identificó 298 accesos de 112 alelos, con una media de 10.21 alelos por locus, un valor PIC de 0.84 y heterocigosidad observada y esperada de 0.51 y 0.71, respectivamente. Ambos países mostraron una alta diversidad genética, con estructura de la población sugiriendo principalmente la separación geográfica y racial en lugar de diferente cultivares. Según estos autores, mientras que Guatemala tiene recursos genéticos únicos de aguacate, tal alta diversidad natural puede llevar a problemas de identificación varietal en la ausencia de eficiente certificación de materiales de propagación, y este documento podría sugerir que tal situación puede ser típica. En China, donde el aguacate ha sido introducido relativamente recientemente y la expansión comercial fue rápida, Yang et al. 2020. Evaluar 56 accesos nativos de la provincia de

Informe final de Proyecto de Investigación

Hainan con diez marcadores EST-SSR combinados con carácter frutal de fruta de alta calidad. Todos estos accesos eran complejos híbridos Guatemaltecos x Mexicanos x Antillanos, reflejando múltiples materiales de introducción. Este patrón de complejos híbridos en plantas comerciales es de esperar que sea también válido para Guatemala, donde la hibridación natural entre razas y la presencia de numerosas poblaciones silvestres y plantadas parecen conducir a la genética cropware compleja.

Estudios utilizando tecnologías más recientes como SNPs han proporcionado perspectivas adicionales de la diversidad genética en aguacate. Talavera et al. 2019. utilizaron 7,108 marcadores SNP para caracterizar 71 accesiones representando las tres razas botánicas, al mismo tiempo que un genoma de referencia de borrador de 'Hass'. Aunque los valores de heterocigosidad observada con SNPs reportados 0.16, fueron inferiores a los reportados con SSR que típicamente se atribuye a la alidad bi bialélica de los SNPs en comparación con el carácter multi alélicas de los SSR. Demostró claramente que es posible distinguir las razas botánicas y los cultivares cuando se analiza el material debidamente caracterizado. Dado el predominio global y total del cultivar 'Hass' que implica 90 por ciento de la producción mundial. como lo reportan Rendón Anaya et al. 2019 y Nath et al. 2022 es claro que la identidad genética de este cultivar específico debe retenerse en los programas de propagación comercial. Las comparaciones con otros cultivos de propagación clonal proporcionan una mayor perspectiva. En vid, se demostró que 6-8 marcadores SSR son suficientes para identificar de manera inequívoca más de 3,000 cultivares en colecciones vinícolas, con valores de heterocigosidad presentados por plantas del mismo cultivar verdadero. En olivo, estudios de certificación varietal han mostrado que material certificado de cultivares individuales, como 'Arbequina', presenta $FST < 0.03$ entre lotes de diferentes viveros certificados, en clara contraposición a nosotros y nuestros $FST = 0.081$ entre poblaciones guiadas de 'Hass' provenientes cuenta como diferenciado.

La creciente disponibilidad de genomas de referencia de alta calidad para aguacate, incluidos los recientes ensamblajes del cultivar 'Hass' con N50 superiores a 3 megabases y puntuaciones BUSCO de 91% Nath et al., 2022, así como genomas en otros cultivares tales como Gwen Kuhn et al., 2022, allanan el camino para la transición a tecnologías de genotipificación de mayor rendimiento. Estos recursos genómicos respaldan el desarrollo de paneles de SNPs especializados para aplicaciones de certificación varietal, los cuales podrían eventualmente complementar o suplantar por completo a los paneles de SSR que se utilizan actualmente. Aun así, sin importar la tecnología de marcadores utilizada, la eficacia de cualquier sistema de certificación molecular depende críticamente de la disponibilidad de material de referencia bien caracterizado y de protocolos normalizados de muestreo y mapeo Guichoux et al., 2011; Mariette et al., 2010. Un aspecto que me gustaría destacar es la diferencia entre el caso guatemalteco y los países con sistemas de certificación varietal previamente establecidos. California el estado donde este cultivar fue desarrollado cuenta con un sistema de certificación estricto que incluye verificaciones moleculares de trazabilidad en la propagación (Ashworth y Clegg, 2003). En el caso de Chile, el Comité del Aguacate Hass establece rigurosos estándares mínimos que deben ser cumplidos antes de autorizar en la comercialización del material vegetal de vivero (Guzmán et al., 2022); por esto mismo los estudios realizados en estas locaciones reportan un menor nivel de diversidad genética en el material que comercializan como Hass,



Informe final de Proyecto de Investigación

valores de heterocigosidad y diversidad alélica compatibles con un estado de clonalidad fiel en la propagación de un único genotipo.

10.5 Implicaciones para la certificación varietal y controles de calidad de viveros

Los resultados de este estudio tienen implicancias directas y urgentes para el establecimiento de sistemas efectivos de certificación varietal y control de calidad en la cadena de producción de aguacate en Guatemala. La documentación de que solo el 10.22% del material analizado corresponde genéticamente al cultivar 'Hass' auténtico demuestra una falla sistémica en los mecanismos actuales de aseguramiento de calidad genética del material de propagación. Resolver este problema requeriría un sistema integral de certificación que incorpore la verificación molecular en puntos críticos de la cadena de producción, desde la selección de material madre hasta la distribución final de plantas a los productores. Experiencias internacionales con certificación varietal en marcadores moleculares provee marcos conceptuales y metodológicos aplicables al contexto guatemalteco. La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales ha desarrollado directrices para la evaluación de variedades candidatas basadas en el criterio DUS, aunque tradicionalmente estos sistemas se han basado principalmente en características morfológicas y agronómicas. Sin embargo, UPOV reconoce explícitamente el valor complementario de los marcadores moleculares en los sistemas de certificación, particularmente para cultivos donde la evaluación fenotípica es costosa, lenta o significativamente influenciada por el ambiente.

Los marcadores moleculares tienen ventajas específicas para la certificación varietal que son particularmente importantes para aguacate. En primer lugar, la caracterización molecular se lleva a cabo en etapas muy tempranas del desarrollo de la planta y puede ser realizada en plántulas o material en proceso de propagación en vivero; el proceso no necesita esperar a que la planta produzca frutas, que puede tardar entre 3 y 5 años para aguacate. En segundo lugar, como los marcadores moleculares no se ven afectados por el entorno o las prácticas de manejo o el estado fenológico de una planta, se ha informado que proporcionan resultados altamente repetibles independientemente del sitio o el muestreo a lo largo del tiempo. En tercer lugar, los marcadores moleculares pueden discriminar entre genotipos con mayor precisión a pesar de que las diferencias morfológicas entre dos genotipos son sutiles o se superponen en cuanto a la variación que puede variar dentro del mismo cultivar. Una implementación efectiva de la certificación molecular en aguacate en Guatemala podría ser a través del sistema de tres niveles que captura los principios de aseguramiento de la calidad ampliamente implementados en programas de mejoramiento de plantas. El primer nivel sería la certificación de huertos de semillas madres que implicarían solo huertos certificados molecularmente donde todo el material vegetativo disponible, viveros de yemas y plantaciones madres única variedad "Hass". Las plantaciones servirían como fuentes para viveros de yemas certificados cuyo material de propagación debe ser trazable y desde los huertos de semillas madre certificadas proporcionados directamente para la producción de varetas.

El proceso de verificación molecular en cada uno de estos niveles necesita protocolos estandarizados de muestreo, extracción de ADN, genotipificación y claros criterios de decisión. Para asegurarse de la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados, el

Informe final de Proyecto de Investigación

uso de material de referencia estandarizado Hass auténtico verificado debería incluirse en cada corrida analítica como control positivo. Según nuestros resultados, se propone el umbral de $\geq 80\%$ de similitud genética al patrón de referencia de Hass como criterio de certificación, aunque dicho umbral se puede ajustar en base a la experiencia operativa y comparación con material certificado internacionalmente (Archard et al., 2013; Yang et al., 2021).

El panel óptimo de 9 marcadores SSR identificado en este estudio proporciona una base técnica sólida para la implementación de la certificación a escala comercial. La capacidad de este panel para discriminar genotipos con potencia equivalente al panel completo de 12 marcadores, mientras reduce los costos en 25%, hace que el panel sea económicamente viable para la aplicación rutinaria en viveros de diferentes escalas. El costo por muestra para la genotipificación con SSR mediante electroforesis capilar típicamente oscila entre USD \$15-30 dependiendo del volumen de muestras y las economías de escala. Finalmente, la implementación de la certificación molecular requiere el desarrollo de capacidades institucionales y técnicas en Guatemala. Esto incluye menores precios de genotipificación en masa los cuales pueden ser menores a los presentados en este estudio.

La verificación molecular de cada planta individual producida en vivero es ideal desde una perspectiva de aseguramiento de calidad, pero la técnica podría ser económicamente insostenible, especialmente para viveros pequeños. Una opción intermedia es la implementación de muestreo estadístico, en la que un número determinado de plantas en cada lote de producción es verificado molecularmente. A continuación, se definen diferentes criterios de aceptación/rechazo basados en los resultados del muestreo. Por ejemplo, un esquema de muestreo puede requerir que, en lotes de 1000 plantas, un mínimo de 30-50 plantas sea verificado cuya aceptación o rechazo sea basada en el criterio de similitud con 'Hass' mayor o igual a 80%. Además, la documentación en la que cada planta certificada debe ser acompañada debería incluir el origen del material madre, la fecha de propagación, los resultados del análisis molecular, incluidos los genotipos específicos o, como mínimo, la confirmación de la autenticidad, y un número de certificación único que permita la trazabilidad hasta su fuente. Tecnologías de información como códigos QR o blockchain ya son exploradas en otros cultivos para facilitar la trazabilidad e impedir la falsificación de los certificados. Tales tecnologías podrían ser eventualmente adoptadas en un sistema de certificación de aguacate en Guatemala.

Un desafío particular para implementación de la certificación en Guatemala es la presencia de numerosos viveros informales o de pequeña escala que actualmente opera sin supervisión técnica o regulatoria significativa. Estos viveros frecuentemente utilizan material de propagación de origen desconocido o no verificado, contribuyendo sustancialmente al problema de falta de autenticidad varietal documentado en este estudio. Estrategias para incorporar estos viveros en un sistema de certificación podrían incluir programas de incentivos, por ejemplo, precios preferenciales o acceso a mercados específicos para material certificado; campañas de educación sobre los beneficios de certificación para productores finales; establecimiento de laboratorios regionales de servicio que ofrezcan verificación molecular a costos accesibles.

Informe final de Proyecto de Investigación

La implementación exitosa de certificación molecular también necesitaría coordinación inter-institucional efectiva. En el caso de Guatemala, estas entidades pueden incluir al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, universidades con las capacidades de biología molecular como la Universidad de San Carlos de Guatemala o las asociaciones de productores. Todas estas instituciones desempeñan un rol específico, donde MAGA puede proporcionar el marco regulatorio y la supervisión, ICTA o universidades puede mantener huertos madre certificados y ofrecer servicios de análisis molecular. Por otro lado, las asociaciones de productores estarían en una posición de promover la adopción de material certificado entre sus miembros. Por último, sería crucial reconocer que la certificación molecular es solo un componente de un sistema integral de aseguramiento de calidad para material de aguacate. La certificación fitosanitaria y la ejecución de protocolos para asegurar que el material esté libre de patógenos importantes es otro factor crítico que debe considerarse.

10.6 Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

Como en todos los estudios científicos, es fundamental reconocer tanto las limitaciones intrínsecas a este trabajo como las oportunidades que tales limitaciones presentan para futuras investigaciones. Mientras que el presente estudio proporciona una caracterización molecular completa del material vendido como ‘Hass’ en Guatemala, varios aspectos metodológicos y de alcance deben considerarse cuidadosamente en la interpretación de resultados y en la planificación de estudios futuros. Una limitación significativa del presente estudio es la falta de una caracterización fenotípica detallada de las muestras analizadas. Dado que la mayoría de las plantas muestreadas en viveros aún no habían alcanzado la edad de producción, y que las muestras de plantación se colectaron en su mayoría de árboles jóvenes, no fue posible evaluar sistemáticamente los tamaños, formas, colores de la piel, contenidos de aceite, épocas de maduración y calidad organoléptica de las frutas. La correlación entre los perfiles genéticos y los fenotipos frutales habría proporcionado conocimientos valiosos sobre las consecuencias prácticas de la heterogeneidad genética documentada. Los estudios futuros deben incluir una evaluación fenotípica completa en árboles productivos maduros, de modo que se puedan establecer correlaciones genotipo-fenotipo y se pueda cuantificar el impacto económico de la variabilidad genética en los rasgos de calidad comercial de las frutas mayoreo.

El uso de solo 12 marcadores microsatélites, aunque suficiente para los fines de este estudio, proporciona una cobertura limitada del genoma de aguacate en su totalidad. El tamaño del genoma de *P. americana* es aproximadamente 896 Mb divididos en 12 cromosomas, y los 12 loci SSR probados son solo una fracción de la variabilidad genómica total. A pesar de que los marcadores utilizados en este estudio han demostrado un alto poder discriminatorio y se han utilizado en otros estudios de aguacate, la transición a plataformas de genotipificación más densas, como los arrays de SNP o la genotipificación por secuenciación, proporcionaría una resolución genómica mucho mayor. Dado que se han publicado recientemente genomas de referencia de alta calidad para ‘Hass’ y otros cultivares, ahora es posible diseñar paneles de SNP de alto rendimiento que podrían ser utilizados en futuros estudios de certificación y caracterización del germoplasma.



Informe final de Proyecto de Investigación

El muestreo realizado en este estudio, aunque numeroso, representa solo una fracción de la producción total de material vegetal de aguacate en Guatemala. En consecuencia, la generalización de nuestros resultados en el ámbito nacional debe hacerse con precaución. La calidad del material vegetal producido en cada región especializada en Guatemala puede diferir según la fuente local de germoplasma, las prácticas del vivero y las rutas de introducción del material. Los estudios futuros que incluyan estudios de muestreo estratificado en todas las regiones de producción de aguacate en Guatemala proporcionarían una visión más completa de la situación nacional. Además, sería valioso realizar muestreos longitudinales durante diferentes años para evaluar si la calidad del material vegetal se está deteriorando o mejorando con el tiempo y evaluar el impacto de las intervenciones en gestión de la certificación.

La falta de análisis del material del portainjerto también representa otra limitación que merece ser abordada. En la producción de aguacate, el portainjerto puede influir en el vigor, la tolerancia a enfermedades del suelo, especialmente *Phytophthora cinnamomi*; eficiencia en la absorción de nutrientes; y adaptación a condiciones edafoclimáticas específicas. Además, y como se observó previamente, las tasas el portainjerto prevalece sobre el injerto por falta de compatibilidad o rebrotes adventicios, lo que contribuye a la heterogeneidad observada. Estudios futuros deben caracterizar separadamente el injerto y el portainjerto para discutir estos componentes y ver la posible compatibilidad y trazabilidad de estos.

Desde una perspectiva de mejoramiento genético y desarrollo de nuevos cultivares, los resultados de este estudio subrayan la necesidad urgente de programas formal de mejoramiento de aguacate en Guatemala. A diferencia de países como Estados Unidos, Israel, México, y Chile donde existen programas consolidados de mejoramiento que han originado nuevos cultivares con ciertas características específicas mejoradas, Guatemala carece de un programa institucional sistemático de mejoramiento de aguacate. La rica diversidad genética ambiente en Guatemala y el estatus del país en calidad de centro de origen de la especie convierten al país en un reservorio genético excepcional que cubre explotarse mediante la creación de programas de mejoramiento que exploten esta información para la creación de cultivares que se adapten a las condiciones del país y las demandas particulares del mercado. Desde una perspectiva tecnológica, las tecnologías genómicas emergentes ofrecen numerosas posibilidades al mejoramiento de aguacate. Por ejemplo, los estudios más recientes de asociación de genoma completo in aguacate han identificado un número sustanciado de marcadores asociados con componentes clave de la calidad de fruto como tamaño, forma, contenido graso, y textura de piel. Dichos marcadores pueden usarse en el marco de selección asistida por marcadoras para acelerar de forma sustancial el desarrollo de un nuevo cultivar, recortando décadas de procesos en términos de tiempo y recursos comparado a las aproximaciones tradicionales basadas en la evaluación fenotípica del material que, en el caso del aguacate, puede tardar hasta 10-15 años hasta la fructificación formal. Muy parecido la comparación directa de todos los marcadores disponibles con las variantes genéticas responsables de las diferencias en carta de genotipo según el fenotipo.

Por otro lado, la identificación de regiones genómicas asociadas con características de interés agronómico utilizando GWAS y estudios de QTL también puede eventualmente



Informe final de Proyecto de Investigación

informar estrategias de edición genómica utilizando tecnologías como CRISPR/Cas9. Aunque la edición genómica en especies perennes leñosas enfrenta desafíos técnicos significativos relacionados con transformación, regeneración y largos ciclos de vida, los avances recientes en estas tecnologías sugieren que eventualmente podrían aplicarse en aguacate para modificación de características específicas (Wang et al., 2020). Sin embargo, las consideraciones regulatorias, éticas y de la cadena de suministro de productos alimenticios de los cultivos editados genéticamente deben ser cuidadosamente evaluadas antes de contemplar aplicaciones comerciales.

Los recursos genéticos excepcionales de los genomas silvestres en *P. americana* de Guatemala, el centro de origen y diversificación de la especie, están simultáneamente en serio riesgo debido a la conversión del uso de la tierra a la agricultura, el cambio climático global y pérdida de hábitat en estado silvestre. La caracterización molecular integral de poblaciones silvestres y asilvestradas de aguacate en Guatemala, particularmente en áreas prioritarias que se ha identificado como centros de diversidad, es crítica para priorizar la conservación prioritaria. La creación de colecciones ex situ representativas y el desarrollo de bancos de germoplasma apropiadamente caracterizados molecular y fenotípicamente garantizarán la preservación de esta invaluable diversidad para las generaciones futuras y los programas de mejoramiento por su integración con datos ecológicos, climáticos y de manejo de cultivos. .

Según una perspectiva de desarrollo de capacidades, la implementación efectiva de certificación molecular y programas de mejoramiento en Guatemala dependería de la inversión en infraestructura científica, de formación de recursos humanos especializados y de establecimiento de redes de colaboración y cooperación nacional e internacional. A este respecto, el establecimiento de conexiones entre instituciones académicas, centros de investigación estatales, sector privado, organizaciones de productores y productores, sería una prioridad para traducir el conocimiento científico en impacto en el campo. Además, modelos exitosos de tales colaboraciones ya están presentes en otros países y podrían ser adaptados al contexto guatemalteco. Otro aspecto importante es la dimensión socioeconómica de la implementación de sistemas de certificación. Aunque la certificación molecular se asocia generalmente con sistemas de garantía de calidad y posibles mercados de precio más alto, también tiene altos costos de entrada que serían prohibitivos para productores pequeños y viveros de escala limitada. Por lo tanto, las políticas públicas que contemplan subsidios para la certificación, crédito subvencionado para la inversión en infraestructura de viveros y programas de extensión para apoyar a los productores pequeños resultarían necesarias para distribuir los beneficios de la certificación molecular de manera equitativa en la industria del aguacate en Guatemala.

11 Propiedad intelectual

NA

Informe final de Proyecto de Investigación

12 Beneficiarios directos e indirectos

Resultados, productos o hallazgos	Beneficiarios directos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de beneficiarios directos	Beneficiarios indirectos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de Beneficiarios indirectos
Base de datos genética de 400 muestras de aguacate caracterizadas con 12 marcadores SSR	Investigadores y técnicos de laboratorios de biología molecular de USAC, ICTA y universidades nacionales	25	Sector académico nacional (estudiantes de pregrado y posgrado en ciencias agrícolas y biotecnología)	500
Panel óptimo de 9 marcadores SSR para certificación varietal de aguacate Hass	Viveros certificadores y laboratorios de análisis molecular que implementarán certificación genética	15	Viveros comerciales de aguacate a nivel nacional que adoptarán estándares de certificación	180
Protocolo estandarizado de certificación genética para aguacate Hass	Instituciones reguladoras (MAGA, Unidad de Normas y Regulaciones) y entidades certificadoras	8	Productores de aguacate que recibirán material certificado de viveros	3,500
Publicación científica con metodología y resultados	Comunidad científica internacional trabajando en genética de aguacate y certificación varietal	200	Programas de mejoramiento genético en otros países productores de aguacate en Mesoamérica	1,000

Informe final de Proyecto de Investigación

13 Estrategia de divulgación y difusión de los resultados

Describa con **evidencia** en la tabla 4 las actividades realizadas. Marque con una X las actividades que realizó. Dependiendo de la investigación agregue otras actividades.

Tabla 6. Estrategias de divulgación y difusión de resultados

	Sí	No
Presentación TV		
Entrevistas radiales		
Podcast		
Entrevista DIGI		
Recursos audiovisuales		
Congresos científicos nacionales o internacionales		
Talleres		
Publicación de libro		
Publicación de artículo científico	X	
Divulgación por redes sociales institucionales		
Presentación pública		
Presentación autoridades USAC		
Presentación a beneficiarios directos		
Entrega de resultados	X	
Docencia en grado	X	
Docencia postgrado	X	
Póster científico		
Trifoliales		
Conferencias		
Otro (describa)		

14 Contribución a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND)

El presente proyecto contribuye a las siguientes Prioridades Nacionales de Desarrollo establecidas en el Plan Nacional de Desarrollo K'atun Nuestra Guatemala 2032:

14.1 Meta Estratégica 1: Disponibilidad y Acceso a Alimentos

Meta específica 1.3: Incrementar la productividad agrícola y la competitividad de los productos del agro

Prioridad: Guatemala urbana y rural

Contribución concreta del proyecto:

La generación de evidencia y protocolos obtenidos en esta investigación inciden directamente en el aumento de la competitividad del aguacate guatemalteco a través del sistema certificado de autenticidad varietal a partir de la genética. La reducción de material de venta 'Hass' verificable a solo el 10.22% es una condición crítica para la



Informe final de Proyecto de Investigación

calidad y el rendimiento sectorial. El proceso de certificación y el panel óptimo de marcadores SSR estándar presentado permiten al vivero y al productor contar con herramientas claras para garantizar la identidad genética del material plantado, aumentando la uniformidad y la calidad horizontal que demandan los mercados internacionales y finalmente, la de la fruta guatemalteca frente al mundo.

14.2 Meta Estratégica 2: Empleo e Inversión

Meta específica 2.2: Generar empleos formales dignos y de calidad

Prioridad: Bienestar de la Gente

Contribución concreta del proyecto:

La implementación de sistemas de certificación genética en viveros comerciales genera empleo técnico especializado en áreas de biotecnología aplicada, análisis de laboratorio molecular, y control de calidad en la producción de material vegetal. Dado que la metodología desarrollada es realizada por personal capacitado en extracción de ADN, genotipificación con marcadores moleculares, y manejo de bases de datos genéticos, su implementación promueve la creación de empleos formales de alto valor técnico. Además, la mejora en la calidad del material de propagación contribuye a fortalecer la cadena productiva del aguacate, un cultivo con alta demanda internacional que genera empleo en actividades de producción, postcosecha, procesamiento y exportación, beneficiando particularmente a regiones rurales donde el aguacate es una fuente key de ingreso y empleo.

14.3 Meta Estratégica 5: Valor Económico de los Recursos Naturales

Meta específica 5.1: Incrementar la producción nacional priorizando el manejo sostenible de los recursos naturales

Prioridad: Riqueza para todas y todos

Contribución concreta del proyecto:

La caracterización molecular del germoplasma de aguacate en Guatemala promueve el manejo sostenible de los recursos genéticos nacionales, un aspecto de mayor relevancia en un país como Guatemala, el cual es centro de origen y centro de diversificación de Persea americana. La base de datos genética de 400 muestras caracterizadas representa la primera tipificación sistemática del germoplasma comercial el país, suministrando información básica para la conservación in situ y ex situ de los recursos genéticos nativos. Adicionalmente, el protocolo de certificación genética desarrollado no solamente promueve la calidad del germoplasma comercial, sino que conserva la identidad de cultivares específicos, controversia de erosión genética causada por mezclas inadvertidas de germoplasma. Finalmente, la reducción de la variabilidad genética en plantaciones comerciales basada en el uso de germoplasma certificado optimiza el manejo agronómico, reduce los insumos aplicados ineficientemente debido a la heterogeneidad de la respuesta, y promueve u a producción más sostenible y eficiente del uso de los recursos naturales.

14.4 Meta Estratégica 9: Fortalecimiento Institucional, Seguridad y Justicia

Meta específica 9.5: Fortalecer la rectoría del Estado para el desarrollo integral



Informe final de Proyecto de Investigación

Estado como garante de los derechos humanos y conductor del desarrollo

Contribución concreta del proyecto:

Los resultados de investigación presentados en este estudio pretenden fortalecer la capacidad rectora del Estado guatemalteco sobre regulación y control de la calidad de material de propagación vegetal. La Certificación Genética con el protocolo estandarizado ofrece a las instituciones como el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación una herramientas técnicas basadas en evidencia científica para regular sobre normativas de certificación varietal en el sector aguacatero. La metodología presentada puede ser adoptada por la Unidad de Normas y Regulaciones del MAGA para crear estándares de certificación genética oficial, fortaleciendo el marco regulador sobre la materia sin incurrir en costosas pruebas genéticas en laboratorio. A su vez, la documentación por bases de evidencia científica rigurosa de la problemática de autenticidad varietal en el material comercial (% de no autenticidad), este estudio provee justificación técnica para intervenciones institucionales que mejoren la calidad y la traza en la cadena de producción de plantas de aguacate, fortaleciendo la capacidad reguladora del Estado en beneficio de productores/consumidores.

15 Otras contribuciones del proyecto al desarrollo

15.1 Fortalecimiento de capacidades científicas y tecnológicas nacionales

El proyecto, mediante la estandarización y validación de protocolos de análisis molecular aplicados a certificación varietal, contribuye al desarrollo de capacidades técnicas y científicas en Guatemala; el establecimiento de metodologías reproducibles de extracción de ADN, amplificación por PCR de marcadores microsatélites y análisis de datos genéticos en aguacate es un avance en la apropiación de tecnologías biotecnológicas por instituciones nacionales. La capacitación de personal técnico y estudiantes genera recursos humanos especializados en genética molecular aplicada que pueden contribuir a otros sectores agrícolas del país, promoviendo la transferencia horizontal de conocimiento y tecnología.

15.2 Generación de conocimiento científico original

Este estudio es la primera caracterización molecular del germoplasma de aguacate comercializado en el país, por lo que constituye conocimiento científico original que contribuye al acervo académico nacional e internacional; la base de datos genética de 400 muestras genotipificadas con 12 marcadores SSR es un recurso de información único y un activo del proyecto, que puede ser utilizado por investigadores nacionales e internacionales para estudios comparativos, análisis filogenéticos y caracterización de recursos genéticos. La publicación de resultados en revistas indexadas posiciona al país en el ámbito de la investigación en genética de aguacate a nivel internacional, contribuyendo a la visibilidad de la ciencia guatemalteca.



Informe final de Proyecto de Investigación

15.3 Apoyo a la competitividad y acceso a mercados internacionales

Impacto en la Seguridad y Soberanía Alimentaria y Nutricional: A pesar de que el aguacate Hass se destina en su mayoría a mercados de exportación, la mejora en la productividad y eficiencia de la cadena productiva mediante el uso de material genéticamente certificado afecta indirectamente a la seguridad alimentaria nacional. Al ser más rentable el cultivo, los pequeños y medianos productores pueden diversificar sus sistemas de producción, reinvertir en mejoras de infraestructura, y generar ingresos más estables que favorecen la seguridad económica de las familias. Además, el aguacate es un alimento muy nutritivo y con pocos requerimientos de procesamiento, accesible a precios asequibles para la población guatemalteca en mercados internos autorizados para comercializar producto que no cumple con las normativas de exportación. Por ende, contribuye a la diversificación de la dieta de los guatemaltecos.

15.4 Contribución a la seguridad alimentaria y nutricional

A pesar de que el aguacate «Hass» se destina principalmente a los mercados de exportación, el aumento de la productividad y la eficiencia mediante el uso de material genéticamente certificado tiene efectos indirectos en la seguridad alimentaria nacional. La mayor rentabilidad de los cultivos permite a los pequeños y medianos agricultores diversificar sus sistemas de producción, reinvertir en la mejora de las infraestructuras y, por lo tanto, generar ingresos más estables que contribuyen a la seguridad económica familiar. Además de lo anterior, el aguacate es un alimento muy nutritivo, rico en grasas monoinsaturadas, vitaminas y minerales, y su presencia en los mercados nacionales a precios asequibles contribuye a la diversificación de la dieta guatemalteca, ya que se utiliza como producto estándar no destinado a la exportación.

15.5 Protección de los recursos genéticos y biodiversidad

Como centro de origen de *Persea americana, Guatemala cuenta con una diversidad genética excepcional de aguacates, con poblaciones silvestres y asilvestradas de las tres razas botánicas, mexicana, guatemalteca y antillana, y sus híbridos naturales. Los resultados de esta investigación, es decir, la caracterización molecular, proporcionan metodologías aplicables a la conservación y el uso sostenible de estos recursos genéticos nativos. Los protocolos de identificación desarrollados simplifican la documentación de la diversidad en las colecciones ex situ, apoyan los programas de conservación in situ mediante la identificación de las poblaciones más críticas y proporcionan herramientas para prevenir la erosión genética de los cultivos locales de importancia cultural y económica. Estos conocimientos son fundamentales para abordar los retos futuros, entre los que se incluyen los relacionados con el cambio climático, las nuevas plagas emergentes y las necesidades de adaptación de los sistemas agrícolas.

15.6 Desarrollo de Alianzas Interinstitucionales

Al final del proyecto, se lograron iniciativas para fortalecer las alianzas interinstitucionales entre la Universidad de San Carlos de Guatemala, el Ministerio de Agricultura, las asociaciones de productores AGEXPRONT y el sector privado. Estas



Informe final de Proyecto de Investigación

alianzas pueden considerarse ejemplos de buenas prácticas para articulaciones similares en otros cultivos y cadenas de valor. Las redes de colaboración enmarcan la transferencia de conocimientos entre la investigación y los escenarios de aplicación práctica, acelerando la transición de la invención científica y tecnológica a la innovación social, lo que aumenta el impacto real de la inversión pública en ciencia y tecnología.

15.7 Los resultados del proyecto contribuyen directamente a varios Objetivos de Desarrollo Sostenible de Naciones Unidas:

- **ODS 2 (Hambre Cero):** Mediante mejora de productividad agrícola y sistemas alimentarios sostenibles
- **ODS 8 (Trabajo Decente y Crecimiento Económico):** Generación de empleo técnico especializado y fortalecimiento de cadenas productivas
- **ODS 9 (Industria, Innovación e Infraestructura):** Desarrollo de infraestructura tecnológica y capacidades de innovación en biotecnología
- **ODS 12 (Producción y Consumo Responsables):** Promoción de prácticas de producción sostenible y sistemas de trazabilidad
- **ODS 15 (Vida de Ecosistemas Terrestres):** Conservación y uso sostenible de recursos genéticos agrícolas

15.8 Evidencia para políticas públicas.

La evidencia documentada y cuantitativa del problema de autenticidad de material comercial de aguacate (89.78% de material no auténtico) sirve como evidencia científica para el diseño e implementación de políticas de certificación de material de propagación vegetal. En ese sentido, de comporta una justificación robusta de inversión pública en sistemas de certificación, establecimiento de laboratorios de referencia, marcos regulatorios específicos, y programas de apoyo a pequeños productores para acceso a material certificado. Por lo tanto, esta evidencia podría utilizarse para la toma de decisiones respecto de capacidades presupuestarias bajo condición de insumos para diferentes intervenciones en el sector agrícola.

15.9 Modelo replicable en otros cultivos

El trabajo del protocolo metodológico para certificación genética de aguacate no solo contribuye a la mejora de la producción, sino que también constituye un modelo técnico replicable para otros cultivos de importancia económica en Guatemala que enfrentan problemáticas de autenticidad varietal. Cultivos como café, cacao, macadamia, cardamomo, u otros frutales diversos, se beneficiarían de la implementación de sistemas análogos de certificación molecular. La experiencia acumulada en el desarrollo de esta experiencia sana ofrece lecciones aprendidas, protocolos validados, y recursos humanos capacitados que hacen posible la expansión de la certificación genética a otros sectores de la agricultura guatemalteca, con la consecuente multiplicación de la inversión original.



Informe final de Proyecto de Investigación

16 Vinculación

Durante la ejecución del proyecto se estableció vinculación académica y científica con la **Czech University of Life Sciences Prague (České zemědělské univerzity v Praze, CZU)**, específicamente con la Facultad de Ciencias Tropicales AgriSciences (Faculty of Tropical AgriSciences). Esta colaboración se fundamentó en el interés mutuo por la caracterización genética de recursos fitogenéticos tropicales y subtropicales, y en la experiencia de CZU en aplicación de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética en cultivos perennes.

La colaboración con CZU se enfocó en el intercambio de experiencias metodológicas para optimización de protocolos de extracción de ADN de tejido foliar de aguacate y estandarización de análisis de marcadores microsatélites. Investigadores de CZU proporcionaron asesoría técnica sobre estrategias de control de calidad en genotipificación por electroforesis capilar y métodos estadísticos para análisis de estructura poblacional, contribuyendo al fortalecimiento de las capacidades técnicas del equipo guatemalteco.

Informe final de Proyecto de Investigación

17 Conclusiones

En el presente estudio se caracterizó con éxito la diversidad genética del material comercial con 12 marcadores SSR, se detectó una crisis de autenticidad varietal porcentaje de material genéticamente auténtico, 10.22% y 19.70% y se desarrolló un sistema completo de certificación genética que, incluyendo un panel optimizado de 9 marcadores, un protocolo técnico estandarizado y criterios objetivos de certificación, es técnicamente viable y económicamente factible para su implementación comercial en Guatemala.

El material comercializado como aguacate “Hass” en Guatemala exhibe niveles excepcionales de diversidad genética ($H_e = 0.739$, 396 genotipos únicos de 400 muestras) incompatibles con propagación clonal fiel, donde solo el 10.22% del material alcanza similitud genética $\geq 80\%$ con el cultivar auténtico. El análisis AMOVA muestra que el 91.91% de la varianza genética se sitúa dentro de poblaciones, lo que demuestra que la heterogeneidad genética es sistémica y abarca viveros y plantaciones en todo el territorio.

Se identificó un panel óptimo de 9 marcadores microsatélites (AVAG07, AVMIX04, AVAG13, AVAG05, AVAG25, AVAG22, AVAG11, AVD001, AVT436) que mantiene poder discriminatorio equivalente al panel completo de 12 marcadores con reducción del 25% en costos y tiempo de análisis, validado mediante análisis de permutaciones y alta correlación ($r = 0.989$) en clasificación de muestras según criterios de certificación.

Se desarrolló un protocolo técnico integral y estandarizado para la certificación del aguacate Hass basado en marcadores moleculares, que se validó como reproducible, económicamente viable y técnicamente sólido. El protocolo, que consiste en procedimientos detallados que van desde el muestreo hasta la interpretación de los resultados, establece un umbral de similitud genética $\geq 80\%$ como criterio objetivo de certificación, y una documentación técnica completa para simplificar la transferencia y la implementación del protocolo a las instituciones nacionales.



Informe final de Proyecto de Investigación

18 Recomendaciones

1. Establecimiento de un sistema nacional de certificación genética de aguacate

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala MAGA, conjuntamente con la Universidad de San Carlos de Guatemala USAC y el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA, debe establecer un sistema nacional de certificación genética cuya estructura incluya huertos madre certificados molecularmente, bancos de yemas certificados, auditorías regulares de viveristas mediante muestreo estadístico y un registro nacional con sistema de trazabilidad completo. Esta implementación debe ser gradual, abarcando al inicio a los viveros grandes y empresas exportadoras, y posteriormente a viveros medianos y pequeños mediante políticas de apoyo técnico y financiero 2.

2. Desarrollo de capacidades institucionales y fortalecimiento de infraestructura

Dos laboratorios de referencia nacional mínimo USAC e ICTA tiempo completo con infraestructura completa para genotipificación incluyendo termocicladores, sistemas de electroforesis capilar y equipos de control de calidad. Capacitación continua de personal técnico con certificación de competencias, sistemas de gestión de información de laboratorios y programas de control de calidad interlaboratorio mediante intercambio de muestras de referencia para asegurar reproducibilidad de resultados entre diferentes laboratorios participantes.

3. Establecimiento de marco regulatorio y normativo

Desarrollar normas técnicas oficiales con requisitos mínimos de certificación genética, mecanismos de acreditación de laboratorios y viveristas certificadores, supervisión y auditoría, y sanciones por comercializar material no certificado y sistema de incentivos, incluyendo diferenciación de precios y acceso preferencial a programas de apoyo gubernamental. La estructuración de este marco debe realizarse mediante un proceso participativo que involucre a productores, viveristas, investigadores y autoridades regulatorias.

4. Estudios de correlación genotipo-fenotipo y evaluación del impacto económico

Se debe considerar la realización de estudios de seguimiento que midan la correlación genotipo-fenotipo de los frutos que coinciden con los árboles genéticos en la producción de árboles adultos. Las características incluidas en el estudio son el peso, el contenido de aceite, la firmeza de los frutos, el tiempo de maduración de los frutos y la calidad organoléptica. Esto permitiría obtener la repercusión económica real del polimorfismo genético en la productividad y la calidad comercial, y las pruebas resultantes justificarán la inversión masiva en certificación cuando se comparen las plantaciones de material certificado con las de material no certificado.



Informe final de Proyecto de Investigación

5. Programas de apoyo financiero para pequeños y medianos productores

Se recomienda establecer mecanismos que faciliten el acceso al material certificado por parte de los pequeños y medianos productores, como subsidios parciales para la compra de plantas certificadas, líneas de crédito preferencial con tasas y períodos de gracia reducidos adecuados, programas de incentivos a la agricultura vinculados con certificaciones de sostenibilidad, y esquemas de agricultura por contrato en los que las exportadoras se comprometan a comprar a estos productores a precios preferenciales. Todos los programas mencionados deben ser diseñados con equidad, asegurando la inclusión de los pequeños productores.

6. Fortalecimiento de programas de extensión y capacitación

Se recomienda fortalecer los programas de extensión y capacitación agrícola a través del entrenamiento de los extensionistas en genética y certificación varietal, el desarrollo de materiales educativos acordes a la diversidad de los niveles de alfabetización, la implementación de parcelas demostrativas que muestren comparativamente el desempeño del material certificado y no certificado, los días de campo y los talleres participativos y la formación de redes de productores líderes que actúen como agentes de cambio en sus comunidades.

7. Desarrollo de programa nacional de mejoramiento genético

A través de toda Latinoamérica se demuestra que es imposible mejorar el cultivo sin recurrir al mejoramiento genético. En Guatemala tan sólo el mejoramiento de una tecnología de cultivo ha dejado muchas áreas. decltype: p.n. , pero no ha sido testigo de un programa formal de mejora genética. Estoy seguro de que existe una diversidad genética natural en Guatemala representada en su diversidad de aguacate. Hay variedades que producen frutos a lo largo de todo el año. Podríamos hacer un programa en el que desarrollen parte de este programa de cátedra mejorando la herencia de los caracteres finos.

Informe final de Proyecto de Investigación

19 Referencias

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, 2014, 691759. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>
- Alcaraz, M. L., & Hormaza, J. I. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*, 144(6), 244–253. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0018-0661.02019.x>
- Alcaraz, M. L., & Hormaza, J. I. (2011). Influence of physical distance between cultivars on yield, fruit quality and cross-pollination in avocado. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 386–389. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.10.014>
- Archard, P., Gong, L., Petit, R., & Song, Q. (2013). Comparison of the SNP-based genetic distances with pedigree-based kinship estimates within and between populations: Application in pedigreed soybean populations. *Crop Science*, 53(6), 2371–2387. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.12.0719>
- Aranzana, M. J., Decroocq, V., Dirlewanger, E., Eduardo, I., Gao, Z. S., Gasic, K., Iezzoni, A., Jung, S., Peace, C., Prieto, H., Tao, R., Verde, I., Abbott, A. G., & Audergon, J. M. (2019). Prunus genetics and applications after de novo genome sequencing: Achievements and prospects. *Horticulture Research*, 6, 58. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0140-8>
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., & Serrão, E. A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 16(24), 5115–5139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x>
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218. <https://doi.org/10.1007/BF02672069>
- Ashworth, V. E. T. M., & Clegg, M. T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity*, 94(5), 407–415. <https://doi.org/10.1093/jhered/esg076>
- Ashworth, V. E. T. M., Kobayashi, M. C., de la Cruz, M., & Clegg, M. T. (2004). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae*, 101(3), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.008>
- Båga, M., Fowler, D. B., & Chibbar, R. N. (2022). Genotyping-by-sequencing data reveal genetic structure and diversity in Canadian spring wheat germplasm. *Genome*, 65(1), 9–21. <https://doi.org/10.1139/gen-2021-0027>
- Ben-Ya'acov, A., & Michelson, E. (1995). Avocado rootstocks. In J. Janick (Ed.), *Horticultural reviews* (Vol. 17, pp. 381–429). John Wiley & Sons.
- Bergh, B. O. (1992). The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 76, 61–75.
- Beukelaer, H. D., & Daverdin, G. (2021). Core Hunter 3: Flexible core subset selection. *BMC Bioinformatics*, 22, 48. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04209-z>

Informe final de Proyecto de Investigación

- Bhore, S. J., Nithya, K., Lim, Y. Y., Sadagopan, R., & Amin, Z. A. (2021). Avocado: Nutrition, productivity and sustainability of the world's most popular fruit. *International Journal of Fruit Science*, 21(1), 253–275. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1870421>
- Boshier, D., Gordon, J. E., & Barrance, A. J. (2004). Prospects for circa situm tree conservation in Mesoamerican dry forest agro-ecosystems. In J. A. Frankie, A. Mata, & S. B. Vinson (Eds.), *Biodiversity conservation in Costa Rica: Learning the lessons in a seasonal dry forest* (pp. 210–226). University of California Press.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- Boza, E. J., Tondo, C. L., Ledesma, N., Campbell, R. J., Bost, J., Schnell, R. J., & Gutiérrez, O. A. (2018). Genetic differentiation, races and interracial admixture in avocado (*Persea americana* Mill.), and *Persea* spp. evaluated using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(4), 1195–1215. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0608-7>
- Cabezas, J. A., Ibáñez, J., Lijavetzky, D., Vélez, D., Bravo, G., Rodríguez, V., Carreño, I., Jermakow, A. M., Carreño, J., Ruiz-García, L., Thomas, M. R., & Martínez-Zapater, J. M. (2011). A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biology*, 11, 153. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-153>
- Calderón-Vázquez, C. L., Durbin, M. L., Ashworth, V. E. T. M., Tommasini, L., Meyer, K. K. T., & Clegg, M. T. (2013). Quantitative genetic analysis of three important nutritive traits in the fruit of avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138(4), 283–289. <https://doi.org/10.21273/JASHS.138.4.283>
- Cañas-Gutiérrez, G. P., Alcaraz, L., Hormaza, J. I., Arango-Isaza, R., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2015). Diversity of avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars from Antioquia (Northeast Colombia) and comparison with a worldwide germplasm collection. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(5), 796–808. <https://doi.org/10.3906/tar-1502-100>
- Chen, H., Morrell, P. L., Ashworth, V. E. T. M., de la Cruz, M., & Clegg, M. T. (2009). Tracing the geographic origins of major avocado cultivars. *Journal of Heredity*, 100(1), 56–65. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn068>
- DataExport. (2021). *Perfil sectorial del aguacate en Guatemala*. Ministerio de Economía de Guatemala.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., Clegg, M. T., & Clegg, M. T. (1998). Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *Journal of Heredity*, 89(4), 319–323. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.4.319>
- de Oliveira, J., Koehler, A. D., Almeida, C., Amadeu, R. R., & Garcia, A. A. F. (2020). Genetic diversity, population structure, and parentage analysis in a potato germplasm collection using SNP markers. *Crop Science*, 60(4), 1935–1950. <https://doi.org/10.1002/csc2.20212>
- Degani, C., El-Batsri, R., & Gazit, S. (1997). Outcrossing rate, yield, and selective fruit abscission in 'Ettinger' and 'Ardith' avocado plots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(6), 813–817. <https://doi.org/10.21273/JASHS.122.6.813>

Informe final de Proyecto de Investigación

- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Engels, J. M. M., & Visser, L. (Eds.). (2003). *A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6*. International Plant Genetic Resources Institute.
- Faleiro, F. G., Dos Santos, F. A. R., & Falcão, M. A. (2002). Modified CTAB protocol for DNA extraction from plant tissues. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(9), 1315–1318.
- FAO. (2021). *FAOSTAT statistical database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/>
- Fiedler, J., Bufler, G., & Bangerth, F. (1998). Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica*, 101(2), 249–255. <https://doi.org/10.1023/A:1018346920623>
- Galindo-Tovar, M. E., Arzate-Fernández, A. M., Ogata-Aguilar, N., & Landero-Torres, I. (2008). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 12(2), 325–334. [https://doi.org/10.3100/1043-4534\(2007\)12\[325:TAPALC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2007)12[325:TAPALC]2.0.CO;2)
- Gazit, S., & Degani, C. (2002). Reproductive biology. In A. W. Whitley, B. Schaffer, & B. N. Wolstenholme (Eds.), *The avocado: Botany, production and uses* (pp. 101–133). CAB International.
- Ge, Y., Ramchiary, N., Wang, T., Liang, C., Wang, N., Wang, Z., Choi, S. R., Lim, Y. P., & Piao, Z. (2019). Mapping quantitative trait loci for leaf and heading-related traits in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(1), 15–29. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0083-7>
- Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and the future of a societal insurance policy. *Crop Science*, 46(5), 2278–2292. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0169gas>
- Gross-German, E., & Viruel, M. A. (2013). Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: Genetic diversity, population structure, and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. *Tree Genetics & Genomes*, 9(2), 539–555. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0577-5>
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: Past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290–302. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., & Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Gupta, P. K., Kulwal, P. L., & Jaiswal, V. (2019). Association mapping in plants in the post-GWAS genomics era. In R. Varshney, M. Pandey, & A. Chitkineni

Informe final de Proyecto de Investigación

- (Eds.), *Plant genetics and molecular biology* (pp. 1–20). Springer. https://doi.org/10.1007/10_2017_49
- Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., Espíndola-Barquera, M. D. C., & Heredia García, E. (2017). Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 8, 243. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00243>
- Guzmán, P., Sánchez, R., Galaz, R., Pérez, J., & Tapia, M. (2022). Genetic analysis of Hass avocado clones in Chile using SSR markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 82(2), 214–223.
- Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A., & Chalmers, K. J. (2008). Multiplex-ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9, 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-80>
- Herrera-Ardón, M., González-Ayala, J. R., & Ruiz-Chután, J. A. (2021). Caracterización de la estructura genética del cedro (*Cedrela odorata* L.) en Guatemala usando marcadores moleculares. *Revista Científica*, 31(2), 45–56.
- Hodel, R. G. J., Chen, S., Payton, A. C., McDaniel, S. F., Soltis, P., & Soltis, D. E. (2016). Adding loci improves phylogeographic resolution in red mangroves despite increased missing data: Comparing microsatellites and RAD-Seq and investigation of null alleles. *Scientific Reports*, 6, 25546. <https://doi.org/10.1038/srep25546>
- Hofman, P. J., Bower, J., & Woolf, A. (2013). Harvesting, packing, postharvest technology, transport and processing. In B. Schaffer, B. N. Wolstenholme, & A. W. Whiley (Eds.), *The avocado: Botany, production and uses* (2nd ed., pp. 489–541). CAB International.
- Hofshi, R., Hofshi, L., & Arpaia, M. L. (2013). What is unique about the Hass avocado? *California Avocado Society Yearbook*, 96, 153–166.
- Jamali, S. H., Cockram, J., & Hickey, L. T. (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(7), 1911–1929. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03348-7>
- Jarvis, A., Lane, A., & Hijmans, R. J. (2008). The effect of climate change on crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 126(1–2), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.01.013>
- Jones, H., Leigh, F. J., Mackay, I., Bower, M. A., Smith, L. M. J., Charles, M. P., Jones, G., Jones, M. K., Brown, T. A., & Powell, W. (2013). Population-based resequencing reveals that the flowering time adaptation of cultivated barley originated east of the Fertile Crescent. *Molecular Biology and Evolution*, 30(9), 2071–2081. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst096>
- Jones, N., Ougham, H., & Thomas, H. (2021). Molecular markers and plant improvement in the genomics era. In R. J. Henry (Ed.), *Plant diversity and evolution: Genotypic and phenotypic variation in higher plants* (pp. 297–320). CABI.
- Juma, I., Msomba, S. W., Nyomora, A., Hovmalm, H. P., & Ortiz, R. (2019). Genetic diversity of avocado (*Persea americana* Mill.) in Tanzania. *Journal of Crop Improvement*, 33(6), 737–758. <https://doi.org/10.1080/15427528.2019.1661056>
- Juma, I., Nyomora, A., Hovmalm, H. P., Fatih, M., Geleta, M., & Ortiz, R. (2020). Genetic diversity and population structure analysis of avocado (*Persea americana* Mill.) in Tanzania using simple sequence repeat markers. *Journal of Applied Horticulture*, 22(1), 17–25.

Informe final de Proyecto de Investigación

- Kawagishi, H., Fukumoto, Y., Hatakeyama, M., He, P., Arimoto, H., Matsuzawa, T., Arimoto, Y., Suganuma, H., Inakuma, T., & Sugiyama, K. (2001). Liver injury-suppressing compounds from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(5), 2215–2221. <https://doi.org/10.1021/jf0017310>
- Knight, R. J., & Campbell, C. W. (1999). Ecological distribution of Guatemalan and Mexican avocado in Guatemala. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, *112*, 229–233.
- Kuhn, D. N., Bally, I. S. E., Dillon, N. L., Innes, D., Groh, A. M., Rahaman, J., Ophir, R., Cohen, Y., & Sherman, A. (2019a). Genetic map of mango: A tool for mango breeding. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 577. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00577>
- Kuhn, D. N., Groh, A., Rahaman, J., Freeman, B., Arpaia, M. L., Van den Berg, N., Abeysekara, N., & Maoz, I. (2019b). Creation of an avocado unambiguous genotype SNP database for germplasm curation and as an aid to breeders. *Tree Genetics & Genomes*, *15*, 71. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1374-1>
- Kuhn, D. N., Livingston, D. S., Richards, J. H., Manosalva, P., Van den Berg, N., & Chambers, A. H. (2022). Application of genomic tools to avocado (*Persea americana*) breeding: SNP discovery for genotyping and germplasm characterization. *Scientia Horticulturae*, *246*, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.011>
- Kuhn, D. N., Padilla, F. C., & Livingston III, D. S. (2024). Genome-wide association study identifies key quantitative trait loci (QTL) for fruit morphometric traits in avocado (*Persea* spp.). *BMC Genomics*, *25*, 1043. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-11043-1>
- Kumar, S., Chagné, D., Bink, M. C. A. M., Volz, R. K., Whitworth, C., & Carlisle, C. (2012). Genomic selection for fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *PLoS ONE*, *7*(5), e36674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036674>
- Liu, X., Wang, X., Chen, Z., Ye, J., Huang, H., Zhang, L., & Wu, W. (2020). De novo assembly and characterization of the avocado fruit transcriptome. *Horticulture Research*, *7*, 28. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0252-1>
- Lou, Q., Chen, L., Sun, Z., Xing, Y., Li, J., Xu, X., Mei, H., & Luo, L. (2015). A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, *199*(3), 355–368. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1130-9>
- Mariette, S., Tavaud, M., Arunyawat, U., Capdeville, G., Millan, M., & Salin, F. (2010). Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*, *11*, 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-77>
- Marrano, A., Micheletti, D., Lorenzi, S., Neale, D., & Grando, M. S. (2019). Genomic signatures of different adaptations to environmental stimuli between wild and cultivated *Vitis vinifera* L. *Horticulture Research*, *6*, 140. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0226-3>
- Migliaro, D., Crespan, M., Muñoz-Organero, G., Velasco, D., Pinto-Carnide, O., Petrovi, N., Raimondi, S., Schneider, A., de Andrés, M. T., Cabello, F., & Martínez-Zapater, J. M. (2019). Grapevine non-vinifera genetic diversity assessed by simple

Informe final de Proyecto de Investigación

- sequence repeat markers as a starting-point for new rootstock breeding programs. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70(4), 390–404. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.18110>
- Moreno, J., Obando, J., dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J. P., Monforte, A. J., & Garcia-Mas, J. (2019). Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(12), 3365–3381. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03428-8>
- Muchugi, A., Mng'omba, S. A., Jamnadass, R., Kalinganire, A., Hendre, P., & Dawson, I. K. (2020). Genetic diversity and population structure analysis of avocado (*Persea americana* Mill.) in Tanzania using SSR markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 931. <https://doi.org/10.3390/ijms21030931>
- Nath, V. S., Basheer, S., Senthil Kumar, T., Yilamujiang, A., Sathee, L., Anand, L., Sisodiya, D., Mohan, M., Chakraborty, K., Chattopadhyay, K., Mohapatra, T., & Kole, C. (2022). Genome assembly of 'Hass' avocado (*Persea americana*) identifies patterns underlying resistance to laurel wilt and heat tolerance. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 12(12), jkac276. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac276>
- Patocchi, A., Bigler, B., Koller, B., Kellerhals, M., & Gessler, C. (2009). Vf: An important gene in apple breeding for scab resistance. *Tree Genetics & Genomes*, 5(3), 439–448. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0210-8>
- Popenoe, W., & Zentmyer, G. A. (1997). Avocado diseases in Central America. *California Avocado Society Yearbook*, 81, 121–134.
- Ramírez-Gil, J. G., Henao-Rojas, J. C., & Morales-Osorio, J. G. (2020). Quality and physiological characteristics of avocado cv. Hass fruit rejected for export at two maturity stages. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 14(2), 187–198. <https://doi.org/10.17584/rcch.2020v14i2.10673>
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., Perez-Torres, C. A., Chacón-López, A., Hernandez-Guzmán, G., Chang, T. H., Farr, K. M., Barbazuk, W. B., Chamala, S., Mutwil, M., Shivhare, D., Alvarez-Ponce, D., Mitter, N., Hayward, A., Fletcher, S., ... Herrera-Estrella, L. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(34), 17081–17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822129116>
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., Simuta-Velázco, L., Barrientos-Priego, A. F., & Gallegos-Vázquez, C. (2013). Análisis de diversidad genética en aguacate nativo de Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 249–255.
- Rubinstein, M., Eshed, R., Rozen, A., Zviran, T., Kuhn, D. N., Irihimovitch, V., Sherman, A., & Ophir, R. (2019). Genetic diversity of avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm using pooled sequencing. *BMC Genomics*, 20(1), 379. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5672-7>
- Ruiz-Chután, J. A., Berdúo-Sandoval, J. E., Ylonely, M. S., González-Paz, E. D., & Jalonen, R. (2023). Phenotypic and genetic variability of Guatemalan native avocados as a genetic reservoir for breeding: A review. *Scientia Horticulturae*, 310, 111718. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111718>
- Ruiz-Chután, J. A., Kalousová, M., Vallenback, P., Aldén, T., & Čertner, M. (2023). Characterization of Guatemalan native avocado genetic resources using SSR

Informe final de Proyecto de Investigación

- markers reveals significant genetic structure and diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 70(5), 1465–1482. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01506-9>
- Ruiz-Chután, J. A., Sandoval-Zelada, A. M., Berdúo-Sandoval, J. E., & Jalonen, R. (2020). Diversidad genética de aguacates nativos guatemaltecos evaluada mediante marcadores AFLP. *Agronomía Mesoamericana*, 31(3), 725–745. <https://doi.org/10.15517/am.v31i3.40035>
- Ruiz-Chután, J. A., Sandoval-Zelada, A. M., González-Paz, E. D., & Jalonen, R. (2022). Genetic diversity and population structure of native avocados (*Persea americana* Mill.) in Guatemala using SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, 18(4), 32. <https://doi.org/10.1007/s11295-022-01565-x>
- Ruiz-Chután, J. A., Zelaya-Molina, L. X., Hernández-Rosales, L. M., & Jalonen, R. (2021). Genetic resources of avocado (*Persea americana* Mill.) in Guatemala: A review of their distribution, diversity, and conservation status. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(7), 2617–2632. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01168-6>
- Ruiz-Chután, J. A., Zelaya-Molina, L. X., Sandoval-Zelada, A. M., & Hernández-Ardón, M. (2024). Genetic diversity and population structure analysis of avocados (*Persea americana* Mill.) from Southern Ethiopia and Guatemala using polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers. *Tree Genetics & Genomes*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s11295-023-01634-9>
- Salazar-García, S., González-Durán, I. J. L., & Medina-Torres, R. (2020). Sistemas de producción de aguacate en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 531–545.
- Sánchez-Pérez, R., Ruiz-Chután, J. A., & Jalonen, R. (2019). Caracterización molecular de germoplasma nativo de aguacate en Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 6(2), 145–159.
- Sandoval-Castro, E., Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., de Jesús López-Gómez, P., & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Microsatellite markers reveal genetic diversity in Mexican avocado germplasm. *HortScience*, 56(4), 447–453. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15566-20>
- Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., & Whiley, A. W. (Eds.). (2013). *The avocado: Botany, production and uses* (2nd ed.). CAB International.
- Schnell, R. J., Brown, J. S., Olano, C. T., Power, E. J., Krol, C. A., Kuhn, D. N., & Motamayor, J. C. (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6), 881–889. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.6.0881>
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Sharon, D., Cregan, P. B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav, E., & Lavi, U. (1997). An integrated genetic linkage map of avocado. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5–6), 911–921. <https://doi.org/10.1007/s001220050642>
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 393–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.002141>
- Talavera, A., Soorni, A., Bombarely, A., Matas, A. J., & Hormaza, J. I. (2019). Genome-wide SNP discovery and genomic characterization in avocado (*Persea*

Informe final de Proyecto de Investigación

- americana* Mill.). *Scientific Reports*, 9(1), 20137. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56526-4>
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J. M., & Charrier, A. (2020). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3–4), 551–558.
- Thomson, M. J. (2014). High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breeding and Biotechnology*, 2(3), 195–212. <https://doi.org/10.9787/PBB.2014.2.3.195>
- UPOV. (1991). *International Convention for the Protection of New Varieties of Plants*. International Union for the Protection of New Varieties of Plants.
- Varshney, R. K., Terauchi, R., & McCouch, S. R. (2009). Harvesting the promising fruits of genomics: Applying genome sequencing technologies to crop breeding. *PLoS Biology*, 12(6), e1001883. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001883>
- Viruel, M. A., Escribano, P., Barbieri, M., Ferri, M., & Rallo, L. (2021). Fingerprinting, crossing identification, and productive potential of Arbequina-related olive cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 12, 740595. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.740595>
- Wang, Y., Wang, X., Meng, G., Zhang, L., Farooq, N., Zeng, Q., Xue, W., Ji, L., Liu, S., Ye, N., & Deng, C. (2020). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CIBG1 decreased seed size and promoted seed germination in watermelon. *Horticulture Research*, 7, 65. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0288-2>
- Wiley, A. W., Schaffer, B., & Wolstenholme, B. N. (Eds.). (2002). *The avocado: Botany, production and uses*. CAB International.
- Wolstenholme, B. N., & Wiley, A. W. (1999). Ecophysiology of the avocado (*Persea americana* Mill.) tree as a basis for pre-harvest management. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 77–88.
- Woolf, A. B., Wong, M., Eyres, L., McGhie, T., Lund, C., Olsson, S., Wang, Y., Bulley, C., Wang, M., Friel, E., & Requejo-Jackman, C. (2013). Avocado oil. In *Fruit oils: Chemistry and functionality* (pp. 247–268). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11364-8_12
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(4), 323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations: Vol. 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press.
- Yang, C. J., Russell, J., Ramsay, L., Thomas, W., Powell, W., & Mackay, I. (2021). Overcoming barriers to the registration of new plant varieties under the DUS system. *Communications Biology*, 4(1), 302. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01840-9>
- Yang, M., Xu, L., Liu, Y., Yang, H., Fu, Y., Wang, L., & Liang, G. (2020). Molecular markers and a quality trait evaluation for assessing the genetic diversity of avocado landraces from China. *Agriculture*, 10(4), 102. <https://doi.org/10.3390/agriculture10040102>
- Yazdizadeh, P., Hassani, D., Akbarpour, V., Karimi, S., & Naghavi, M. R. (2020). Association mapping-based discovery and functional analysis of quantitative trait loci for agronomic traits in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Tree Genetics & Genomes*, 16, 61. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-01456-2>



Informe final de Proyecto de Investigación

20 Declaración del coordinador (a) del proyecto de investigación

El coordinador (a) de proyecto de investigación con base en el Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación cofinanciados por medio del Fondo de Investigación, artículo 20, elaboró este informe en función de los datos recabados en el proyecto.

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez	Firma
Fecha: 27/11/25	

21 Aval del director del instituto, centro, unidad o departamento de investigación o coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 19 del Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación cofinanciados por medio del Fondo de Investigación otorgo el aval al presente informe final de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: director del instituto, centro, unidad o departamento de investigación o coordinador de investigación del centro universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

Vo.Bo. Eddi Vanegas Chacón Director Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales	Firma
Fecha: 27/11/2025	

22 Recepción de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. Liuba María Cabrera Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición	Firma
Fecha: 27/11/2025	



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

DC Dirección General
de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Informe final de Proyecto de Investigación

/Digi2025