

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

INFORME FINAL

Estudio de diversidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill) guatemalteco mediante caracterización morfológica y diversos marcadores moleculares.

Equipo de investigación

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez

Coordinador

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután

Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval

Investigador

Guatemala febrero de 2019

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales
Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa de Ciencias Básicas

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
Coordinador del Proyecto

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután
Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval
Investigador

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2018. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.41. durante el año 2018 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas
Financiamiento aprobado por Digi: Q 292,323.74 Financiamiento ejecutado: Q 282,976.49

Índice

1	Resumen	1
2	Palabras clave	1
3	Abstract.....	2
4	Introducción.....	3
5	Planteamiento del problema	4
6	Preguntas de investigación	5
7	Delimitación en tiempo y espacio	5
8	Marco teórico.....	6
8.1	Generalidades sobre el aguacate (Persea americana Mill)	6
8.2	Importancia económica.....	7
8.3	Origen y diversidad genética del aguacate	7
9	Estado del arte	8
9.1	Características genéticas y mejoramiento del aguacate.....	8
9.2	Uso de marcadores moleculares en el estudio de la diversidad del aguacate	9
10	Objetivo general	11
11	Objetivos específicos.....	11
12	Hipótesis	11
13	Materiales y métodos.....	11
13.1	Tipo de investigación.....	11
13.2	Técnicas e instrumentos.....	11
13.2.1	Colecta de muestras de materiales de aguacate en las diferentes regiones del país.....	11
13.2.2	Caracterización morfológica de los materiales de aguacate	13
13.2.3	Determinación de la diversidad genética de materiales de aguacate por medio de marcadores moleculares.....	14
13.2.4	Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos en la longitud fragmentos amplificados (AFLPs).....	15
13.2.5	Identificación de diversidad genética mediante microsatélites (SSR).....	16
13.2.6	Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos de un solo nucleótido	19
13.2.7	Análisis de datos	20
13.2.8	Establecimiento del jardín clonal	21
14	Vinculación, difusión y divulgación.....	22

15	Productos, hallazgos, conocimientos o resultados.....	22
15.1	Caracterización morfológica de los materiales de aguacate.....	22
15.2	Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos en la longitud fragmentos amplificados (AFLPs).....	23
15.3	Identificación de diversidad genética mediante microsatélites (SSR).....	29
15.4	Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos de un solo nucleótido	38
16	Análisis y discusión de resultados	40
16.1	Caracterización morfológica de los materiales de aguacate.....	40
16.2	Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos en la longitud fragmentos amplificados (AFLPs).....	42
16.3	Identificación de diversidad genética mediante microsatélites (SSR) y polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	45
17	Conclusiones.....	50
18	Impacto esperado.....	51
19	Referencias	52
20	Apéndices	58

Índice de figuras

Figura 1. Sitios de colecta de materiales nativos de aguacate guatemalteco.....	12
Figura 2. Toma de datos morfológicos a partir de hojas de aguacate.	14
Figura 3. Gel de poliacrilamida con 10 combinaciones de cebadores para determinar la..... combinación con mayor número de loci polimórficos.	16
Figura 4. Dendrograma generado a partir de los datos morfológicos mediante distancias euclidianas y el método de agrupamiento de Ward para los 210..... individuos analizados.	23
Figura 5. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias.... genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a.. nivel de individuos.....	25
Figura 6. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que.. muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a nivel de poblaciones... Los números en cada uno de los clados muestran el valor de soporte estadístico con el... método bootstraps después de 1000 permutaciones.	26
Figura 7. Análisis de componentes principales de los individuos de aguacate nativo guatemalteco (PCoA)	27
Figura 8. División de las poblaciones en dos ($K = 2$) y tres ($K = 4$) grupos inferidos por el.. programa Structure y Structure Harvester.	28
Figura 9. División de los individuos en dos ($K = 2$) y cuatro ($K = 4$) grupos inferidos por el.. programa Structure y Structure Harvester.	29
Figura 10. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular microstélite ... (SSR) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de.. aguacate nativo guatemalteco a nivel de individuos.	33
Figura 11. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular microsatélite.. (SSR) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de.. aguacate nativo guatemalteco a nivel de poblaciones. Los números en cada uno de los.. clados muestran el valor de soporte estadístico con el método bootstraps después de ... 1000 permutaciones.....	35
Figura 12. Porcentaje de la varianza molecular que muestra el nivel de diversidad genética.... existente entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y dentro de.... todos los individuos.	36
Figura 13. División de las poblaciones en dos ($K = 2$) y cuatro ($K = 4$) grupos inferidos por el programa Structure	37
Figura 14. División de los individuos en dos ($K = 2$) y cuatro ($K = 4$) grupos inferido por... el programa Structure.	38

Figura 15. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular..... polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando las distancias genéticas de..... Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a..... nivel de poblaciones. Los números en cada uno de los clados muestran el..... valor de soporte estadístico con el método bootstraps después de 1000 permutaciones....	39
---	----

Índice de tablas

Tabla 1. Variables utilizadas para realizar la caracterización morfológica del aguacate nativo guatemalteco.....	13
Tabla 2. Detalle de los microsatélites utilizados para el estudio de diversidad genética del ... aguacate nativo guatemalteco.....	16
Tabla 3. Detalle para el protocolo de PCR con los diferentes microsatélites utilizados.	18
Tabla 4. Estructura genética de las poblaciones de aguacate nativo analizadas generada a través del marcador molecular AFLP.....	24
Tabla 5. Estructura genética de las poblaciones de aguacate nativo generada a través del..... marcador molecular AFLP	25
Tabla 6. Matriz de distancias genéticas generadas a partir del índice de Nei	27
Tabla 7. Resumen de la diversidad genética dentro de 7 poblaciones de aguacate nativo guatemalteco.....	30
Tabla 8. Índices de diversidad genética de 7 poblaciones de aguacate nativo guatemalteco... utilizando 11 marcadores microsatélites expresados en valores medios por cada locus..	31
Tabla 9. Análisis de la estructura poblacional mediante los índices F para cada locus.	32
Tabla 10. Matriz de distancias genéticas generadas a partir del índice de Nei.	34
Tabla 11. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la estructura genética poblacional .. del aguacate nativo guatemalteco.....	35
Tabla 12. Comparaciones pareadas de los valores de Fst para las poblaciones analizadas. 36	
Tabla 13. Sitios polimórficos y SNPs detectados en la secuencia de los genes VTE3 y VTE4.	38

Estudio de diversidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill) guatemalteco mediante caracterización morfológica y diversos marcadores moleculares.

1 Resumen

El aguacate es uno de los cultivos de mayor consumo a nivel mundial, originado en las tierras altas del centro y centro-este de México y las tierras altas de Guatemala. Se ha reportado una alta diversidad genética en Guatemala mediante caracterizaciones morfológicas, sin embargo, debido al comportamiento de polinización cruzada e hibridaciones interraciales, esta caracterización presenta complicaciones y no es posible detallar la riqueza genética, pudiéndose generar caracterizaciones erróneas. Los marcadores moleculares son una herramienta útil para este tipo de estudios al estar exentos de efectos ambientales y enfocarse en las diferencias del ADN. Este estudio analizó la diversidad genética del aguacate nativo guatemalteco colectado en siete poblaciones ubicadas en ocho departamentos del país, realizando una caracterización morfológica a través del descriptor de IPGRI y el uso de los marcadores moleculares AFLP, SSR y SNP. Los índices de estructura poblacional permitieron detallar el grado de diversidad genética, la cual presenta una alta diferenciación a nivel de individuos, estimada en un 65% la varianza molecular, los cuales muestran un alta tasa de migración cercana a 5 individuos por cada generación, que ha propiciado el flujo genético reflejado a través de la similitud genética entre las poblaciones estimado en solo 2% de la varianza molecular y resultando en un alto grado de mezcla de los materiales presentes en el país, incrementado así el reservorio genético de la especie, el cual debe ser resguardado para evitar la biopiratería y aprovechado a través de programas de mejoramiento genético para el desarrollo de materiales que satisfagan las necesidades agronómicas y de mercado.

2 Palabras clave

Análisis molecular de varianza, microsatélites, AFLP, SNP, estructura genética

Assessment of genetic diversity of Guatemalan avocado (*Persea americana* Mill.) through morphological characterization and diverse molecular markers

3 Abstract

Avocado is one of the most widely consumed crops worldwide, originated in the highlands of central and central-eastern Mexico and the highlands of Guatemala. It has been reported a high genetic diversity in the country through morphological characterizations, however, due to cross-pollination and interracial hybridizations, the morphological characterization presents complications and it is not possible to detail the genetic richness, being able to generate erroneous characterizations. Molecular markers are a useful tool for this type of studies to be exempt from environmental effects and focus on DNA differences. This study analyzed the genetic diversity of the Guatemalan native avocado collected in seven populations located in eight departments of the country, performing a morphological characterization through an IPGRI descriptor, in addition the molecular markers AFLP, SSR and SNP. The genetic population structure statistics allowed to detail the genetic diversity degree of the specie, wich presents a high differentiation at individual level estimated in 65% of the molecular variance, wich shows a high rate of migration that has favored the genetic flow reflected through the genetic similarity between population estimated in just 2 % of molecular variance and resulting in a high degree of mixture of materials present in the country, thus increasing the genetic reservoir of the species, which must be protected to avoid biopiracy and exploited through genetic improvement programs for the development of materials that satisfy the agronomic and commercial needs.

Key words: Analysis of molecular variance, AFLP, SSR, SNP, genetic structure

4 Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae, la cual incluye alrededor de 50 géneros, siendo considerada una de las familias de angiospermas más antiguas, según Renner (citado en Galindo, Ogata & Arzate, 2008). El cultivo del aguacate, característico por acumular aceite en su pulpa en lugar de azúcares, es uno de los frutales de mayor importancia económica para México y Centroamérica. Se caracteriza por ser una especie perenne subtropical, aunque ha sido adaptada a diversos climas, por lo cual su producción se ha extendido desde el norte al sur de América, la región caribeña, Asia, África, Medio Este y Europa (Galindo & Arzate, 2010; Guzmán, Machida, Borrayo, Cortés, & Jarret, 2017).

El aguacate representa un cultivo de gran importancia debido a su valor cultural y a sus propiedades nutricionales características. En la región mesoamericana, fue ampliamente utilizado y domesticado por la población indígena, mucho antes de la llegada de los exploradores europeos (Galindo, Arzate, Ogata, & Landero, 2007). Según datos del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (Maga) 2016, Guatemala tuvo una producción en el año 2016 de 122,440.91 toneladas métricas de aguacate, los cuales fueron cosechados en un área de 11,572 hectáreas alcanzando un rendimiento de 10.58 Tm/ha. Para el mismo año tuvo una exportación de 4,028.24 toneladas métricas lo que representó un valor de US\$ 1,093,338 siendo El Salvador y Honduras los principales destinos del aguacate guatemalteco.

Williams (citado en Gutiérrez Díez, Sánchez González, Torres Castillo, & Ojeda Zacarías, 2015) menciona que el centro de origen del aguacate se localiza en las tierras altas del centro y centro-este de México, así como en las tierras altas de Guatemala. Hasta el momento se reconocen tres razas (mexicana, guatemalteca y antillana) las cuales están distribuidas en la región mesoamericana (Fiedler, Bufler, & Bangerth, 1998). La taxonomía y nomenclatura aún no se encuentran definidas por completo, ya que la filogenia de esta especie ha sido difícil de estudiar, en parte por el alto grado de hibridación que presenta esta especie, dejando poco definidas las relaciones dentro de la familia Lauraceae (Galindo et al.,

2011). El tipo de evolución reticulada y la amplia complejidad genética, han dificultado el estudio de la diversidad y relaciones genéticas de esta especie, pero el desarrollo y aplicación de los marcadores moleculares ha ayudado a resolver esta problemática (Azofeifa, 2006). Esta investigación tiene como objetivo detallar la diversidad genética de los materiales de aguacate nativos de siete poblaciones localizadas en ocho departamentos del país a través de una caracterización morfológica y el uso de los marcadores moleculares polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) microsatélites SSR y polimorfismo de un solo nucleótido SNP. A partir de los datos moleculares se realizará un análisis de estructura poblacional para determinar el grado de diversidad a nivel de poblaciones y de individuos analizados.

5 Planteamiento del problema

Guatemala es considerada como uno de los ocho centros de origen y diversificación de plantas cultivadas a nivel mundial, según Vavilov (citado en León, 2003). Williams (citado en Gutiérrez Díez et al., 2015) menciona que, dentro de la variedad de especies localizadas en el territorio guatemalteco, el aguacate es uno de los cultivos de importancia económica que encuentra su origen en el país, junto con otras zonas de Mesoamérica, por lo cual la diversidad de éste en el país es muy amplia. A pesar que se han realizado esfuerzos para describir la diversidad de esta especie (Azurdia et al., 2011) existe la necesidad de valerse no solamente de marcadores morfológicos, debido a que estos están influenciados por factores ambientales y fenológicos (Azofeifa, 2006).

El estudio de la diversidad del aguacate presenta complicaciones debido a su comportamiento de polinización cruzada e hibridaciones interraciales, que han resultado en cultivares modernos con mezcla de las tres razas hortícolas (mexicana, guatemalteca y antillana) que son complejos y con frecuencia erróneamente caracterizados (Ashworth & Clegg, 2003); esta situación ha impedido tener un conocimiento detallado de los recursos genéticos de aguacate con los que cuenta el país, caso contrario a México, donde se han desarrollado constantes estudios para conocer la diversidad de esta especie (Cuiris, Guillén, Pedraza, López, & Vidales, 2009; Galindo et al., 2011; Gutiérrez et al., 2009; Rincón, Sánchez, & Espinosa, 2011).

El desconocimiento del germoplasma de aguacate presente en Guatemala, resulta en la incapacidad de defender este recurso fitogenético ante la constante amenaza, principalmente por parte de entes extranjeros, de patentar este tipo de recursos, cayendo finalmente en la biopiratería, la cual es definida por Delgado (2001) como el proceso a través del cual se lleva a cabo un saqueo biótico en las zonas altamente biodiversas. Dada la constante necesidad del mejoramiento genético de especies de interés económico, como lo es el aguacate, los países catalogados como centros de origen, en el caso de Guatemala, están expuestos al proceso de biopiratería, razón suficiente para motivar el desarrollo de estudios que lleven al conocimiento detallado de la riqueza y diversidad genética con la que cuenta el país, siendo el aguacate el caso de estudio en esta investigación

6 Preguntas de investigación

Pregunta central

- ¿Cuál es la diversidad genética del aguacate nativo guatemalteco en las poblaciones bajo estudio?

Preguntas secundarias

- ¿Cuál es la diversidad genética del aguacate a través de una caracterización con marcadores morfológicos?
- ¿Cuál es la diferencia, en cuanto a la capacidad de identificación de polimorfismos en el ADN para la determinación de diversidad genética de aguacate, entre los marcadores moleculares AFLP, SSR, SNP?
- ¿Cuál de los marcadores morfológicos o moleculares es más eficiente en estudios de diversidad genética de aguacate?

7 Delimitación en tiempo y espacio

La investigación se realizó durante el periodo de febrero a noviembre del año 2018 constando de tres fases: campo, laboratorio y gabinete. En la fase de campo se realizó la colecta de materiales de aguacate nativos en 8 departamentos del país. Esta fase se llevó a cabo a partir del mes de febrero y finalizó en julio. En esta fase también comprendió la preparación de injertos para el establecimiento de un jardín clonal en el Centro Experimental

Docente de Agronomía (Ceda) preservando así el germoplasma colectado. Durante el mes de marzo hasta octubre se realizó la fase de laboratorio, en la cual se estandarizó y desarrolló el protocolo de extracción de ADN, así como de los diferentes marcadores moleculares a utilizar. Posteriormente, se analizó la información generada por los diferentes marcadores moleculares y morfológico con lo desarrollo de los árboles filogenéticos y demás índices de similitud para determinar la diversidad genética existente entre los materiales de aguacate analizados. La fase de laboratorio y gabinete se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía y el laboratorio de Biología Molecular de la Faculty of Tropical AgriSciences, CzechUniversity of LifeSciences, Prague en República Checa

8 Marco teórico

8.1 Generalidades sobre el aguacate (*Persea americana* Mill)

El aguacate (*Persea americana* Mill.) representa un cultivo de gran importancia para México y Centroamérica debido a su valor cultural y a sus propiedades nutricionales características. En la región mesoamericana, fue ampliamente utilizado y domesticado por la población indígena, mucho antes de la llegada de los exploradores europeos (Galindo et al., 2007). La industria internacional del aguacate está basada sobre cultivares relativamente nuevos en comparación con la industria de otros árboles frutales. Esta situación sugiere que únicamente una pequeña parte de los recursos genéticos del género *Persea* han sido desarrollados, por lo cual es importante la protección y desarrollo del germoplasma criollo de este cultivo (Thorpe & Hallet, 1999). El aguacate es una especie ubicada dentro de la familia Lauraceae, la cual incluye alrededor de 50 géneros y es considerada como una de las familias de angiospermas más antiguas según Renner (citado en Galindo et al., 2008). Esta especie se caracteriza por acumular aceite en su pulpa en vez de azúcares. A pesar de ser considerada como una especie perenne subtropical, ha sido adaptada a diversos climas, por lo cual su producción se ha extendido desde el norte al sur de América, la región caribeña, Asia, África, Medio Este y Europa (Galindo & Arzate, 2010; Guzmán et al., 2017)

8.2 Importancia económica

La producción y el comercio de aguacate en el mundo es estimulada, principalmente, a su utilización como alimento, el cual posee una alta concentración de energía en su pulpa, además de contener proteínas y minerales. Esta especie también tiene propiedades medicinales, varios cultivares poseen cualidades antirraquíticas y un alto poder vermífugo. El aceite que se extrae se puede utilizar en fricciones para aliviar la gota y el reumatismo. La infusión de sus hojas se emplea para combatir la fiebre, cólicos menstruales y migraña. También es empleado en la cosmetología para la piel y el cabello con excelentes resultados, según mencionan Belén y también Santillán (citados en Álvarez, Ávila, & Coto, 2015). Recientemente se ha comprobado que el aguacate es el vegetal que contiene más carnitina, un ácido aminado que interviene en el metabolismo del músculo cardíaco, por lo que se está usando en el tratamiento de cardiopatías y en la falta de apetito (Viikari, Niinikoski, Raitakari, & Simell, 2009).

8.3 Origen y diversidad genética del aguacate

Williams (citado en Gutiérrez et al., 2015) menciona que el centro de origen del aguacate se localiza en las tierras altas del centro y centro-este de México, así como en las tierras altas de Guatemala. Actualmente, se reconocen ampliamente tres razas de aguacate: (1) *Persea americana* var. *Drymifolia* (Schlecht. et al. Cham. Blake) (Mexicana) caracterizada por su relativa tolerancia al frío y por sus frutos pequeños cubiertos por una delgada cáscara de color negro-morado; (2) *P. americana* var. *Guatemalensis* L. Wms. (guatemalteca) poco tolerante al frío, frutos con cáscara gruesa y rugosa que se mantiene verde hasta la maduración; (3) *P. americana* var. *americana* (antillana) adaptada a condiciones climáticas tropicales, frutos con cáscara suave, fácil de pelar y pulpa con un sabor casi dulce, que no se encuentra en las otras dos variedades, según Williams y también Bergh y Ellstrand (citado en Corona, Galindo, Lee, & Landero, 2016).

Las razas anteriormente mencionadas se encuentran ampliamente distribuidas en la región mesoamericana (Fiedler et al., 1998) y la mayoría de variedades comerciales conocidas en la actualidad han sido encontradas dentro de estas, aunque hay controversia en

cuanto a su diferenciación debido a la alta variabilidad en la progenie. Previo a la llegada de los exploradores españoles, se asume que las razas fueron separadas con poca o ninguna movilidad debido a las condiciones topográficas, barreras climáticas y el gran tamaño de la semilla. Actualmente, las razas han sufrido cruzamiento en muchas regiones de América y numerosas colecciones muestran una clara introgresión racial, según Gama (citado en Reyes, Valadez, & Barrientos, 2016). El hábito de floración y la polinización cruzada del aguacate, junto con su forma prolífica y un bajo conjunto de frutos, son otros factores que impiden la comprensión del linaje de los cultivares y razas actuales (Reyes et al., 2016).

La diversidad genética juega un papel importante, no solo en la preservación de la biodiversidad, sino también en aspectos ecológicos y culturales, tales como la dieta y economía (Rincón et al., 2011; Sarr, Goeschl, & Swanson, 2008). Algunos proyectos han sido desarrollados con la finalidad de evitar la pérdida de este importante recurso. La conservación de las especies depende en gran manera de la naturaleza de su semilla, pudiendo estas ser de tipo ortodoxas o recalcitrantes, siendo la segunda el tipo de semilla propia del aguacate (Guzmán, Machida-hirano, et al., 2017).

9 Estado del arte

9.1 Características genéticas y mejoramiento del aguacate

Según García (citado en Álvarez et al., 2015) el número de cromosomas (cariotipo) del aguacatero solo se ha estudiado en algunas especies: *P. americana*, *P. nubigena*, *P. borbonia*, *P. longipes*, *P. floccosa*, *P. palustris*, *P. cinerascen*, *P. schiedeana*, *P. indica*, *P. donnellsmithii* y *P. pachypoda* todos con el número cromosómico de $2n=24$ y solamente se ha identificado una sola especie tetraploide, *P. hintonii*. Es posible que el progenitor salvaje del aguacate cultivado haya sido un árbol polimórfico que abarcó una amplia zona geográfica desde el este y el altiplano central de México a través de Guatemala hasta la costa Pacífica de América Central. García (citado en Álvarez et al., 2015) menciona que los pueblos neolíticos seleccionaron descendientes primitivos domesticados (formas salvajes) desde estas poblaciones, reemplazando completamente el ancestro salvaje de la especie *P. americana*

por tres ecotipos bien caracterizados por sus posibles centros de origen, como las razas hortícolas ya mencionadas.

Datos etnobotánicos y estudios con marcadores genéticos sugieren que estas tres razas fueron domesticadas de forma independiente y no entraron en contacto hasta el siglo XVI con los europeos. A finales del siglo XIX la mejora del aguacatero ganó impulso vía hibridaciones interraciales entre cultivares de la raza guatemalteca y germoplasma mexicano en California y entre germoplasma cubano en Florida (raza antillana) y la raza guatemalteca. Un largo periodo de polinización abierta e hibridaciones interraciales han resultado en cultivares modernos con mezcla de las tres razas hortícolas que son complejos y con frecuencia erróneamente caracterizados (Ashworth & Clegg, 2003).

La taxonomía y nomenclatura aún no se encuentran definidas por completo, ya que la filogenia de esta especie ha sido difícil de estudiar, dejando poco definidas las relaciones dentro de la familia Lauraceae (Galindo et al., 2011). La reciente sugerencia de dos poblaciones genéticas basadas en diferencias latitudinales en las tierras altas de México deberá estimular la realización de análisis genéticos futuros en México y América Central. Debido a que esta especie es uno de los primeros árboles domesticados en el Neotrópico, puede ser utilizado como modelo de la domesticación de árboles en áreas con una alta diversidad biológica (Galindo et al., 2008). La habilidad para esclarecer el origen híbrido complejo de varios cultivares debe proveer una guía útil para los que manejan los recursos genéticos (Chen, Morrel, Ashworth, De La Cruz, & Clegg, 2009). Debido a que, como ya se ha explicado, esta especie presenta un alto grado de hibridación, la evaluación de las relaciones genéticas permite distinguir diferentes taxa e identificar material promisorio para programas de mejoramiento (Galindo et al., 2011).

9.2 Uso de marcadores moleculares en el estudio de la diversidad del aguacate

El tipo de evolución reticulada y la amplia complejidad genética, han dificultado el estudio de la diversidad y relaciones genéticas de esta especie. Actualmente, los estudios de diversidad genética se auxilian de marcadores morfológicos y moleculares, aunque la primera está sujeta a factores ambientales o fenológicos, siendo esto una fuerte limitante;

mientras los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier material vegetal, no importa la época del año en que se realiza el análisis y están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa, 2006)

El desarrollo de los marcadores basados en el ADN ha tenido impacto en las investigaciones relacionadas al aguacate. Los marcadores basados en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RestrictionFragmentLengthPolymorphism, RFLP) se utilizaron en estudios evolutivos, filogenéticos (Furnier, Cummings, & Clegg, 1990) y genealógicos (Davis et al., 1998). Otros tipos de marcadores como los minisatélites fueron utilizados para estudios similares y con los mismos resultados en relación con la identificación de las tres razas hortícolas ya descritas (Mhameed et al., 1997), estudios similares fueron realizados empleando marcadores basados en el ADN polimórfico amplificado al azar (RandomAmplifiedPolymorphic DNA, RAPD) y microsatélites (Acheampong et al., 2008; Chang, Lu, Liu, & Chen, 2003; Cuiris et al., 2009; Fiedler et al., 1998).

Estudios a través de ISSR también han sido desarrollados (Cuiris et al., 2009; Reyes-Alemán et al., 2017). Los microsatélites (SSR) han sido utilizados con éxito. Algunos autores estimaron en 45,000 el número de estos presentes en el genoma de este cultivo y marcadores de este tipo se desarrollaron para estudios de relaciones genéticas entre cultivares (Alcaraz & Hormaza, 2007; Ashworth, Kobayashi, De La Cruz, & Clegg, 2004). Asimismo, marcadores como los basados en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AmplifiedFragmentLengthPolymorphism, AFLP) también son útiles, debido a su alto poder discriminatorio, a pesar de ser marcadores de tipo dominantes (Cañas, Galindo, Arango, & Saldamando, 2015; Cerda-Hurtado et al., 2015; Gutiérrez et al., 2009; Nerdo et al., 2009; Ramírez et al., 2005) en algunos estudios, al utilizar AFLPs se ha necesitado del uso de marcadores más específicos como SSRs para diferenciar cultivares (Gutiérrez et al., 2009).

10 Objetivo general

- Identificar la diversidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill) en el territorio nacional.

11 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente los materiales de aguacate colectados.
- Caracterizar molecularmente los materiales de aguacate colectados.
- Evaluar la eficiencia entre los diferentes marcadores moleculares y morfológico.

12 Hipótesis

Los materiales nativos de aguacate colectados serán genéticamente diversos, existiendo un marcador molecular con mayor capacidad de detección de regiones polimórficas entre los materiales evaluados, el cual será más eficaz en comparación al marcador morfológico en la identificación de diversidad genética.

13 Materiales y métodos

13.1 Tipo de investigación

La presente propuesta de investigación presenta un enfoque cuantitativo y con un alcance exploratorio, la cual tiene como finalidad la identificación de la diversidad genética de los materiales de aguacate presentes en el país, lo cual constituye una primera etapa de un posterior proyecto de mejoramiento.

13.2 Técnicas e instrumentos

13.2.1 Colecta de muestras de materiales de aguacate en las diferentes regiones del país

Basado en la información del atlas guatemalteco de parientes silvestres de plantas cultivadas (Azurdia et al., 2011) se colectaron materiales nativos de aguacate de Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Totonicapán, Quiché, Huehuetenango, Alta Verapaz, Baja Verapaz, por ser considerados como las regiones con mayor riqueza genética en este cultivo. Se tomaron muestras en 7 poblaciones con un número variable de individuos en cada

una debido a la accesibilidad y disponibilidad de materiales nativos en cada población teniendo un total de 210 muestras, las cuales fueron identificadas con número correlativo y la asignación de coordenadas geográficas (Figura 1). El número total de individuos analizados por cada marcador molecular sufrió variación debido a la calidad e integridad del ADN. Para el análisis de diversidad genética se procedió a tomar, de cada individuo, 5 hojas jóvenes ubicadas en las puntas de las ramas, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas debidamente identificadas y almacenadas en frío. Las muestras fueron trasladadas a las instalaciones del laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía. Para el caso del establecimiento del jardín clonal, las muestras consistieron de varetas, las cuales son definidas como una porción de material vegetal procedente del tallo con presencia de yemas axilares, generalmente colectadas de las regiones aéreas donde el tejido es joven y por lo cual no se encuentra completamente lignificado. Se procedió a tomar 5 varetas de cada árbol de aguacate, debido a riesgo de pérdida durante el proceso de injerto, las cuales se obtuvieron mediante el corte de estas con la ayuda de tijeras podadoras. Las varetas fueron colectadas de los árboles genéticamente más diversos entre si tras haberse realizado en análisis con el marcador molecular AFLP.

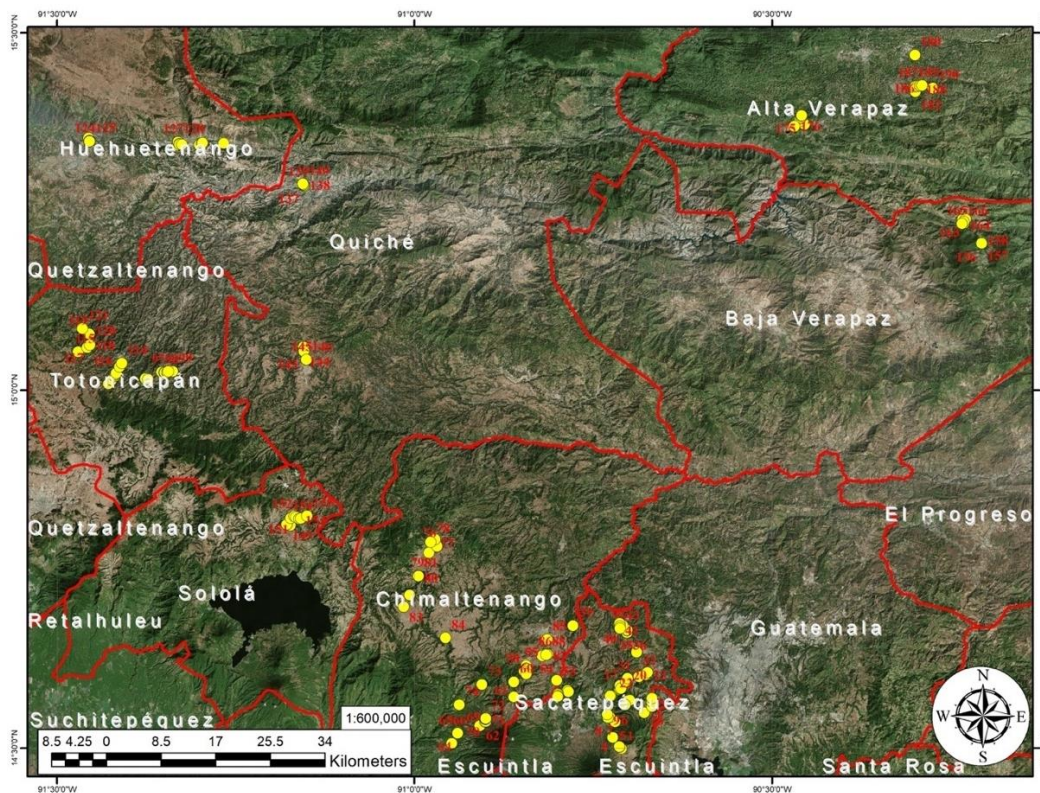


Figura 1. Sitios de colecta de materiales nativos de aguacate guatemalteco

13.2.2 Caracterización morfológica de los materiales de aguacate

De las plantas seleccionadas para realizar las colectas se procedió a realizar una caracterización morfológica siguiendo el descriptor propuesto por el instituto internacional de recursos fitogenéticos (IPGRI, 1995). La siguiente tabla detalla las variables que fueron medidas, así como el tipo (cualitativa o cuantitativa), la unidad de medición y el método empleado. Para la evaluación de las variables, se procedió a extraer el material vegetal del árbol como hojas, vástagos, ramas etc. Los datos como altura o ancho de copa, estos fueron medidos a través de los instrumentos que se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. *Variables utilizadas para realizar la caracterización morfológica del aguacate nativo guatemalteco.*

	Variable	Unidad de medida	Método
Cuantitativas	Altura del árbol	cm	Medición con clinómetro
	Ancho de copa	cm	Medición con relascopeo
	Circunferencia del tronco	cm	Medición con cinta métrica a la altura del pecho (1.50 mt)
	Longitud entrenudos en los vástagos	cm	Medición con cinta métrica
	Diámetro de los vástagos	cm	Medición con vernier
	Longitud de las hojas	cm	Medición con regla graduada
	Número de venas primarias	Numeración	Conteo
Cualitativas	Forma del árbol	Asignación de valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Superficie del tronco	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Patrón de ramificación	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Distribución de las ramas	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Ángulo inserción de ramas	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Color de las ramas jóvenes	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Superficie de las ramas jóvenes	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Color de las hojas maduras	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Ángulo de inserción del peciolo foliar	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Margen de las hojas	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Textura de la hoja	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Forma de la hoja	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
	Pubescencia en el haz	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
Pubescencia en el envés	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica	

Tabla 1. Continuación

Variable	Unidad de medida	Método
Divergencia de venas primarias respecto a la vena principal	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
Relieve nervadura en el haz	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
Forma del ápice de la hoja	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica
Forma de la base de la hoja	Valores en escala ordinal	Escala pictográfica



Figura 2. Toma de datos morfológicos a partir de hojas de aguacate.

13.2.3 Determinación de la diversidad genética de materiales de aguacate por medio de marcadores moleculares

Para la extracción se utilizó el kit comercial Genra añadiendo algunas modificaciones para evitar la oxidación del material biológico. Se tomó una sección de cada hoja de aproximadamente 4 X 4 mm dentro de un tubo de 1.5 mL al cual se le agregaron 450 uL de Cell Lysis Solution (+ 1% PVP, + 0.3% mercaptoetanol) y se procedió a macerar. Seguido se agregaron 2.25 uL de proteinasa K (100 ug/mL) y se dejó incubar por 3 horas a 55 °C realizando mezclas por inversión cada 30 min. Seguido se agregaron 2.5 uL de solución RNasa A (4 mg/mL) y se mezcló por inversión 25 veces dejando incubar nuevamente por 45 min a 37°C. Posterior, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 150 uL de Protein Precipitation Solution, se mezcló 150 veces por inversión, se colocó por 20 min dentro de la refrigeradora a -20°C, luego fue centrifugado a 14,000 rpm durante 4 min y el

sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Se agregaron 600 uL de una solución fenol : cloroformo : isoamil alcohol en una relación 25:24:1 se mezcló por inversión, se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 600 uL de cloroformo (24) : isoamil alcohol (1) y se mezcló por inversión, se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 600 uL de isopropanol y se mezcló por inversión 50 veces, se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm, se descartó el isopropanol, se agregaron 500 uL de etanol al 70%, se mezcló por inversión para lavar la pastilla de ADN, se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm invirtiendo el tubo para descartar el etanol y dejando secar por 10 a 15 min sobre papel absorbente. Para la hidratación del ADN se agregaron 50 uL de DNA Hidratation Solution, se incubó a 65°C por 1 hora y finalmente se almacenó a -20°C.

13.2.4 Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos en la longitud fragmentos amplificados (AFLPs)

El marcador molecular AFLP (Vos et al., 1995) se basa en la digestión de fragmentos de ADN usando las enzimas EcoRI/MseI y la posterior ligación de adaptadores y luego estos son amplificados con primers que tienen solo un nucleótido selectivo en el extremo 3' del primer, posteriormente se realiza otra amplificación con cebadores que contienen tres nucleótidos selectivos en el extremo 3' del primer. El análisis se realizó mediante el Kit AFLP Análisis SystemI de Invitrogen®. En resumen, la metodología utilizada fue la siguiente: se utilizó ADN a una concentración de 25 ng/μl, el cual fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI/MseI e incubado por 2 horas a 37°C, después a 70°C por 15 min. La ligación de los adaptadores se hizo con los reactivos del kit y se incubó 2 horas a 20°C. Seguidamente se hizo una preamplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa con el siguiente perfil térmico en el termociclador: 94°C por 30 seg, 56°C por 60 seg, 72°C por 60 seg, el termociclador será programado para 20 ciclos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Se realizó una amplificación selectiva con los cebadores M-CAA + E-AAC por haber mostrado el mayor polimorfismo. Los productos de PCR se corrieron en una gel de poliacrilamida al 5% en la cual se visualizaron las bandas amplificadas Figura 3.

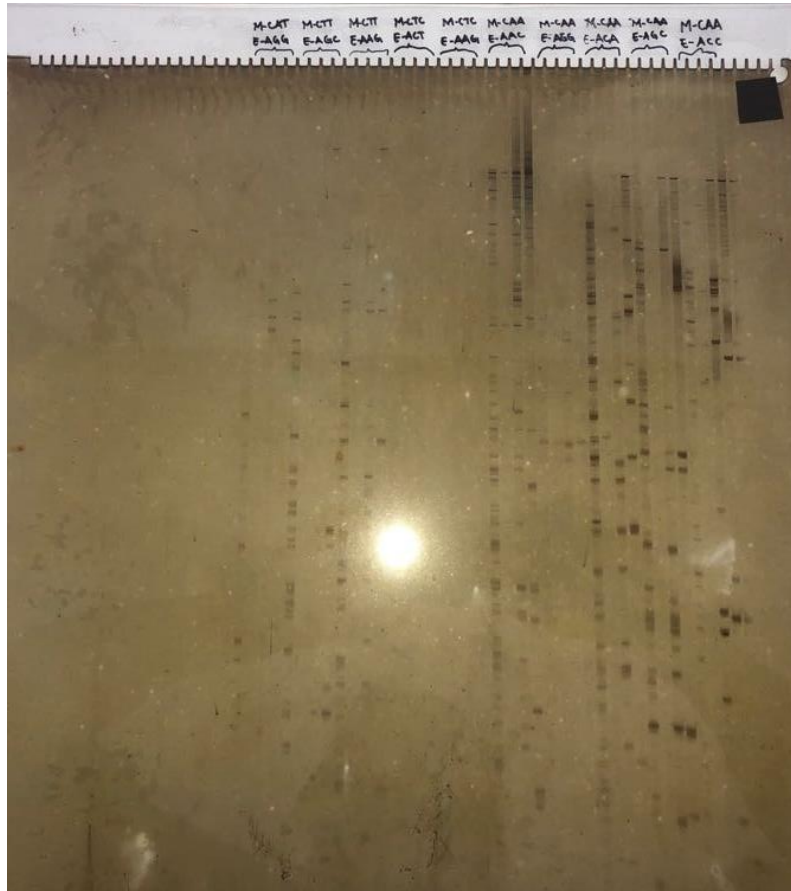


Figura 3. Gel de poliacrilamida con 10 combinaciones de cebadores para determinar la combinación con mayor número de loci polimórficos.

13.2.5 Identificación de diversidad genética mediante microsatélites (SSR)

Esta técnica permite identificar secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva. En este estudio se emplearon 11 microsatélites desarrollados por Sharon y colaboradores (1997) y Ashworth y colaboradores (2004) los cuales se muestran en la Tabla 2

Tabla 2. Detalle de los microsatélites utilizados para el estudio de diversidad genética del aguacate nativo guatemalteco.

Nombre	Ta*	Rango alélico (pb)	Repetición**	Fluorocromo/color	Concentración
AVAG05_F	64.3	83-125	(AG) ₁₀	6-FAM	0.3
AVAG05_R					

Tabla 2. Continuación

Nombre	Ta*	Rango alélico (pb)	Repetición**	Fluorocromo/color	Concentración
AVAG13_F		96-160	(CT) ₁₈	VIC	0.3
AVAG13_R					
AVAG11_F		105-161	(AG) ₂₀	PET	1.2
AVAG11_R					
AVT436_F		152	(ATC) ₉	NED	0.3
AVT436_R					
AVAG21_F		158-221	(CT) ₂₂	VIC	0.25
AVAG21_R	57.6				
AVAG22_F		103-137	(GA) ₁₅	NED	0.25
AVAG22_R					
AVMIX04_F		160-194	(AG) ₁₂ (CAA) ₅ (ACAG) ₁₀	6-FAM	0.7
AVMIX04_R					
AVAG07_F		98-114	(TC) ₁₅	6-FAM	0.5
AVAG07_R	57.6				
AVAG25_F		96-140	(TC) ₁₄	PET	0.25
AVAG25_R					
AUCR418_F		379	(GT) ₁₂ (GA) ₁₃	VIC	0.5
AUCR418_R					
AVD001_F		208-267	(CT) ₁₂	NED	0.5
AVD001_R	65.0				
AVD022_F		220-258	(TC) ₁₃	PET	1
AVD022_R					

Nota: Ta* = temperatura de alineamiento durante desarrollo de PCR. Repetición** = secuencia breve de nucleótidos utilizada como sitio de reconocimiento en el genoma.

El protocolo para el desarrollo del PCR se muestra en la Tabla 3. Debido a la diferencia en las temperaturas de alineación de algunos de los microsatélites, estos fueron organizados en tres grupos para poder realizar las reacciones múltiples en el termociclador, cada uno de estos grupos está representado en la Tabla 3 como multiplex. Para llevar a cabo las reacciones se utilizó el Qiagen Multiplex PCR plus. El perfil térmico consistió de 15 min a 95°C seguido de 35 ciclos de 95°C (30 s), temperatura de alineación específica para cada primer (1 min), 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (10 min).

Tabla 3. *Detalle para el protocolo de PCR con los diferentes microsatélites utilizados.*

Nombre del compuesto	Cantidad en uL	Multiplex
Master mix	2.5	
AVAG05_F	0.15	
AVAG05_R	0.15	
AVAG13_F	0.15	
AVAG13_R	0.15	
AVAG11_F	0.3	1
AVAG11_R	0.3	
AVT436_F	0.15	
AVT436_R	0.15	
ADN	1	
Master mix	2.5	
AVAG21_F	0.125	
AVAG21_R	0.125	
AVAG22_F	0.125	
AVAG22_R	0.125	
AVMIX04_F	0.175	
AVMIX04_R	0.175	2
AVAG07_F	0.125	
AVAG07_R	0.125	
AVAG25_F	0.125	
AVAG25_R	0.125	
AUCR418_F	0.125	
AUCR418_R	0.125	
ADN	1	
Master mix	2.5	
AVD001_F	0.25	
AVD001_R	0.25	3
AVD022_F	0.5	
AVD022_R	0.5	
ADN	1	

Para llevar a cabo el análisis de fragmentos y así establecer el tamaño de cada alelo amplificado se tomó cada producto del PCR, el cual se mezcló con una solución de

formamide deionized sequencing grade (12 uL) y Gene Scan™ LIZ dye standard (0.2 uL). Posteriormente las muestras mezcladas fueron incubadas durante 10 minutos a 95 C antes de trasladar las muestras al secuenciador. El análisis de fragmentos para la determinación del tamaño específico de cada alelo identificado en cada locus se realizó con el Genetic Analyzer 3500 de Applied Biosystems. La metodología anteriormente descrita para este marcador se llevó a cabo en las instalaciones de los laboratorios de biología molecular de Faculty of Tropical AgriSciences (FTA) y Faculty of Environmental Sciences (FES) ambas ubicadas en el campus de la Czech University of Life Sciences (CULS) en la ciudad de Praga República Checa.

13.2.6 Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos de un solo nucleótido

Un Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) se define como un locus genómico (posición genética) donde existen dos o más bases nucleotídicas alternativas con frecuencias apreciables en la población (> 1%) (Reyes et al., 2016). Para la identificación de SNPs se utilizaron los genes VTE3 y VTE4 los cuales están implicados en la biosíntesis de tocoferol, sustancia que está relacionada con la actividad antioxidante lipofílica de la vitamina E, presente en la pulpa del aguacate. Dichos genes han presentado secuencias variantes en nucleótidos individuales, por lo que serán útiles en la identificación de diversidad genética en los materiales de aguacate (Peraza et al., 2017; Quadrana et al., 2014)

El protocolo para la PCR fue el siguiente: volumen de reacción de 15 µl, conteniendo: 1 µl de ADN genómico (10 ng/µl), 7,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µl de cada primer (10µM cada uno) y 4,5 µl de agua libre de nucleasas. La reacción consistió de un paso de desnaturalización de 95°C (3 min), seguido por 35 ciclos de 94°C (1 min), 53.7°C (30 s), 68°C (1 min), y una extensión final de elongación de 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron purificados con el QIAquick PCR Purification Kit. La metodología anteriormente descrita fue desarrollada en las instalaciones del laboratorio de biología molecular de FTA y posteriormente enviados al laboratorio de biología molecular de Univerzita Karlova para realizar el análisis de secuenciación.

13.2.7 Análisis de datos

A partir de los geles de poliacrilamida generados con el marcador AFLP, se creó una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) para cada uno de los loci amplificados en las muestras analizadas. Esta tabla fue exportada en formato .CVS hacia el programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Past3 (Ryan, Hammer, & Harper, 2001) con el cual se generó una matriz de distancias genéticas con el índice de Nei a partir de la cual se desarrolló un análisis de conglomerados a través el método UPGMA generando un dendrograma a nivel de individuos que fue exportado en formato TextEdit hacia el programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2008) para generar el dendrograma de tipo circular. El análisis de conglomerados para generar el dendrograma a nivel de poblaciones se realizó con el programa R y el complemento “ape” (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004). El análisis de componentes principales fue generado con el programa Past3.

Para análisis de la estructura genética se calculó el número de loci amplificados, número de loci polimórficos, el porcentaje de loci polimórficos, la heterocigosidad esperada bajo una proporción genotípica en equilibrio de Hardy-Weinber, la diversidad genética total, diversidad genética promedio dentro de las poblaciones, la diversidad genética entre las poblaciones, el índice de fijación de Wright y la matriz de distancias genéticas con el índice de Nei utilizando el programa AFLP-Surv 1.0 (Vekemans, Beauwens, Lemaire, & Ruiz-Roldán, 2002). Para el análisis de inferencia sobre la estructura y división de las poblaciones e individuos analizados a través del método bayesiano se empleó el programa Structure V 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) y para la aplicación del método de Evanno se empleó el programa Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

Para la lectura de los tamaños de los alelos identificados en cada uno de los locus analizados se empleó el programa GeneMarker V 1.8 (Soft Genetics, State College, PA, USA) y los datos fueron exportados hacia el programa GenALEX V 6.5.02 (Peakall & Smouse, 2006, 2012) y R a través del complemento “PopGenReport” (Adamack & Gruber, 2014) para calcular los estadísticos F de Wrigth (Wright, 1951, 1965) los cuales incluyeron F_{IS} = Coeficiente de endogamia de un individuo (I) respecto de la subpoblación (S), F_{IT} =

coeficiente de endogamia de un individuo (**I**) respecto a la población total (**T**), F_{ST} = diferenciación genética entre poblaciones, efecto de las subpoblaciones (**S**) comparado al total de la población. Con el mismo programa se calculó el valor medio dentro de cada población de los siguientes índices: número de alelos por locus, número de alelos efectivos, riqueza alélica, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y el índice de fijación.

Estos mismos índices fueron calculados de manera individual para cada locus analizado, añadiendo la cantidad de alelos identificados dentro de todas las poblaciones y el porcentaje de loci polimórficos. También fue calculado el valor del flujo genético para cada locus y el valor total entre las poblaciones. El análisis de varianza molecular también fue desarrollado con el programa GeneALEx v6.5.02. Con el programa estadístico R y el complemento “ape” se generó el dendrograma de diversidad genética de a nivel de individuos y a nivel de poblaciones mediante el índice de Nei. Para el análisis de inferencia sobre la estructura y división de las poblaciones e individuos analizados a través del método bayesiano se empleó el programa Structure V 2.3.4. y para la aplicación del método de Evanno se empleó el programa Structure Harvester.

Para la alineación de secuencias genéticas y la elaboración del dendrograma a nivel de poblaciones se empleó el programa Molecular Evolutionary Genetis Analysis MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

13.2.8 Establecimiento del jardín clonal

Con los datos obtenidos de los marcadores moleculares se escogieron 50 árboles genéticamente diversos tomando 5 varetas de cada uno de los árboles seleccionados, las cuales fueron injertadas sobre patrones obtenidos de semilla de árboles nativos. Las plantas de aguacate fueron establecidas dentro de un invernadero ubicado en el Centro Experimental Docente de Agronomía para lograr su adecuado desarrollo y condiciones para el transplante al campo.

14 Vinculación, difusión y divulgación

- Se tuvo el apoyo de Czech University of Life Science a través de los laboratorios de biología molecular de Faculty of Tropical AgriScience y Faculty of Environmental Sciences en los cuales se optimizaron y desarrollaron los protocolos de los marcadores moleculares SNP y SSR. Ambos laboratorios brindaron reactivos químicos, equipo especializado y capacitación en análisis de datos, absorbiendo los costos generados como parte de la cooperación con este proyecto.
- Se redactó un artículo para la revista Ciencia Tecnología y Salud de la Digi, como parte del compromiso del proyecto.

15 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

15.1 Caracterización morfológica de los materiales de aguacate

El análisis de conglomerados generado a través de las características morfológicas muestra que los individuos analizados pueden ser mayormente organizados en dos grupos ampliamente diferenciados por el valor de la distancia euclidiana, los cuales corresponden a los colores rojo identificado como A y azul identificado como B en la *Figura 4*. Dentro del grupo rojo pueden diferenciarse tres agrupaciones 1A, 1B, y 1C; mientras en el color azul se observan cuatro grupos 2A, 2B, 2C y 2D. Por la identificación de cada individuo, se observa que no existe una relación entre los grupos generados por el dendrograma y el origen geográfico de los individuos, por lo que los grupos conformados no corresponden a delimitación de las poblaciones, ya que en el grupo 1A, por ejemplo, hay presencia de individuos de las 7 poblaciones delimitadas durante el muestreo, situación que es recurrente en la mayor parte de los grupos presentes en el dendrograma por lo que es evidente la mezcla entre las poblaciones; además, es posible observar que los individuos contenidos en cada grupo son diversos entre sí, dados los valores de distancias euclidianas entre ellos, aunque el grado de diversidad es considerablemente menor en comparación a los resultados obtenidos con los marcadores moleculares, además la forma de agrupación varió entre los datos morfológicos y moleculares.

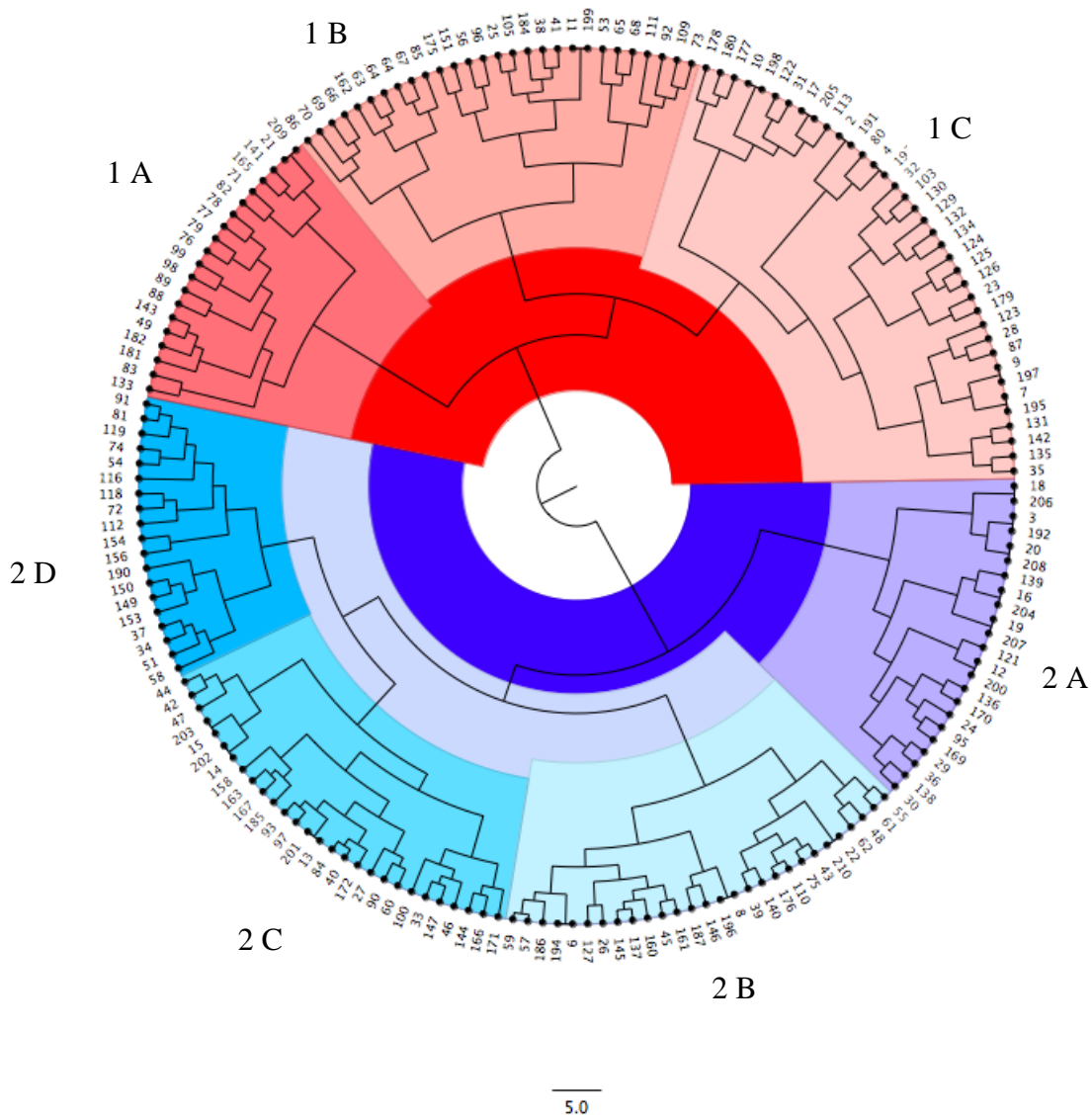


Figura 4. Dendrograma generado a partir de los datos morfológicos mediante distancias euclidianas y el método de agrupamiento de Ward para los 210 individuos analizados.

15.2 Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs)

Tras realizar la lectura del gel de poliacrilamida se obtuvo un total de 72 loci identificados los cuales presentaron un rango de porcentaje de polimorfismo de 45.8 a 77.8 siendo la población de Chimaltenango la que obtuvo el mayor valor de loci polimórfico,

mientras la población de Sololá presentó el valor más bajo. El valor de heterocigosidad esperada por población estuvo en un rango de 0.13457 a 0.2652 siendo nuevamente la población de Chimaltenango la que presentó el valor más alto y la población de Sololá la que obtuvo el valor más bajo. El resumen completo de los datos puede observarse en la Tabla 4. El valor de diversidad genética total fue de 0.1933, el valor de diversidad genética promedio dentro de las poblaciones fue de 0.1872, la diversidad genética entre poblaciones fue de 0.0061 y finalmente, el valor de fijación de Wrigth fue de 0.0313.

Tabla 4. *Estructura genética de las poblaciones de aguacate nativo analizadas a través del marcador molecular AFLP.*

Población	N	# loci	#loc_P	PLP	Hj
AV	18	72	39	54.2	0.17290
BV	9	72	43	59.7	0.17198
Hue-Qui	18	72	39	54.2	0.20120
Chimal	10	72	56	77.8	0.26521
Sac-Chimal	74	72	41	56.9	0.17932
Sol	6	72	33	45.8	0.13457
Toto-Qui	28	72	43	59.7	0.18520

AV = Alta Verapaz, BV = Baja Verapaz, Hue-Qui = Huehuetenango – Quiché, Chimal = Chimaltenango, Sac-Chimal = Sacatepéquez – Chimaltenango, Sol = Sololá, Toto-Qui = Totonicapán – Quiché, N = número de individuos por población, # loci = cantidad de loci analizados, #loc_P = número de loci polimórficos, PLP = porcentaje de loci polimórficos, Hj = heterocigosidad esperada bajo una proporción genotípica en equilibrio de Hardy-Weinberg

Con el análisis de conglomerados se generó un dendrograma que puede observarse en la *Figura 5*, en el cual se observa una alta diversidad genética a nivel de individuos, pero este mismo análisis demuestra la falta de estructura poblacional al existir una mezcla de individuos provenientes de las 7 poblaciones analizadas. En este caso, la división en grupos claramente definidos no fue posible debido al alto grado de diversidad, cuantificado a través de los valores de distancias genéticas con el índice de Nei, entre los materiales analizados.

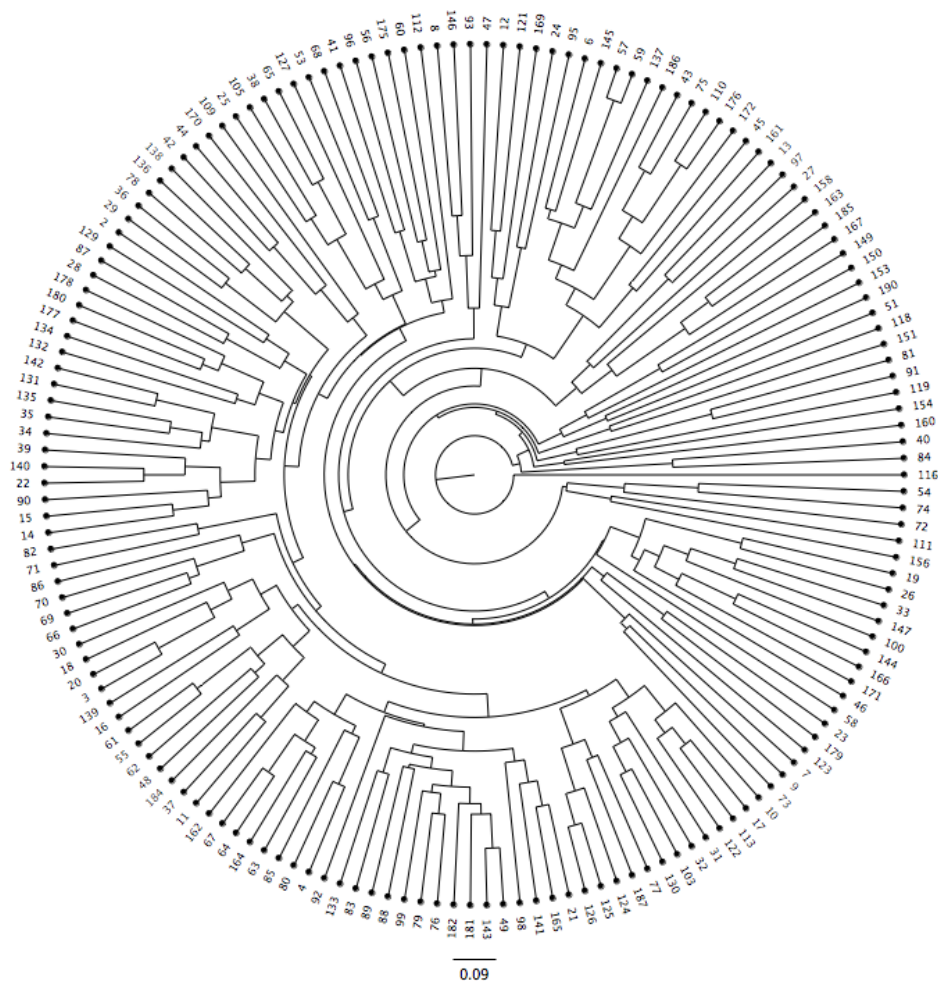


Figura 5. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a nivel de individuos.

Tabla 5. Estructura genética de las poblaciones de aguacate nativo generada a través del marcador molecular AFLP

N	Ht	Hw	Hb	Fst
7	0.1933	0.1872	0.0061	0.0313
S.E		0.015082	0.001885	0.311799
Var		0.000227	0.000004	0.09

N = número de poblaciones, Ht = diversidad genética total, Hw = diversidad genética promedio dentro de las poblaciones, Hb = diversidad genética entre las poblaciones, Fst = índice de fijación de Wright.

El análisis de conglomerados a nivel de poblaciones (*Figura 6*) si mantiene la relación en cuanto a la distancia geográfica entre las poblaciones, ya que ubicó en un mismo grupo a las poblaciones de la región de las Verapaces, al igual que las poblaciones de Chimaltenango y Sacatepéquez, las poblaciones de Quiché, Huehuetenango y Totonicapán, dejando como una población fuera de grupo a la proveniente de Sololá. Por otra parte, el índice de disimilitud genético es muy bajo entre las poblaciones, por lo que genéticamente son muy cercanas unas de otras.

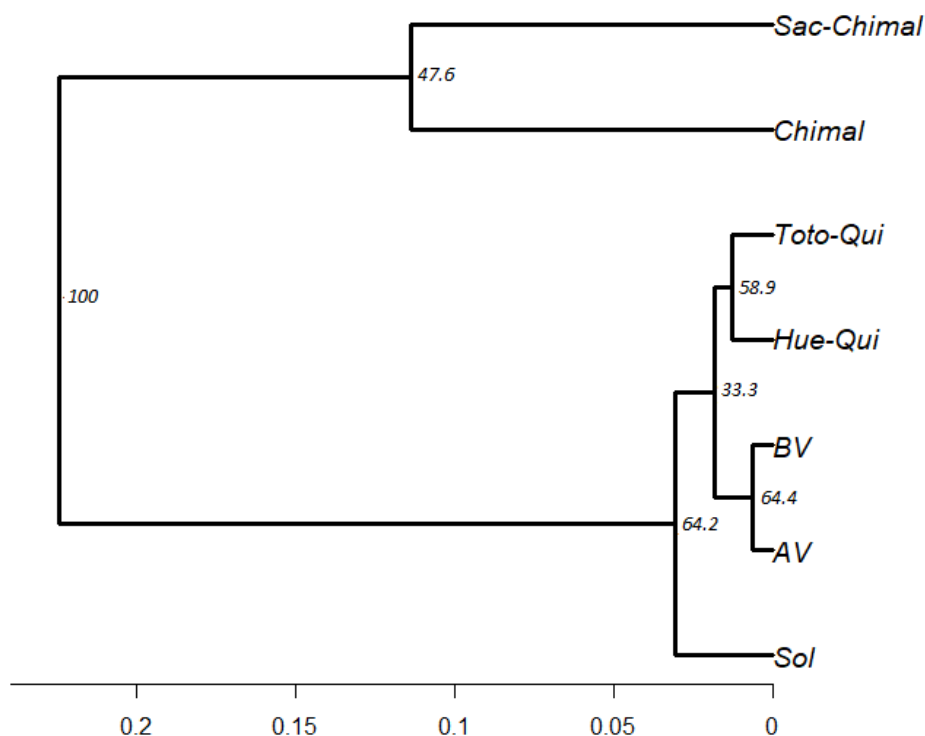


Figura 6. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a nivel de poblaciones. Los números en cada uno de los clados muestran el valor de soporte estadístico con el método bootstraps después de 1000 permutaciones.

Esta situación también se reflejó con el análisis de comparación por pares de los valores de distancias genéticas a través del índice de Nei en el cual se observa que los valores van en un rango de 0 entre las poblaciones de Alta Verapaz y Baja Verapaz, hasta un valor

de 0.0281 entre las poblaciones de Chimaltenango y Sololá los cuales pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. *Matriz de distancias genéticas generadas a partir del índice de Nei*

Población	AV	BV	Hue- Qui	Chimal	Sac- Chimal	Sol	Toto- Qui
AV	0						
BV	0	0					
Hue- Qui	0.0041	0.0079	0				
Chimal	0.0066	0.0098	0.0038	0			
Sac- Chimal	0	0.0014	0.0029	0.0056	0		
Sol	0.0086	0.0038	0.0268	0.0281	0.0169	0	
Toto- Qui	0	0	0.0058	0.0051	0.0004	0.0114	0

El análisis de componentes principales (*Figura 7*) no mostró ningún comportamiento de agrupación de los individuos, por lo que no puede observarse ninguna organización que refleje la afinidad a nivel de poblaciones, mostrando en cambio una amplia dispersión genética entre todos los individuos, tal y como se observó a través del análisis de conglomerados.

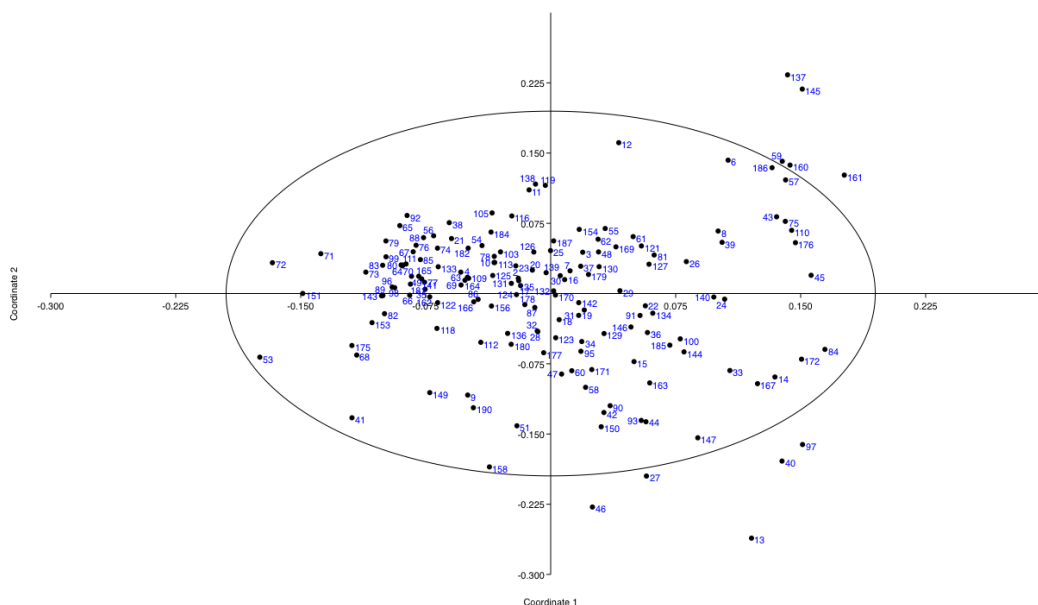


Figura 7. Análisis de componentes principales de los individuos de aguacate nativo guatemalteco (PCoA).

El análisis de estructura genética a través del método bayesiano y el método de Evanno mostró una mayor probabilidad en organizar las poblaciones en dos y cuatro conglomerados expresados a través del valor “K” como se observa en la *Figura 8* en la cual es claro que la población de Sololá tiene mayor probabilidad de estar organizada en 1 solo grupo, representado por el color morado cuando el valor K = 2, mientras que las poblaciones de Sac-Chimal, Toto-Qui, AV y BV muestran una probabilidad cercana al 50 % estar compuestas por 2 grupos, mientras que las poblaciones de Chimal y Hue-Qui tienen mayor probabilidad de organizarse en un solo grupo representado por el color celeste.

Cuando el valor K = 4 la población de Sololá muestra tener mayor probabilidad de estar compuesto por un solo grupo, representado por el color blanco, al igual que la población de Chimaltenango tiene mayor probabilidad de estar compuesta por un grupo representando en el color azul. La población de Hue-Qui también se adapta mejor a una organización de un solo grupo representado por el color morado. El resto de poblaciones tienen menor grado de estructura genética ya que ningún grupo muestra un valor alto de probabilidad.

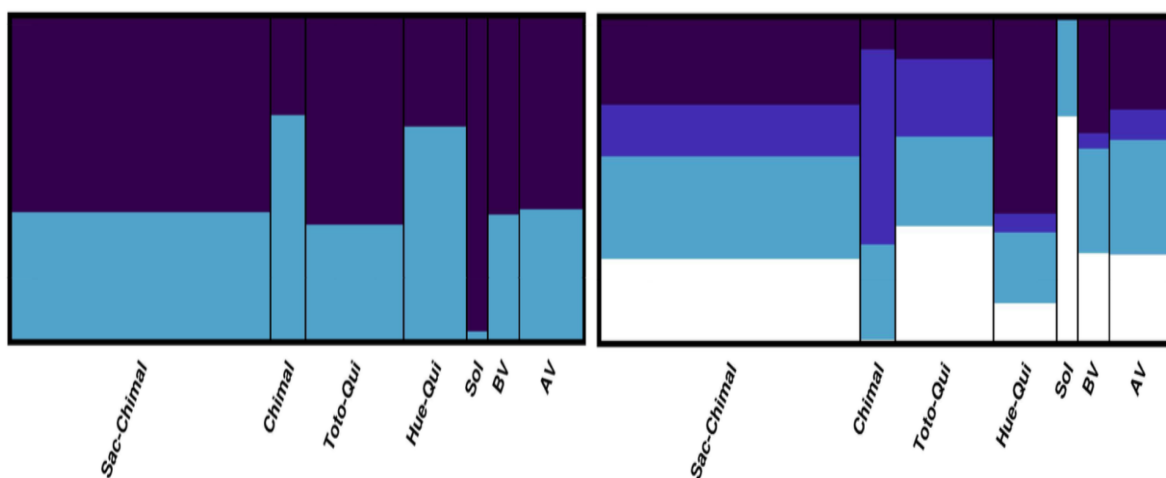


Figura 8. División de las poblaciones en dos (K = 2) y tres (K = 4) grupos inferidos por el programa Structure y Structure Harvester. AV = Alta Verapaz, BV = Baja Verapaz, Hue-Qui = Huehuetenango – Quiché, Chimal = Chimaltenango, Sac-Chimal = Sacatepéquez – Chimaltenango, Sol = Sololá, Toto-Qui = Totonicapán – Quiché.

La inferencia de la estructura genética a nivel de individuos cuando el valor de $K = 2$ mostró que la mayoría de individuos se organizan claramente dentro de uno de los dos grupos. En el caso de la población de Sac-Chimal se puede observar que la mayoría de sus individuos se ajustan a uno de los dos grupos, existiendo algunos individuos que tienen cierto grado de mezcla en su estructura genética. Los individuos de la población de Chimal se organizan mayoritariamente dentro de un solo grupo al igual que los individuos provenientes de la población de Sol. Los individuos de las poblaciones de la región de las verapaces indican mayor grado de mezcla dentro de su estructura genética.

Cuando el valor de $K = 4$ la tendencia de la estructura genética es similar a $K = 2$ organizando a los individuos de la población de Sac-Chimaltenango y Chimaltenango dentro de un mismo grupo o conglomerado, aunque el resto de individuos en las demás poblaciones indica mayor mezcla dentro de su estructura genética.

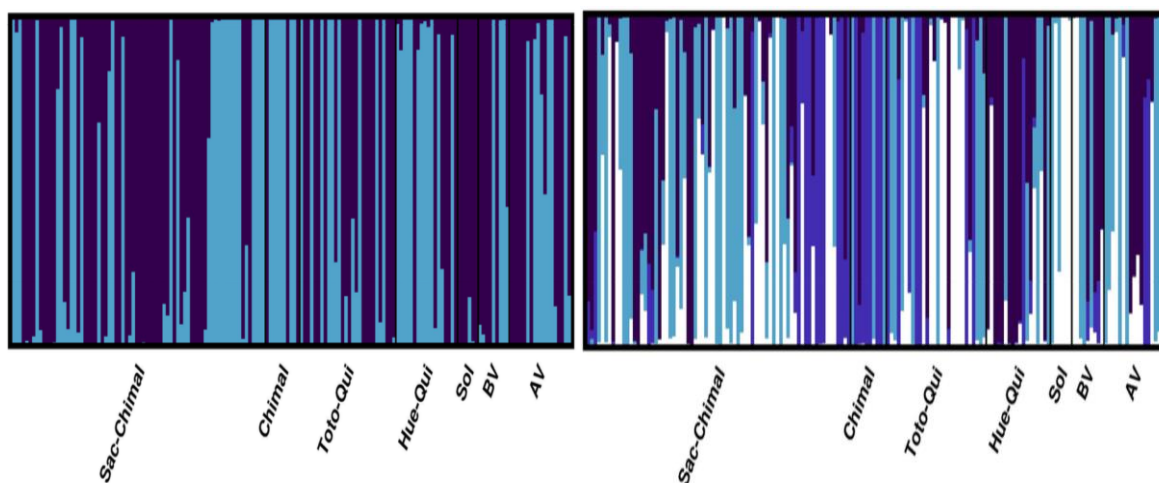


Figura 9. División de los individuos en dos ($K = 2$) y cuatro ($K = 4$) grupos inferidos por el programa Structure y Structure Harvester. AV = Alta Verapaz, BV = Baja Verapaz, Hue-Qui = Huehuetenango – Quiché, Chimal = Chimaltenango, Sac-Chimal = Sacatepéquez – Chimaltenango, Sol = Sololá, Toto-Qui = Totonicapán – Quiché.

15.3 Identificación de diversidad genética mediante microsatélites (SSR)

Una vez obtenidos los tamaños de los alelos identificados a través los 11 loci analizados se calcularon los índices de diversidad genética para entender el comportamiento de las

poblaciones. Para el caso del número de alelos promedio por locus los valores estuvieron en el rango de 6.727 para la población de Sololá hasta un valor de 14.182 para la población de Sac-Chimal. El número de alelos efectivos estuvo en un rango de 4.787 para la población de Sololá hasta 8.198 para la población de Toto-Qui. Los valores de riqueza alélica estuvieron en un rango de 6.2103 en la población de Chimaltenango hasta 8.2546 en la población de Huehuetenango-Quiché. En cuanto a la heterocigosidad observada el rango fue de 0.384 para la población de Sololá hasta 0.609 en la población de Sac-Chimal. Los valores de heterocigosidad esperada fue desde 0.738 en la población de Sololá hasta 0.837 en la población Toto-Qui y el valor de índice de fijación fue desde 0.145 en la población de Chimaltenango hasta 0.478 en la población de Sololá. El resumen de los índices de diversidad genética para todas las poblaciones puede observarse en la Tabla 7.

Tabla 7. *Resumen de la diversidad genética dentro de 7 poblaciones de aguacate nativo guatemalteco*

Población	N	Na	Ne	Ar	Ho	He	F
Sac-Chimal	75	14.182	5.808	6.9367	0.609	0.792	0.241
Chimal	16	9.909	6.336	6.2103	0.683	0.797	0.145
Toto-Qui	36	14.909	8.198	8.1558	0.541	0.837	0.366
Hue-Qui	23	10.909	6.511	8.2546	0.534	0.814	0.350
Sol	9	6.727	4.787	7.4852	0.384	0.738	0.478
BV	10	8.091	6.288	6.3654	0.479	0.784	0.385
AV	20	10.182	5.579	8.1141	0.546	0.796	0.316
Promedio	26.104	10.701	6.215	7.360	0.539	0.794	0.326

N = tamaño de la población, Na = número de alelos, Ne = número de alelos efectivos, Ar = riqueza alélica, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, F = índice de fijación.

Los índices de diversidad a nivel de loci (

Tabla 8) analizados mostraron que el número promedio de alelos identificado en cada locus estuvo en un rango desde 5.571 para el locus AVT436 hasta 15.857 AVAG22, en

cuanto al número de alelos efectivos el rango fue desde 2.359 para el locus AVAG07 hasta 10.238 para el locus 10.238, los valores para el índice de Shannon estuvo desde 1.162 para el locus AVAG07 hasta 2.381 para el locus AVD001. La heterocigosidad observada estuvo 0.399 para el locus AVAG11 hasta 0.770 para el locus AVAG22, la heterocigosidad esperada estuvo en un rango de 0.564 para el locus AVAG07 hasta 0.899 para el locus AVAG22. El índice de fijación tuvo valores desde 0.142 para el locus AVAG22 hasta 0.493 para el locus AVAG25, el número de alelos totales por locus estuvo desde 9 en el locus AVT436 hasta 32 en el locus AUCR418. Todos los loci fueron 100 % polimórficos.

Tabla 8. *Índices de diversidad genética de 7 poblaciones de aguacate nativo guatemalteco utilizando 11 marcadores microsatélites expresados en valores medios por cada locus.*

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	F	Alelos totales	% P
AVAG05	26.857	10.143	4.924	1.821	0.531	0.783	0.309	25	100
AVAG11	26.000	9.429	3.900	1.679	0.399	0.740	0.462	24	100
AVAG13	26.714	13.857	7.979	2.270	0.667	0.868	0.233	31	100
AVT436	26.429	5.571	3.691	1.421	0.416	0.712	0.415	9	100
AUCR418	25.286	12.857	6.476	2.044	0.541	0.796	0.302	32	100
AVAG07	25.857	6.286	2.359	1.162	0.281	0.564	0.487	16	100
AVAG21	25.571	8.143	4.848	1.742	0.629	0.790	0.203	20	100
AVAG22	26.571	15.857	10.238	2.505	0.770	0.899	0.142	29	100
AVAG25	25.571	8.571	5.891	1.908	0.420	0.827	0.493	19	100
AVD001	25.286	14.286	9.598	2.381	0.596	0.888	0.329	31	100
AVMIX04	27.000	12.714	8.467	2.260	0.685	0.865	0.207	26	100
Total	26.104	10.701	6.215	1.927	0.539	0.794	0.326	262	100

N = tamaño de la población, Na = número de alelos, Ne = número de alelos efectivos, I = índice de Shannon, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, F = índice de fijación, % P = porcentaje de loci polimórficos.

En cuanto a la estructura poblacional analizada a través de los estadísticos F de Wrigth (Tabla 9) el coeficiente de endogamia de un individuo respecto a la subpoblación (F_{IS}) se

encontró desde 0.144 para el loci AVAG22 hasta 0.502 en el locus AVAG07. El coeficiente de endogamia de un individuo respecto a la población total (F_{IT}) fue desde 0.169 en el locus AVAG22 hasta 0.521 en el locus AVAG07. El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}) se encontró en un rango de 0.037 en el locus AVAG07 hasta 0.080 en el locus AVAG11. El flujo genético (N_m) estuvo en valores desde 2.886 en el locus AVAG11 hasta 8.094 en el locus AVAG22.

Tabla 9. *Análisis de la estructura poblacional mediante los índices F para cada locus.*

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
AVAG05	0.322	0.361	0.056	4.185
AVAG11	0.460	0.503	0.080	2.886
AVAG13	0.232	0.256	0.031	7.840
AVT436	0.416	0.450	0.059	4.012
AUCR418	0.321	0.369	0.071	3.249
AVAG07	0.502	0.521	0.037	6.432
AVAG21	0.204	0.246	0.053	4.507
AVAG22	0.144	0.169	0.030	8.094
AVAG25	0.493	0.514	0.042	5.699
AVD001	0.328	0.361	0.048	4.927
AVMIX04	0.208	0.253	0.057	4.136
Promedio	0.330	0.364	0.051	5.088
Total para todas las poblaciones				
	0.349	0.337	0.018	13.403

F_{IS} = coeficiente de endogamia de un individuo (**I**) respecto de la subpoblación (**S**), F_{IT} = coeficiente de endogamia de un individuo (**I**) respecto a la población total (**T**), F_{ST} = diferenciación genética entre poblaciones, efecto de las subpoblaciones (**S**) comparado al total de la población; (**T**), N_m = flujo genético

Los valores de distancia genética a través del índice de Nei al ser comparador por pares como se muestra en la

Tabla 10 mostraron que las poblaciones con menor distancia genética fueron Sac-Chimal con Chimaltenango con un valor de 0.082, mientras las más distantes fueron las poblaciones de Sololá con Baja Verapaz 0.548.

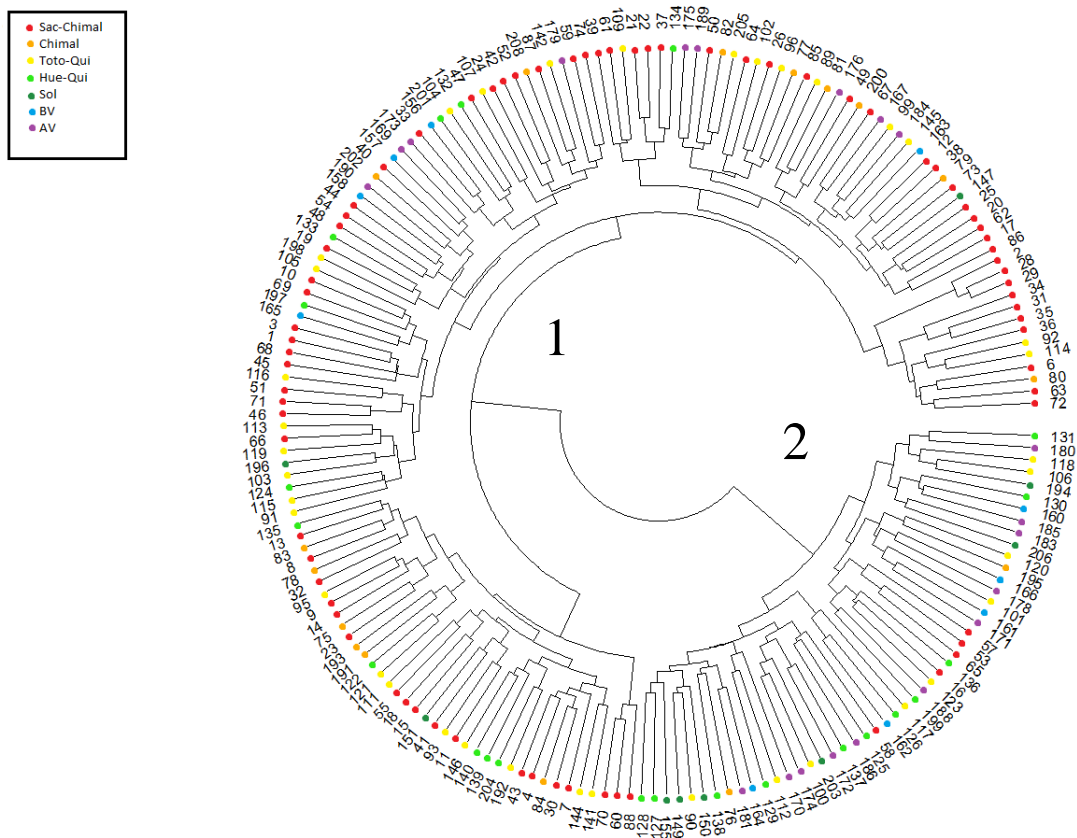


Figura 10. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular microstélite (SSR) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a nivel de individuos.

El análisis de conglomerados a nivel de individuos muestra un dendrograma en el cual puede observarse que existe una mezcla de individuos y por tal razón los grupos identificados no corresponden a la delimitación geográfica de las poblaciones estudiadas, situación que también se presentó en el análisis realizado con el marcador AFLP. El dendrograma a través de marcador SSR permitió hacer una distribución más organizada de los individuos analizados en comparación al marcador AFLP, por lo cual pueden observarse dos grupos muy bien diferenciados en la *Figura 10*; a pesar de esto, no es posible establecer

otro tipo organización a un nivel más detallado por el alto grado de diversidad que muestran los individuos entre si.

Tabla 10. *Matriz de distancias genéticas generadas a partir del índice de Nei.*

Población	Sac-Chimal	Chimal	Toto-Qui	Hue-Qui	Sol	BV	AV
Sac-Chimal	0.000						
Chimal	0.082	0.000					
Toto-Qui	0.154	0.140	0.000				
Hue-Qui	0.210	0.224	0.242	0.000			
Sol	0.328	0.330	0.371	0.280	0.000		
BV	0.389	0.337	0.387	0.288	0.548	0.000	
AV	0.133	0.143	0.167	0.260	0.410	0.315	0.000

El dendrograma a nivel de poblaciones (Figura 11) mantienen una relación entre la distancia geográfica y la distancia genética, siendo las más cercanas las poblaciones de Sac-Chimal con Chimaltantenango y la más distante que incluso queda como una población fuera de grupo es la proveniente de Sololá. Las poblaciones de la región de las Verapaces quedaron organizadas en un mismo grupo, al igual que las poblaciones donde Toto-Qui y Hue-Qui. Los valores de soporte bootstrap que funcionan como soporte estadístico en la organización mostrada por el dendrograma tuvo valores desde 69.2 hasta 100 lo cual indican un alto grado de certeza sobre la distribución generada.

En análisis molecular de varianza (AMOVA) fue de utilidad para entender la estructura genética de las poblaciones a través del porcentaje de varianza aportado por cada una de las fuentes de variación las cuales fueron representadas por la interacción entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y dentro de los individuos con lo cual se pudo estimar cuales fueron las causas de la variación genética observada. El AMOVA reportó un porcentaje de varianza 2% entre poblaciones, un 33 % entre los individuos dentro de cada población y un 65 % dentro de los individuos analizados. El resumen puede observarse en la Tabla 11 y la Figura 12.

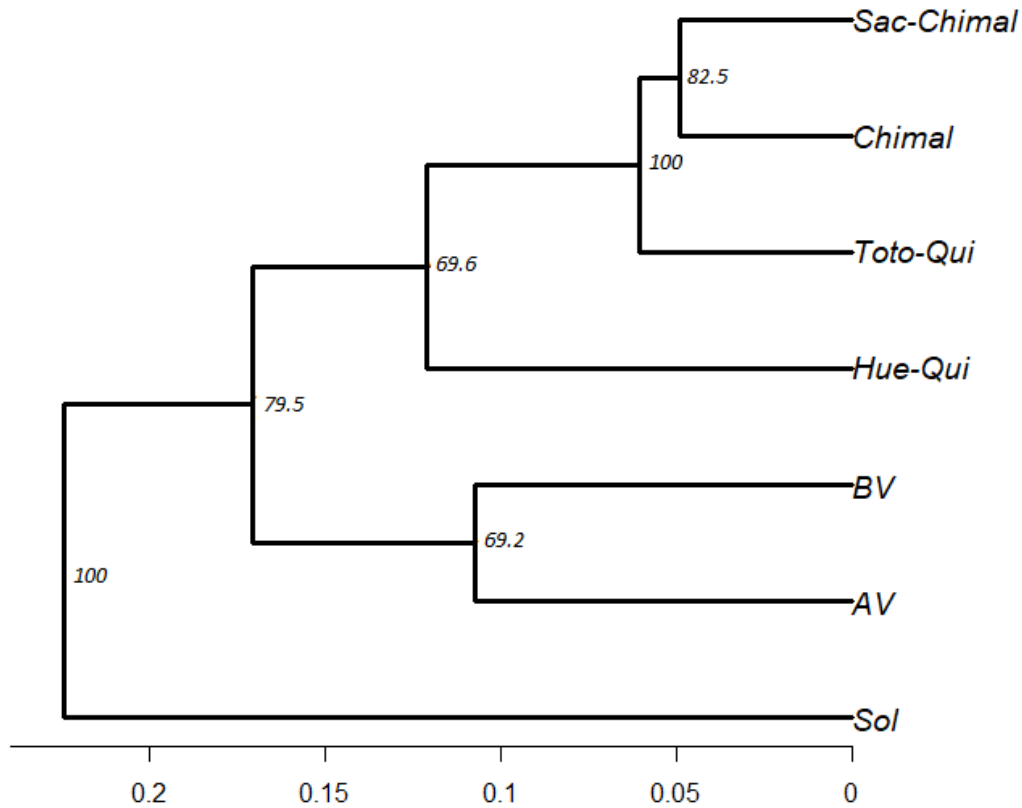


Figura 11. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular microsatélite (SSR) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a nivel de poblaciones. Los números en cada uno de los clados muestran el valor de soporte estadístico con el método bootstraps después de 1000 permutaciones.

Tabla 11. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la estructura genética poblacional del aguacate nativo guatemalteco.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Varianza estimada	%
Entre poblaciones	6	61.395	10.232	0.085	2%
Entre individuos dentro de las poblaciones	182	1111.687	6.108	1.538	33%
Dentro de los individuos	189	573.000	3.032	3.032	65%
Total	377	1746.082		4.655	100%

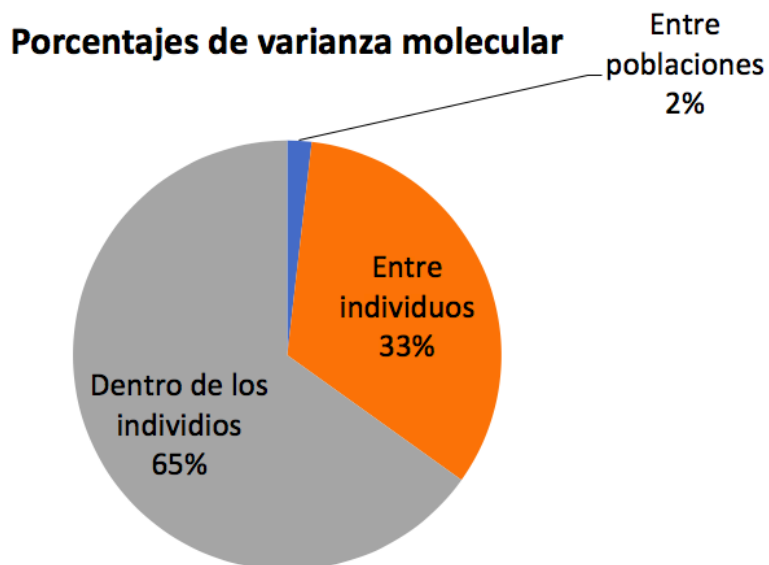


Figura 12. Porcentaje de la varianza molecular que muestra el nivel de diversidad genética existente entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y dentro de todos los individuos.

En cuanto a los valores de diferenciación genética entre las poblaciones a través del índice F_{ST} al ser comparado en pares con las poblaciones bajo estudio, se observó que la población de Chimaltenango y Sac-Chimal son las que presentan menor valor de diferenciación genética entre ellas, que la población de Sololá y Baja Verapaz son las más distantes en cuanto a diferenciación de su estructura genética.

Tabla 12. Comparaciones pareadas de los valores de F_{st} para las poblaciones analizadas.

	Sac-Chimal	Chimal	Toto-Qui	Hue-Qui	Sol	BV	AV
Sac-Chimal	0.000						
Chimal	0.010	0.000					
Toto-Qui	0.016	0.015	0.000				
Hue-Qui	0.023	0.024	0.023	0.000			
Sol	0.042	0.042	0.043	0.036	0.000		
BV	0.043	0.038	0.038	0.031	0.062	0.000	
AV	0.016	0.017	0.017	0.027	0.049	0.035	0.000

El análisis de estructura genética a través del método bayesiano y el método de Evanno mostró una mayor probabilidad en organizar las poblaciones en dos y cuatro

conglomerados expresados a través del valor “K” como se observa en la Figura 13. El análisis demostró que las poblaciones de Sac-Chimaltenago y Chimaltenango tienen ambas mayor probabilidad de estar organizada en 1 solo grupo, representado por el color celeste, cuando el valor $K = 2$; mientras que las población de Toto-Qui no tiene una organización definida y presente el mismo nivel de probabilidad de pertenecer a cualquiera de ambos grupos. Las restantes poblaciones de Hue-Qui, Sololá, AV y BV no muestran un comportamiento claro que permita ubicarlas dentro de uno de los dos grupos. Cuando el valor $K = 4$ la población sigue presentando mayor probabilidad de organizarse en un solo grupo al igual que la población de Chimaltenango; mientras las restantes poblaciones tienen menor grado de estructura genética ya que ningún grupo muestra un valor alto de probabilidad que permita clasificarlas claramente en alguno de los grupos.

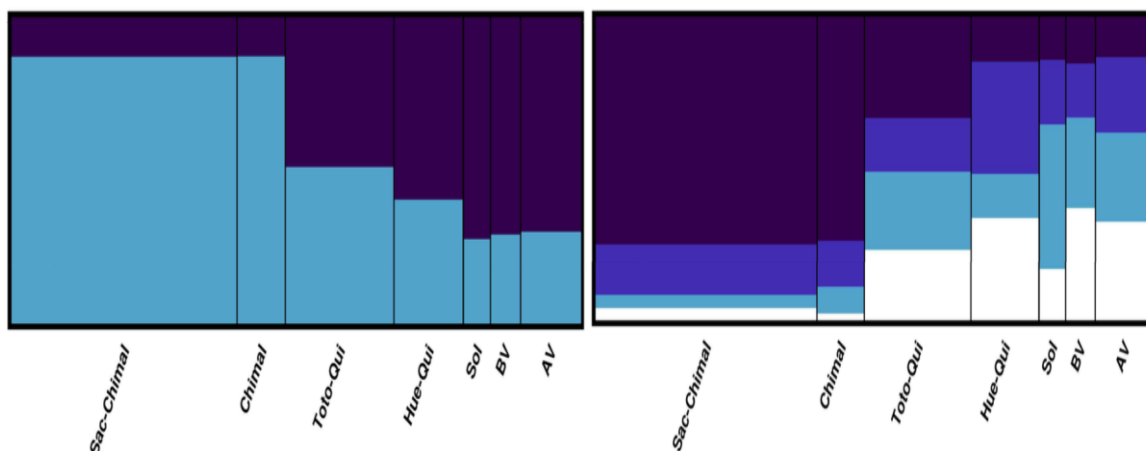


Figura 13. División de las poblaciones en dos ($K = 2$) y cuarto ($K = 4$) grupos inferidos por el programa Structure

La inferencia de la estructura genética a nivel de individuos cuando el valor de $K = 2$ mostró que la mayoría de individuos se organizan claramente dentro de uno de los dos grupos. En el caso de la población de Sac-Chimal se puede observar que la mayoría de sus individuos se ajustan a uno de los dos grupos, existiendo pocos individuos que tienen cierto grado de mezcla en su estructura genética. Los individuos de la población de Chimal se organizan mayoritariamente dentro de un solo grupo. Los individuos de las restantes poblaciones indican mayor grado de mezcla dentro de su estructura genética. Cuando el valor de $K = 4$ la tendencia de la estructura genética es similar a $K = 2$ organizando a los individuos de la población de Sac-Chimaltenango y Chimaltenango del dentro de un mismo grupo o

conglomerado. El resto de individuos en las demás poblaciones indica mayor mezcla dentro de su estructura genética.

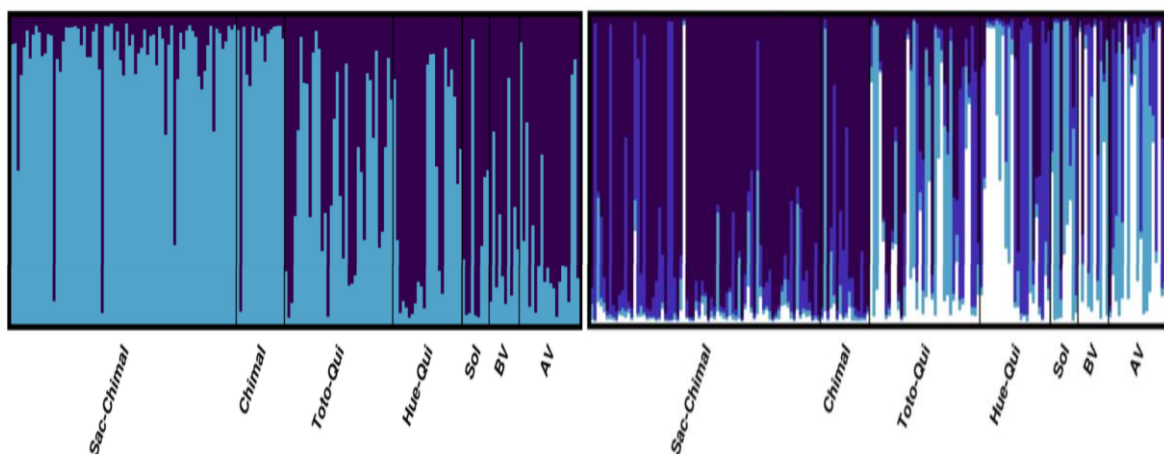


Figura 14. División de los individuos en dos ($K = 2$) y cuatro ($K = 4$) grupos inferidos por el programa Structure.

15.4 Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos de un solo nucleótido

A través de los dos marcadores de tipo SNP, VTE3 y VTE4, se obtuvo un total de 822 pares de bases secuenciadas basado en el diseño de amplificación de los cebadores empleados. El análisis de diversidad a través de los nucleótidos secuenciados mediante el índice de Tajima = p (Tajima, 1983) estuvo en un rango de 1 SNP cada 30.2 pares de bases; $p = 6.37 \times 10^{-3}$ hasta 1 SNP cada 166.3 pares de bases; $p = 6.4 \times 10^{-3}$.

Tabla 13. Sitios polimórficos y SNPs detectados en la secuencia de los genes VTE3 y VTE4.

	VTE3 (440 pb)						VTE4 (382 pb)					
Posición	33	62	81	256	389	29	115	140	173	227	276	345
Consenso	G	C	T	G	A	A	C	C	G	T	A	C
Sac-Chimal	.	A	.	A	.	T	T	.
Chimal	.	A	.	.	C	G	.	.	A	.	.	.
Toto-Qui	G	.	.	A	T	.

Tabla 13. Continuación

Posicion	VTE3 (440 pb)					VTE4 (382 pb)						
	33	62	81	256	389	29	115	140	173	227	276	345
Consenso	G	C	T	G	A	A	C	C	G	T	A	C
Hue-Qui	.	.	.	T
Sol	A	C	.	.	.
AV	.	.	C	.	C	.	.	T
BV	.	T	A	.	.	T	.	.	.	C	.	G

El dendrograma generado a nivel de poblaciones mantiene relación con la ubicación geográfica y muestra un arreglo similiar al encontrado con los marcadores AFLP y SSR aunque el nivel de diferenciación genética varía considerablemente con este marcador teniendo valores de bootstrap bajos en comparación a los encontrados con los microsatélites.

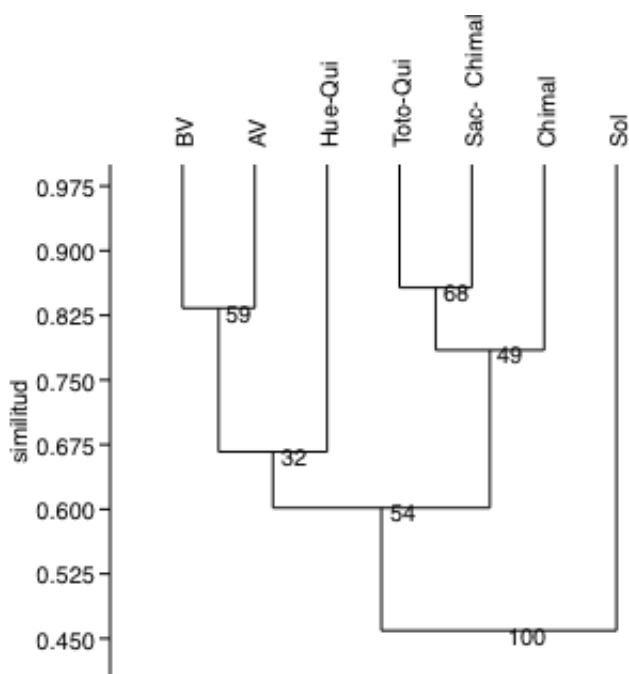


Figura 15. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de aguacate nativo guatemalteco a nivel de poblaciones. Los números en cada uno de los clados muestran el valor de soporte estadístico con el método bootstraps después de 1000 permutaciones.

16 Análisis y discusión de resultados

16.1 Caracterización morfológica de los materiales de aguacate

El análisis de diversidad genética, a través de características morfológicas, logró discriminar entre los individuos analizados formando dos grupos principales, aunque, al revisar a detalle las accesiones contenidas en cada grupo, se observa que existe una mezcla de las poblaciones, ya que no existe relación alguna entre el agrupamiento basado en características morfológicas, tanto cualitativas como cuantitativas, y el punto de colecta de donde proviene cada accesión. Esta situación concuerda con el sistema de polinización que ha sido reportado en el aguacate, ya que la flor de dicha especie presenta dicogamia, es decir, dos períodos de apertura, en el cual en el primer periodo se da el desarrollo de la parte femenina y esto es definido como protoginia sincrónica y seguidamente se da la segunda anthesis y la parte masculina comienza a producir polen. De este modo la separación temporal de las funciones sexuales favorecen el entrecruzamiento, lo cual es de suma importancia pues se evidencia la adaptación que promueve el flujo genético entre individuos de esta especie (Bergh, 1974; Bergh, 1992; Davenport, 1986).

Otro aspecto a tener en consideración es que el aguacate presenta un caso especial en su morfología floral denominado heterodicogamia, en el cual dos genotipos diferentes que presentan dicogamia sincronizada, tienen comportamiento de floración recíproca, lo cual significa que mientras las flores de uno de los individuos se encuentra en etapa femenina, las flores del otro se encuentran en la etapa masculina, favoreciendo así la entrecruza (Alcaraz & Hormaza, 2011). Otro punto importante es que el aguacate no presenta barreras de esterilidad entre las tres razas hortícolas identificadas, por lo cual se presenta hibridaciones interraciales de manera natural o inducida por el hombre (Gross-German & Viruel, 2013), de manera que, la especie ha sido dotada de un diseño que busca maximizar la polinización cruzada y de este modo incrementar la variabilidad genética y promover la adaptación a la mayor cantidad de ambientes posibles convirtiéndose en una especie altamente heterogénea.

Dicha diversidad ha sido además incrementada por la interacción humana mediante el acercamiento de genotipos que naturalmente estaban geográficamente distantes en su ambiente natural (Bergh, 1992). En cuanto a la dispersión la mayoría de especies de la familia

Lauraceae presentan el síndrome de la ornitocoria, dispersión a través de aves, (Solórzano, Castillo, Valverde, & Avila, 2000) y algunas hipótesis indican que el aguacate coevolucionó con dispersores de gran tamaño actualmente extintos como pudieron ser los mamíferos del Cenozoico, además es posible que debido a la desaparición de estos, la morfología del fruto haya cambiado en cuanto a tamaño, permitiendo a animales de menor envergadura su manipulación; además los frutos silvestres son más pequeños que los cultivados por lo que las aves pueden alimentarse de éstos trasladando así las semillas a través de largas distancias (Avila, Hernández, & Verlarde, 1996)

Lo anteriormente descrito explica el comportamiento encontrado durante el proceso de colecta de muestras y la caracterización morfológica, ya que pudo observarse una amplia diversidad en cada una de las poblaciones estudiadas, pero no fue posible establecer un patrón claro sobre ningún marcador morfológico característico de una población. Además, debido a que el consumo del fruto de dicha especie está fuertemente arraigado a la cultura guatemalteca, la movilización interdepartamental es muy frecuente a través de la comercialización en los mercados del país, promoviendo así el flujo genético y alterando la estructura poblacional natural.

Este alto nivel de mezcla que presentan los materiales de aguacate nativo guatemalteco, debe ser visto una excelente oportunidad para explotar la variación genética a través de programas de mejoramiento genético, como indica Boza y colaboradores (2018) siendo el aguacate Hass, un híbrido entre raza guatemalteca y la raza mexicana, un ejemplo de esto al ser el cual es el cultivar más ampliamente establecido en el mundo (Griswold, 1945) o de forma más recientemente, como en 1975 cuando reportó la colecta de un híbrido entre la raza guatemalteca y la especie *P. schiedieana* colectado en el área de Cobán, Guatemala, el cual mostró resistencia genética a *Phytophthora cinnamomi*, patógeno que representa el problema más serio a nivel mundial en la producción de aguacate, y del cual se generó el material G755 que es utilizado como patrón para injerto (Coffey, Guillemet, Schieber, & Zentmyer, 1988; Zentmyer, Schieber, & Guillemet, 1988).

Lastimosamente, a pesar de que las colectas de estos exitosos materiales hayan sido dentro del territorio nacional, el país nunca ha recibido beneficio alguno, por lo cual es de suma importancia realizar la caracterización a través de marcadores moleculares y así identificar el grado de diversidad genética actual para tener bases sólidas con las cuales se inicien nuevos programas de mejoramiento de la especie.

16.2 Identificación de diversidad genética mediante polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs)

Los resultados obtenidos a través de los índices informativos de la estructura genética de las poblaciones de aguacate corroboraron el supuesto formulado a través de la caracterización morfológica, ya que el índice de heterocigosidad esperada entre las poblaciones, a pesar de mostrar un agrupamiento por regiones, es bajo, aunque los datos pueden ser comparados con otros estudios en Colombia a través del mismo marcador molecular (Cañas et al., 2015). Al examinar más a fondo el comportamiento del aguacate nativo guatemalteco, se observa la amplia diferencia entre el índice H_b (0.0061) el cual establece la diversidad genética entre poblaciones y debido a que es muy cercano a 0 indica que las poblaciones bajo estudio comparten muchos de los locus analizados con el marcador molecular.

Por otra parte, el valor del índice H_w (0.1872), que mide el grado de diversidad entre individuos, refleja un alto grado de diferencia genética entre los individuos analizados, lo cual es producto del sistema de polinización abierta de la especie, que promueve el flujo genético entre ellos, además, esta condición se potencia con la intervención humana, la cual incrementa el rango natural de dispersión y se sobrepasan las barreras naturales fisiográficas. En cuanto a los índices de diversidad genética total H_t (0.1933) y el índice de fijación de Wright F_{st} (0.0313) queda claro que la diversidad en el recurso del aguacate nativo si existe, pero no hay una estructura definida a nivel de poblaciones.

Cuando se examina el dendrograma a nivel de individuos, se observa que no es posible realizar conglomerados que mantengan relación con el origen geográfico de las poblaciones

donde fueron colectados, pero esto no debe ser erróneamente interpretado como una falla en el muestreo o diseño de este estudio, ya que desde experiencias anteriores se conocía de la riqueza genética de la especie *Persea americana* en el territorio nacional, pero se desconocía la situación a nivel de estructura genética de las poblaciones (Azurdia et al., 2011) por lo que estos resultados confirman los supuestos anteriores de la amplia diversidad de la especie.

La experiencia en la caracterización con el mismo marcador molecular, de materiales nativos en el estado de Nuevo León, México (Gutiérrez Díez et al., 2015) también mostró un alto grado de diversidad genética, aunque este estudio si logra un tipo de arreglo a través del dendrograma, debido a la previa caracterización a nivel de razas de las 42 accesiones analizadas, sin embargo, debido a que el objetivo de este estudio no es la determinación de las razas que componen materiales comerciales o nativos, no se contó con esta información previa, ya que el objetivo es analizar el grado de diversidad genética de los individuos presentes en las diferentes zonas donde existe presencia de la especie.

Cuando el análisis de conglomerado se realizó a nivel de poblaciones, se pudo observar mayor relación en cuanto al agrupamiento basado en la información generada por el marcador molecular y la localización geográfica de las poblaciones, pero también se observó que el grado de diferenciación genética es muy cercano a 0, lo cual muestra, una vez más, que las poblaciones han sido mezcladas y por lo mismo su reservorio genético tiene mucha similitud y es poco probable identificar locus únicos para cada población. Esta misma condición se puede visualizar a través de la matriz de distancias genéticas, la cual mostró valores más cercanos a 0 a medidas que las poblaciones fueron geográficamente más cercanas.

Cuando el análisis se presenta a través del comportamiento por medio de componentes principales, es claro que no se puede establecer un patrón por ubicación geográfica y la tendencia es a la búsqueda de un solo conglomerado sumamente variable entre si, lo cual es producto de la amplia diversidad a nivel de individuos, como se identificó con los índices de estructura genética, pero baja nivel de diferencia a nivel de poblaciones.

El análisis por el método bayesiano y de Evanno ayuda a entender de mejor manera la mezcla que preseta cada una de las poblaciones e individuos. Vale la pena recalcar que la altura de las barras no establece distancias sino valores de probabilidad, razón por la cual este es un análisis de inferencia de estructura de las poblaciones. Cuando el análisis se realizó a nivel de poblaciones el estimador estadístico K señaló que el arreglo de las poblaciones debía considerarse en 2 o 4 conglomerados como se visualiza finalmente en la *Figura 8* y *Figura 9*. Cuando $K = 2$ a nivel el comportamiento de la población de Sac-Chimaltenango indica que tiene una probabilidad cercana al 50% de organizarse en dos conglomerados como resultado de la mezcla genética existente dentro de ella. El caso contrario se observa en la población de Sololá, la cual se organiza casi por completo en un solo conglomerado, lo que se interpreta como una composición mas homogénea a nivel de su estructura genética. Las poblaciones de Chimaltenango y Hue-Qui pueden ser consideradas como organizadas en un solo conglomerado. Cuando el $K = 4$ solamente la población de Sololá puede ser considerada como organizada dentro de un grupo, mientras el resto de poblaciones evidencian el alto grado de flujo genético que ha existido entre ellas.

Cuando el análisis fue realizado a nivel de individuos, se observa que cada uno de ellos si presenta alta probabilidad de pertenecer a un grupo bien establecido. Si se toma la población de Sac-Chimaltenango como ejemplo, se observa que la mayor parte de sus individuos se ubican por completo en el grupo representado por el color morado o celeste, pero para que esto se refleje en una estructura de población bien definida, la mayoría de individuos deberían pertenecer a uno de los dos grupos, pero en este caso la mitad de ellos se agrupan bajo el color morado y la otra mitad bajo el color celeste, lo cual se observa claramente al ver la misma figura, pero a nivel de poblaciones. Si el ejemplo se realiza con la población de Sololá, se observa que prácticamente todos sus individuos se agrupan bajo el color morado y por lo mismo esta población se considera como organizada en un solo conglomerado en la *Figura 8*.

El marcador molecular AFLP también ha sido de utilidad para determinar el grado de diversidad genética a materiales de aguacate propagados bajo condiciones in vitro (Cerdeña-Hurtado et al., 2015) además, otros marcadores moleculares de tipo dominantes como RAPD

e ISSR(Fiedler et al., 1998; Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, Simuta-Velázco, Barrientos-Priego, & Gallegos-Vázquez, 2013) han sido de utilidad para la caracterización molecular e identificación de diversidad genética de individuos dentro del género *Persea* y también dentro de la especie *Persea americana*. Los resultados obtenidos por Cuiris y colaboradores (2009) quienes evaluaron la diversidad genética dentro de la raza mexicana a través del marcador AFLP, obtuvieron un comportamiento muy similar a este estudio cuando se compara el nivel de organización a través del análisis de conglomerados mediante los dendrogramas generados.

16.3 Identificación de diversidad genética mediante microsatélites (SSR) y polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

El marcador molecular microsatélite ha sido ampliamente utilizado en la caracterización molecular del aguacate debido a que es de tipo codominante y con alto grado de polimorfismo, lo que permite realizar los análisis de estructura poblacional de forma más detallada (Acheampong et al., 2008; Alcaraz & Hormaza, 2007; Ashworth & Clegg, 2003; Ashworth et al., 2004; Boza et al., 2018; Dwomoh & Takrama, 2014; Schnell et al., 2003). Al analizar la diversidad genética a nivel de poblaciones, se observa que el mayor número de alelos por locus se encontró en la población de Sac-Chimaltenango, pero se debe considerar que este valor puede estar sobre estimado por el tamaño de la población, de manera que, al comparar los valores de riqueza alélica, es la población de Hue-Quiché la que presenta mayor diversidad en el promedio de alelos identificados por cada locus, dichos valores se encuentran dentro de los rangos reportados por Schnell y colaboradores(2003).

En cuanto al valor de la heterocigosidad observada (0.539), es claro que existe un desequilibrio en comparación con la heterocigosidad esperada (0.794), lo cual indica un desbalance negativo sobre el número de individuos heterocigotos que deberían existir bajo los supuestos de Hardy-Weinberg, esta situación es corroborada con el índice de fijación, el cual tiene un valor promedio alto (0.326) que nuevamente indica la falta de individuos heterocigotos en la población; fenómeno similar al encontrado en otros estudios realizados con microsatélites (Alcaraz & Hormaza, 2007; Boza et al., 2018; Schnell et al., 2003). En

cuanto al desequilibrio de heterocigotos, el estudio presentado por Dwomoh y Takrama (2014) presenta valores de hasta 0.512 en el índice de fijación, lo cual indica que existen poblaciones en las cuales el equilibrio propio de una población natural, ha sido mucho más afectado. Los valores de heterocigosidad esperada también son similares a los reportados por Martins y colaboradores (2011) y Boza y colaboradores(2018).

Basado en el valor de heterocigosidad esperada, es la población de Toto-Quiché la que muestra el mayor grado de diversidad genética junto con la población de Hue-Quiché, lo cual concuerda con los valores de riqueza alélica, ya que ambas poblaciones muestran los valores más altos. En cuanto a la diferencia entre el número de alelos por locus y el número de alelos efectivos señalan la presencia de alelos raros en todas las poblaciones analizadas. El valor de F también muestra que existe un desequilibrio para todos los loci analizados debido al alto número de individuos homocigotos.

En cuanto a la efectividad de los loci empleados en este estudio, se observa que todos mostraron un 100% de polimorfismo comprobando que estos son adecuados para el estudio de diversidad genética del aguacate como indica el estudio de (Nerdo et al., 2009) quien también concuerda con el número de alelos reportados en los loci utilizados. En próximas evaluaciones se podría sustituir el locus AVT436 por haber mostrado un valor bajo de alelos promedio por locus.

Al examinar la estructura genética de las poblaciones mediante el índice Fis, se observa que observa que existe endogamia en las poblaciones, así mismo, se el coeficiente Fit sugiere un exceso de homocigotos en las poblaciones, mientras que el índice Fst indica el bajo nivel de diferenciación genética entre las poblaciones analizadas, situación similar a la encontrada por (Ferrer Pereira, Perez Almeida, & Raymúndez Urrutia, 2017) aunque el valor de endogamia es superior para algunos de los loci reportados por estos autores en comparación a los encontrados en las poblaciones guatemaltecas, lo que indica que existen otras poblaciones que han estado sometidas a procesos de endogamia en niveles más fuertes que las poblaciones nacionales.

Al realizar el análisis de conglomerados y visualizar el comportamiento de los individuos en el dendrograma, se observó que la distribución encontrada no corresponde a la localización geográfica de las poblaciones, indicando un alto grado de diversidad a nivel de individuos, como lo respalda el análisis molecular de varianza (Tabla 11 y Figura 12), el cual indica que el porcentaje de diferenciación entre individuos alcanza el 65% de la varianza total. Así mismo, esta falta de organización a nivel de poblaciones, también es explicado a través del flujo genético (Nm) puesto que, este valor indica la cantidad de individuos que migran hacia una nueva población en cada generación, de manera que una vez el valor sea superior a 1, existirá presencia de nuevos alelos, situación que es ampliamente sustentada en este estudio, ya que el valor de flujo genético es superior a 1 para todos los loci y llega a alcanzar un valor total de 13.403 para todas las poblaciones, incrementado de esta forma la variabilidad genética del total de individuos, pero, por otra parte, esta migración hace más homogéneas las poblaciones, lo cual también es corroborado por el bajo valor de F_{st} (0.051) y el valor encontrado por el AMOVA, el cual indica que solamente un 2% de la variación es debido a la diferencia existente entre las poblaciones.

Condiciones similares de alto grado de diversidad a nivel de individuos, así como valores altos de endogamia dentro de las poblaciones fueron encontradas por Galindo y colaboradores (2011) de manera que, para explicar la forma de agrupamiento de los individuos analizados, Ashworth y Clegg (2003) indican el aguacate presenta una alta complejidad debido a la hibridación de la especie y diferenciación racial. Esta situación se suma a la relación del cultivo con el hombre y las diferentes condiciones de domesticación que se han presentado desde tiempo precolombinos en las tierras altas del centro y sur de México y Guatemala (Galindo-Tovar et al., 2008; Smith, 1966; Storey, Bergh, & Zentmyer, 1986) que ha resultado en una amplia variedad de genotipos con afinidades genéticas difíciles de separar (Galindo et al., 2011) mostrada por los individuos colectados en esta investigación.

Otras poblaciones analizadas en Gana por Acheampong y colaboradores (2008) manifestaron un bajo nivel de diferenciación genética y sugieren que esta situación es debida a un alto coeficiente de endogamia, así como a un progenitor común proveniente de la raza antillana. Este estudio contrasta con los valores de diversidad genética encontrados en los

individuos guatemaltecos, lo que ayuda a sustentar el supuesto que la alta diversidad genética es producto de que el país es centro de origen de la especie junto con el centro y centro-este de México como menciona Williams (citado en Gutiérrez et al., 2015).

Cuando se analiza la matriz de distancias genéticas de la

Tabla 10 y la matriz de comparación del índice F_{st} para las poblaciones de la Tabla 12, es clara la cercanía y baja diferenciación genética entre ellas, pero, además, esta situación si mantiene relación positiva en cuanto a la distancia geográfica. Esta situación se observa más fácilmente en la Figura 11 a través del dendrograma a nivel de poblaciones, lo cual hace suponer que hay presencia de algunos alelos que son originarios de las diferentes regiones del país, sin embargo, el grado de diferenciación entre poblaciones sigue siendo bajo.

La cercanía genética entre poblaciones analizadas también ha sido reportada por otros estudios a través del mismo marcador molecular (Boza et al., 2018; Chen et al., 2009; Gross-German & Viruel, 2013), así mismo, otros estudios han demostrado que la mezcla interracial entre la poblaciones de aguacate lleva a la cercanía genética de las poblaciones (Ashworth & Clegg, 2003; Chen et al., 2008, 2009; Davis et al., 1998; Galindo-Tovar et al., 2008; Gross-German & Viruel, 2013; Guzmán et al., 2017; Mhameed et al., 1997; Schnell et al., 2003)

El análisis con el programa Structure ayudó a determinar la probabilidad en la cual las poblaciones pueden ser organizadas a través de grupos genéticamente similares y para este estudio los modelos que mejor se ajustaron fueron para una distribución de 2 y 4 grupos (valor de K). Esto supone que existen poblaciones, como la de Sac-Chimaltenango y Chimaltenango, que podrían estar compuestas principalmente por una de las razas presentes en el país. Otrs poblaciones como Toto-Qui presentan una probabilidad cercana al 50% de estar compuesta por una u otra raza de aguacate. Esta incertidumbre es debido al alto grado de mezcla, compleja hibridación interracial, flujo genético, polinización cruzada y sobre todo por movilización de los materiales por influencia humana.

Al realizar el mismo análisis de inferencia estructural, pero a nivel de individuos, la situación es similar, ya que dentro de una misma población, existen individuos con una alta

probabilidad de pertenecer a un grupo, pero también existen individuos sobre los cuales no se tiene certeza sobre su agrupación. Esta situación puede ser comparada con algunas de las accesiones analizadas por Boza y colaboradores (2018) aunque, este estudio contaba con la genealogía de cada material, así como un número significativamente mayor de loci analizados (55), por lo cual el análisis con el método bayesiano si permitió la agrupación acorde a las razas. Por otra parte, el estudio de Guzmán y colaboradores (2017) logra hacer una clasificación basado en 2 regiones ecológicas, sin embargo, las accesiones analizadas pertenecían todas a la raza mexicana, lo cual daba a priori un rango limitado de dispersión, situación que tampoco se presentó en este estudio al no contar con una caracterización detallada a través de investigaciones previas.

Los resultados obtenidos tras la identificación de SNPs mostró un comportamiento similar a los microsatélites debido a la baja diferenciación genética entre las poblaciones analizadas como lo demuestra el índice de Tajima para los dos genes analizados. Los resultados son comparables con los obtenidos por Peraza y colaboradores(2017) quienes también reportan bajos índices de polimorfismo a nivel de nucleótidos individuales, situación que también fue reportada por Chen y colaboradores(2009, 2008) quienes además reportan un desequilibrio de ligamiento debido a la estructura poblacional inducida por la mezcla de las 3 razas de aguacate.

El nivel de estructura genética logrado por (Chen et al., 2009), quienes si logran la distinción de las razas hortícolas de las cuales provenían los cultivares analizados, puede ser atribuido a la diferencia en el número de genes estudiados, así como al número de pares de bases secuenciadas, ya que con este estudio, a través de los dos genes analizados, se obtuvo un total de 822 pares de bases, mientras que en el estudio mencionado se tuvo un total de 7450 pares de bases, siendo este factor una condicionante en la determinación de la diversidad genética encontrada.

17 Conclusiones

El uso del descriptor morfológico como herramienta para analizar la diversidad genética de los materiales de aguacate nativo colectados en las diversas zonas del país, demostró ser de utilidad en la caracterización de este recurso fitogenético. El grado de diversidad es menor comparado con datos moleculares, además, gran cantidad de los individuos analizados fueron agrupados como similares, mostrando un nivel de diversidad total comparable con otros estudios, pero estando sujeto a factores bióticos y abióticos que afectan de forma directa el fenotipo caracterizado.

La caracterización de los materiales de aguacate nativo, a través del marcador molecular AFLP, mostró que existe un alto grado de diversidad genética a nivel de individuos, así como un desbalance en la cantidad de individuos heterocigotos. También fue posible identificar que la diversidad genética a nivel de poblaciones es baja, situación que es atribuida al sistema de polinización de la especie, así como a la intervención humana en cuanto a la movilización de los materiales a partir de su lugar de origen. El marcador molecular microsatélite corroboró los datos anteriormente descritos, añadiendo a estos una estimación más precisa sobre la estructura poblacional del aguacate en la cual se observó que de la diversidad genética total atribuida en 2% a la diferencia mostrada entre poblaciones, un 33 % debido a la diferencia entre individuos dentro de las poblaciones y un 65% debido a la diferencia entre el total de individuos. Estos datos fueron confirmados a través de los índices F de Wrigth los cuales mostraron un nivel considerable de endogamia por el exceso de individuos homocigotos que sugieren un proceso de domesticación de la especie, así como un bajo nivel de diferenciación entre poblaciones. Lo anteriormente descrito, también fue corroborado con el alto valor encontrado en el flujo genético, el cual indica el constante proceso de migración de individuos entre las poblaciones estudiadas. Estas situaciones también fueron observadas tras la identificación de los SNPs en los genes analizados debido al bajo índice de polimorfismos a nivel de nucleótidos individuales.

El análisis de diversidad genética a través de caracterización morfológica, demostró ser de utilidad para discriminar entre los individuos analizados, sin embargo, debido a la

presencia de cruces interraciales, así como a la influencia ambiental, este tipo de descriptor no es del todo adecuado debido a la complejidad de la especie. Los marcadores moleculares fueron más efectivos en la determinación de la diversidad genética por el nivel de detalle que se logró pudiendo esclarecer la estructura genética de las poblaciones, además, debido a la amplitud de estudios disponibles con los mismos marcadores moleculares, es posible realizar comparaciones sin riesgo de algún tipo de influencia ambiental, como sucedería con los descriptores morfológicos dada la variación de factores en las diferentes zonas comparadas. Además, el uso de marcadores moleculares permitió no solo la diferenciación genética entre individuos, sino además brindó un panorama sobre el comportamiento del flujo genético que se presenta en el país. Esto ayuda a entender como se presenta en la actualidad el proceso de recombinación entre los materiales, reafirmando la riqueza genética de la especie, la cual debe ser valorada y resguardada por representar una fuente invaluable de recursos para futuros programas de mejoramiento genético.

18 Impacto esperado

Este estudio contribuye con la descripción detallada a nivel genético del aguacate nativo guatemalteco, encontrando un alto nivel de diversidad genética entre los individuos analizados, el cual ha sido favorecido por el tipo de polinización de la especie, así como a la movilización de los materiales a través de largas distancias desde sus poblaciones originarias por efecto de la comercialización de los materiales nativos a nivel nacional.

Este estudio también deja claro que la alta tasa de migración entre poblaciones ha generado un incremento en el flujo genético, razón por la cual el nivel de diferenciación a nivel de poblaciones es menor al mostrado a nivel de individuos, situación demostrada a través de los índices de estructura poblacional calculados. Por último, tras reafirmar la alta diversidad genética de la especie a nivel nacional, se sugiere realizar nuevas investigaciones que lleven al desarrollo de nuevos materiales genéticamente mejorados a través del amplio reservorio genético que esta especie presenta en el país.

19 Referencias

- Acheampong, A. K., Akromah, R., Ofori, F. A., Takrama, J. F., Saada, D., Bitton, I., & Lavi, U. (2008). Genetic Characterization of Ghanaian Avocados Using Microsatellite Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(6), 801–809.
- Adamack, A., & Gruber, B. (2014). PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 384–387. doi:10.1111/2041-210x.12158
- 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, 244–253. doi:10.1111/j.2007.0018-0661.02019.x
- Alcaraz, M. L., & Hormaza, J. I. (2011). Influence of physical distance between cultivars on yield, outcrossing rate and selective fruit drop in avocado (*Persea americana*, Lauraceae). *Annals of Applied Biology*, 158(3), 354–361. doi:10.1111/j.1744-7348.2011.00469.x
- Álvarez, S. P., Ávila, G., & Coto, O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36(2), 111–123.
- 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. doi:10.1093/jhered/esg076
- Ashworth, V. E. T. M., Kobayashi, M. C., Cruz, M. D., & Clegg, M. T. (2004). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae*, 101, 255–267. doi:10.1016/j.scienta.2003.11.008
- Avila, M. de L., Hernández, O. V. H., & Verlarde, E. (1996). The Diet of Resplendent Quetzal (*Pharomachrus Moncinno mocinno*: Trogonidae) in a Mexican Cloud Forest. *Biotropica*, 28(4), 720–727. doi:10.2307/2389058
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–241.
- Azurdia, C., Williams, K., Williams, D., van Damme, V., Jarvis, A., & Castaño, S. (2011). Guatemalan Atlas of Crop Wild Relatives. Recuperado de: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.html?docid=22225>
- Bergh, B. (1974). The remarkable avocado flower. *California Avocado Society*, 57, 40–41.
- Bergh, B. (1992). The Origin, Nature, and Genetic Improvement of the Avocado. *California Avocado Society*, 76, 61–75.
- 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. doi:10.1007/s10722-018-0608-7
- Cañas, G., Galindo, L., Arango, R., & Saldamando, C. (2015). Diversidad genética de cultivares de aguacate. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 129–143. doi:10.15517/am.v26i1.16936

- Cerda-Hurtado, I., Ojeda-Zacarías, M., Iracheta-Donjuan, L., de la Cerda, J., Torres-Castillo, J., & Gutiérrez-Díez, A. (2015). Variabilidad genética de cultivo in vitro de aguacate raza mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 243–250.
- Chang, T., Lu, M., Liu, C., & Chen, I. (2003). Genetic Diversity Analysis of Taiwan Avocado Accesions. En I. Hormoza (Presidencia). *V World Avocado Congress*. Congreso llevado a cabo en Málaga, España.
- Chen, C. R., Condrón, L. M., & Xu, Z. H. (2008). Impacts of grassland afforestation with coniferous trees on soil phosphorus dynamics and associated microbial processes: A review. *Forest Ecology and Management*, 255(3–4), 396–409. doi:10.1016/j.foreco.2007.10.040
- Chen, H., Morrel, P., Ashworth, V., de la Cruz, M., & Clegg, M. (2009). Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. *The American Genetic Association*, 100(1), 56–65. doi:10.1093/jhered/esn068
- Chen, H., Morrell, P. L., de la Cruz, M., & Clegg, M. T. (2008). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Heredity*, 99(4), 382–389. doi:10.1093/jhered/esn016
- Coffey, M., Guillemet, F., Schieber, G., & Zentmyer, G. (1988). *Persea schiedeana* and Martin Grande: the period from 1920 to 1975. *California Avocado Society*, 72, 107–120.
- Corona, E., Galindo, M., Lee, H., & Landero, I. (2016). Diversidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill.) en cuatro zonas de su área de dispersión natural. *Agroproductividad*, 9(6), 80–85.
- Cuiris, H., Guillén, H., Pedraza, M., López, J., & Vidales, I. (2009). Genetic variability within mexican race avocado (*Persea americana* Mill .) Germplasm collections determined by ISSRs. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2), 169–175.
- Davenport, T. (1986). Avocado Flowering. *Horticultural Reviews*, 8, 257–289.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M., Clegg, M. T., Michael, T., & Allen, P. C. K. (1998). Genealogical Relationships Among Cultivated Avocado as Revealed Through RFLP Analyses. *The Journal of Heredity*, 89(4), 319–323.
- Delgado, G. (2001). La biopiratería y la propiedad intelectual como fundamento del desarrollo biotecnológico. *Problemas Del Desarrollo*, 32(126), 175–209.
- Dwomoh, A., & Takrama, J. F. (2014). Genetic characterisation of avocado (*Persea americana* Mill) in two regions of Ghana. *African Journal of Biotechnology*, 13(5), 4620–4627. doi:10.5897/A
- Earl, D. A., & von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7
- Ferrer Pereira, H., Perez Almeida, I., & Raymúndez Urrutia, M. (2017). Genetic characterization and diversity among avocado (*Persea americana* Mill.) genotypes from INIA-CENIAP, Venezuela. *Tree Genetics and Genomes*, 13(3). doi:10.1007/s11295-017-1128-x
- Fiedler, J., Bufler, G., & Bangerth, F. (1998). Genetic relationships of avocado (*Persea*

- americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica*, 101, 249–255.
- Furnier, G. R., Cummings, M. P., & Clegg, M. T. (1990). Evolution of the Avocados as Revealed by DNA Restriction Fragment Variation. *Journal of Heredity*, 81, 183–188.
- Galindo-Tovar, M., & Arzate-Fernández, A. (2010). Consideraciones sobre el origen y primera dispersión del aguacate Lauraceae. *Cuadernos de Biodiversidad*, 33, 11–15.
- Galindo-Tovar, M., Ogata-Aguilar, N., & Arzate-Fernández, A. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources Crop Evolution*, 55, 441–450. doi:10.1007/s10722-007-9250-5
- Galindo-Tovar, M., Milagro, P., Alejandro-Rosas, J., Leyva, O., Landero, I., Lee, H., & Murguía, J. (2011). Relaciones genéticas del Aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios del centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 339–346.
- Galindo-Tovar, M., Arzate, A., Ogata, N., & Landero, I. (2007). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 12(2), 325–334.
- Griswold, H. (1945). The Hass Avocado. *California Avocado Society*, 30, 27–31.
- 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 and Genomes*, 9(2), 539–555. doi:10.1007/s11295-012-0577-5
- Gutiérrez, A., de la Cerda, J., García, E., Iracheta, D., Ocampo, J., & Cerda, I. (2009). Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista. Fitotenia Mexicana*, 32(1), 9–18.
- Gutiérrez Díez, A., Sánchez González, E. I., Torres Castillo, J. A., & Ojeda Zacarías, M. D. C. (2015). Genetic Diversity of Mexican Avocado in Nuevo Leon, Mexico. In M. Caliskan, G. Cevahir, H. Kavakli, & B. Ozcan (Eds.), *Molecular Approaches to Genetic Diversity* (pp. 141–159).
- Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., Espíndola-Barquera, M. del 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, 1–10. doi:10.3389/fpls.2017.00243
- Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., & Jarret, R. L. (2017). Genetic Structure and Selection of a Core Collection for Long Term Conservation of Avocado in Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–10. doi:10.3389/fpls.2017.00243
- International Plant Genetic Resources Institute (1995). Descriptor for avocado (*Persea* spp.). (I. P. G. R. Institute, Ed.). Rome.
- León, J. (2003). Nikolai Ivanovich Vavilov: padre de la fitogeografía aplicada. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 67, 1–4.
- Martins, A. B. G., Rodrigues, M. G. F., Paula, D. R. de, Mendes, H. S. J., Arantes, F. C., & Silva, C. L. S. P. (2011). Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microsatélites. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(4), 1178–1184. doi:10.1590/S0100-29452011000400016

- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., & Lavi, U. (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill) cultivars and between *Persea* species. *Theor Appl Genet*, *94*, 279–286.
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (2016). El Agro en cifras 2016. (MAGA. Dirección de Planeamiento, Ed.). Guatemala.
- Nerdo, N., Medina, R., Luis, J., Lorenzo, F., Arbelo, O. C., Fiallo, R. F., ... Rohde, W. (2009). Agro-morphologic traits , isoenzyme and DNA markers for estimating the polymorphism levels , discriminating capacity and informativeness in avocado. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, *40*(1), 63–74.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, *20*(2), 289–290. doi:10.1093/bioinformatics/btg412
- Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, *6*, 288–295.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, *28*, 2537–2539.
- Peraza, A. Y., Pereyra, M. A., Sandoval, E., Medina, S., Valdez, M., Clegg, M. T., & Calderón, C. L. (2017). Exploring genetic variation, oil and a-tocopherol content in avocado (*Persea americana*) from northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*(3), 443–449. doi:10.1007/s10722-016-0478-9
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, *155*, 945–959. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Quadrana, L., Almeida, J., Asís, R., Duffy, T., Dominguez, P. G., Bermúdez, L., ... Carrari, F. (2014). Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits. *Nature Communications*, *5*, 1–11. doi:10.1038/ncomms5027
- Rambaut, A. (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ramírez, I. M., Fuentes, J. L., Rodríguez, N. N., Coto, O., Cueto, J., Becker, D., & Rohde, W. (2005). Diversity analysis of Cuban avocado varieties based on agro-morphological traits and DNA polymorphisms. *Journal of Genetics and Breeding*, *59*(3–4), 241–252. doi:10.1051/0004-6361/201117847
- Reyes-Alemán, J. C., Serrano-Hernández, M., Mejía-Carranza, J., Vázquez-García, L. M., Urbina-Sánchez, E., Valadez-Moctezuma, E., ... Espíndola-Barquera, M. de la C. (2017). A genetic diversity study of *Persea*. *Acta Horticulturae*, (1203), 147–154. doi:10.17660/ActaHortic.2018.1203.22
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., Simuta-Velázco, L., Barrientos-Priego, A., & Gallegos-Vázquez, C. (2013). RAPD e ISSR de ADN 1 * Distinction of species of the genus *Persea* by Resumen Introducción. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *4*(4), 517–529.
- Reyes, J., Valadez, E., & Barrientos, A. (2016). Assessment of genetic relationship in *Persea* spp by traditional molecular markers. *Genetic and Molecular Research*, *15*(2), 1–11.

- Rincón, C., Sánchez, J., & Espinosa, F. (2011). Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *82*, 395–412.
- Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, *4*(1), 5–7. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- Sarr, M., Goeschl, T., & Swanson, T. (2008). The value of conserving genetic resources for R&D: A survey. *Ecological Economics*, *7*, 184–193. doi:10.1016/j.ecolecon.2008.03.004
- 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. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, *128*(6), 881–889.
- Sharon, D., Cregan, P. B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav, E., & Lavi, U. (1997). An integrated genetic linkage map of avocado. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, *95*, 911–921. doi:10.1007/s001220050642
- Smith, C. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, *20*, 169–175. doi:doi:10.1007/bf02904012
- Solórzano, S., Castillo, S., Valverde, T., & Avila, L. (2000). Quetzal abundance in relation to fruit availability in a cloud forest in southeastern Mexico. *Biotropica*, *32*(3), 523–532. doi:10.1111/j.1744-7429.2000.tb00498.x
- Storey, W., Bergh, B., & Zentmyer, G. (1986). The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society*, *70*, 127–133.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, *105*, 437–460.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729.
- Thorp, G., & Hallet, I. (1999). Searching for "p paradise" in the avocado germplasm. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *5*, 29–35.
- Vekemans, X., Beauwens, M., Lemaire, M., & Ruiz-Roldán, I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size X. *Molecular Ecology*, *11*, 139–151. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x
- Viikari, J., Niinikoski, H., Raitakari, O. T., & Simell, O. (2009). The initiatives and outcomes for cardiovascular risks that can be achieved through paediatric counselling. *Curr Opin in Lipidol*, *20*(1), 17–23. doi:10.1097/MOL.0b013e32831b4685
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van De Lee, T., Hornes, ... Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, *23*, 4407–4414.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, *15*, 323–354.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special

regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395–420.

Zentmyer, G., Schieber, G., & Guillemet, F. (1988). History of the Martin Grande rootstock. *California Avocado Society*, 72, 121–125.

20 Apéndices

Apéndice 1: Fotografías de individuos de aguacate nativo guatemalteco colectados.





Apéndice 2. Listado de árboles de aguacate utilizados para realizar el estudio de diversidad genética

No. Población	Nombre de la población	Muestra	Coordenadas
1	Sacatepéquez – Chimaltenango	1	14.499084 -90.710444
1		2	14.501618 -90.713366
1		3	14.501894 -90.713376
1		4	14.514791 -90.722239
1		5	14.514791 -90.72224
1		6	14.536685 -90.719099
1		7	14.542975 -90.726475
1		8	14.542776 -90.729386
1		9	14.547072 -90.729869
1		10	14.573025 -90.725907
1		11	14.581706 -90.712966
1		12	14.582495 -90.71238
1		13	14.582832 -90.71246
1		14	14.587733 -90.712302
1		15	14.587392 -90.712407
1		16	14.587392 -90.712407
1		17	14.583553 -90.7108
1		18	14.592934 -90.70387
1		19	14.593163 -90.703807
1		20	14.597534 -90.701778
1		21	14.602617 -90.676932
1		22	14.599708 -90.685818
1		23	14.605867 -90.674059
1		24	14.566996 -90.698572
1		25	14.560362 -90.704788
1		26	14.549411 -90.678352
1		27	14.558024 -90.667451
1		28	14.564742 -90.667365
1		29	14.569826 -90.667363
1		30	14.633935 -90.688124
1		31	14.633921 -90.688754
1		32	14.633932 -90.688899
1		33	14.66051 -90.702537
1		34	14.66051 -90.702537

Apéndice 2. Continuación

No. Población	Nombre de la población	Muestra	Coordenadas	
1	Sacatepéquez – Chimaltenango	35	14.661699	-90.702087
1		36	14.661699	-90.702087
1		37	14.664689	-90.702351
1		38	14.665042	-90.702421
1		39	14.671132	-90.777799
1		40	14.671388	-90.7084
1		41	14.674167	-90.712771
1		42	14.67029	-90.712365
1		43	14.667215	-90.712269
1		44	14.58112	-90.785472
1		45	14.581018	-90.785611
1		46	14.580537	-90.785381
1		47	14.58066	-90.7853
1		48	14.578863	-90.784488
1		49	14.575679	-90.798874
1		50	14.574025	-90.799294
1		51	14.572448	-90.799295
1		52	14.571811	-90.799512
1		53	14.594851	-90.800779
1		54	14.628828	-90.821178
1		55	14.615092	-90.843205
1		56	14.611246	-90.843536
1		57	14.610395	-90.843729
1		58	14.607025	-90.846238
1		59	14.603668	-90.843533
1		60	14.592587	-90.860757
1		61	14.571379	-90.860981
1		62	14.531302	-90.908154
1		63	14.506415	-90.947807
1		64	14.520607	-90.940018
1		65	14.520568	-90.939719
1	66	14.52057	-90.939609	
1	67	14.536644	-90.901122	
1	68	14.53703	-90.900202	
1	69	14.540379	-90.900573	
1	70	14.540958	-90.900216	
1	71	14.541179	-90.900448	

Apéndice 2. Continuación

No. Población	Nombre de la población	Muestra	Coordenadas	
1	Sacatepéquez – Chimaltenango	72	14.54115	-90.900201
1		73	14.588676	-90.905395
1		74	14.560535	-90.936955
1		85	14.651803	-90.814232
1		86	14.630774	-90.814232
1		87	14.630771	-90.813504
1		88	14.630533	-90.815402
2	Chimaltenango	75	14.772801	-90.979682
2		76	14.7822	-90.968018
2		77	14.791581	-90.971092
2		78	14.788217	-90.977298
2		79	14.740921	-90.993929
2		80	14.740985	-90.99411
2		81	14.740579	90.994178
2		82	14.714196	-91.006366
2		83	14.697365	-91.015013
2		84	14.654072	-90.956119
2		195	14.697368	-91.015017
2		200	14.69737	-91.015011
2		202	14.697371	-91.015015
2		208	14.697369	-91.015013
3	Totonicapán – Quiché	89	15.016762	-91.376489
3		90	15.015578	-91.372608
3		91	15.025797	-91.353402
3		92	15.025239	-91.349722
3		93	15.025293	-91.349777
3		94	15.024666	-91.348965
3		95	15.02466	-91.348785
3		96	15.024957	-91.345479
3		97	15.025122	-91.345723
3		98	15.025204	-91.345516
3		99	15.026756	-91.33777
3		100	15.026885	-91.337643
3		101	15.026993	-91.337947
3		102	15.026603	-91.338065
3		103	15.026837	-91.344428
3		104	15.009292	-91.427768

Apéndice 2. Continuación

No. Población	Nombre de la población	Muestra	Coordenadas
3	Tonicapán – Quiché	105	15.014526 -91.423904
3		106	15.014492 -91.424017
3		107	15.014668 -91.423302
3		108	15.019867 -91.419369
3		109	15.020777 -91.417825
3		110	15.02208 -91.417825
3		111	15.023092 -91.417852
3		112	15.024172 -91.416888
3		113	15.033096 -91.412529
3		114	15.038063 -91.409089
3		115	15.054025 -91.470372
3		116	15.060058 -91.457417
3		117	15.063802 -91.454182
3		118	15.079333 -91.454551
3		119	15.079353 -91.454516
3		120	15.079199 -91.454666
3		121	15.086526 -91.464298
3		141	15.06089 -91.155096
3		142	15.055377 -91.154896
3		143	15.055177 -91.154832
3	144	15.055164 -91.154731	
3	145	15.043017 -91.150953	
3	146	15.042928 -91.151099	
3	192	15.024959 -91.345474	
3	198	15.02496 -91.345479	
3	205	15.024959 -91.345474	
4	Huetenango – Quiché	122	15.353102 -91.455934
4		123	15.349129 -91.454542
4		124	15.348762 -91.45466
4		125	15.348472 -91.454339
4		126	15.343208 -91.331718
4		127	15.347797 -91.331147
4		128	15.347666 -91.330773
4		129	15.344683 -91.328966
4		130	15.34443 -91.328237
4		131	15.343792 -91.325111
4	132	15.343228 -91.301091	

Apéndice 2. Continuación

No. Población	Nombre de la población	Muestra	Coordenadas		
4	Huetenango – Quiché	133	15.345152	-91.297171	
4		134	15.345838	-91.2664	
4		135	15.345915	-91.296346	
4		136	15.345994	-91.296283	
4		137	15.286402	-91.153614	
4		138	15.287202	-91.154492	
4		139	15.287966	-91.154989	
4		140	15.289128	-91.155838	
4		197	15.345837	-91.2664	
4		199	15.345838	-91.2665	
4		201	15.345838	-91.2664	
4		204	15.34584	-91.2663	
5	Sololá	194	14.812899	-91.178505	
5		196	14.812896	-91.178506	
5		203	14.812892	-91.178508	
5		206	14.812892	-91.178507	
5		147	14.811288	-91.173351	
5		148	14.812916	-91.178578	
5		149	14.812896	-91.178506	
5		150	14.821319	-91.172999	
5		151	14.824382	-91.167861	
5		152	14.822972	-91.165582	
5		153	14.820419	-91.160831	
5		154	14.821021	-91.158819	
5		155	14.824684	-91.149857	
6		Baja Verapaz	156	15.205213	-90.205938
6			157	15.205447	-90.20601
6	158		15.205567	-90.206116	
6	159		15.233604	-90.230962	
6	160		15.237245	-90.233268	
6	161		15.239315	-90.232938	
6	162		15.239192	-90.232901	
6	163		15.23961	-90.228842	
6	164		15.235969	-90.231004	
6	165		15.232976	-90.233614	
6	166		15.233028	-90.233841	

Apéndice 2. Continuación

No. Población	Nombre de la población	Muestra	Coordenadas	
7	Alta Verapaz	167	15.371854	-90.454024
7		168	15.371924	-90.454099
7		169	15.37617	-90.46139
7		170	15.379978	-90.460214
7		171	15.381856	-90.459206
7		172	15.381841	-90.459286
7		173	15.384155	-90.458742
7		174	15.384678	-90.458165
7		175	15.384583	-90.458326
7		176	15.369487	-90.468089
7		177	15.422677	-90.300743
7		178	15.421047	-90.299762
7		179	15.419494	-90.29963
7		180	15.469167	-90.299635
7		181	15.419441	-90.299646
7		182	15.417853	-90.299168
7		183	15.424915	-90.298933
7		184	15.425376	-90.295919
7		185	15.42608	-90.292124
7		186	15.426085	-90.292105
7	187	15.426065	-90.29229	
7	188	15.426065	-90.29229	
7	189	15.426334	-90.289615	
7	190	15.423036	-90.274521	

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Gregorio Amílcar Sánchez Pérez	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	Investigador	20101438	X		
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	X		

Guatemala ____11____ de febrero ____2018____

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
 Coordinador del proyecto de Investigación

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Programa Universitario de Investigación

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Coordinador General de Programas