

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE ADN DE LA COLECCIÓN NACIONAL
DE AGUACATE COMERCIAL DE LA CORPORACIÓN COLOMBIANA DE
INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (CORPOICA)**

**PRESENTADO POR:
CECILIA ITZEL PINEDA LÓPEZ**

**TESIS
PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE ADN DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE
AGUACATE COMERCIAL DE LA CORPORACIÓN COLOMBIANA DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (CORPOICA)

POR:

CECILIA ITZEL PINEDA LÓPEZ

HILSY SANABRIA, MS.c

Asesor Principal

JAIME EDUARDO MUÑOZ F., PhD.

ANDRÉS MAURICIO POSSO, MS.c

Asesores (Colombia)

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS

DICIEMBRE, 2011

DEDICATORIA

Al que alimenta y renueva mi alma cada mañana, a aquel que me escucha y fortalece sin importar las circunstancias, al creador del universo y al que amo con toda mi alma

Jehová mi Dios

A las mujeres que más amo en esta tierra, las que admiro por su coraje y valentía, las que me motivan, las que me han enseñado que pase lo que pase la vida continua y que en momentos buenos y de pruebas somos una sola con la ayuda de Dios; a las que no encuentro palabras para expresarles todo lo que siento...A mi **SÚPER MAMÁ CONCHITA**, más que madre, amiga, consejera, maestra y mucho más; a mi hermana gemela **CECI**, porque jamás se rinde sin importar las opiniones de los demás, por su osadía de seguir siempre adelante, a mi **PAO**, mi hermanita, porque tu tampoco te rindes y vas siempre a la carrera siendo la mejor, apoyándome aun en medio de la distancia, y a mí porque también he puesto de mi parte.

A mi Papá **JULIO** al que quiero con todo mi corazón, por sus esfuerzos, por su perseverancia, por demostrarme su cariño, por darme todo su apoyo en medio de la distancia.

A mis abuelas Macrina Lagos, Cecilia Alvarado QDDG, a mis abuelos Daniel López y Pablo Pineda QDDG. A todos mis tíos, tías, primas y primos

A mi Tío Juan Carlos y familia.

A mis compañeros, amigos y hermanos de la EAO, especialmente a Gersan, José Luis, Arnold, Idmir, Sammy, Erika, Leo y Luis Miguel.

A mis mejores amigos de la clase ARMAGEDON, del Ministerio Amigos de Jesús, y a todos y todas aquellas personas que son muy especiales para mí, en esta universidad, espero se den aludidos.

AGRADECIMIENTO

A Dios, el creador del universo, el que ha brindado a mi vida, sabiduría y entendimiento porque ha cumplido su palabra en mí, diciendo: Te hare entender, y te enseñare el camino que debes andar; y sobre ti fijare mis ojos (Salmos 32.8). El ha escrito y hecho posible cada página de mi vida, haciéndome alcanzar esta meta y seguir hacia delante siempre.

A mis Padres María C. López y Julio Pineda, mis hermanas Paola Daniela y Ana Cecilia Pineda, por su amor, amistad, confianza, consejos y preocupaciones y su apoyo incondicional hacia mí, a los cuales amo como a nadie en este mundo.

A la Clase Armagedón, en especial a mis amigos: Mario Santos, por ayudarme a terminar mi investigación; a Ariel Ramos, German Pacheco, Wilson Oduber, Joel Auceda, Horlin Duarte, Perla Navarro, Angie Canelas, Ramón Avila, Nohe Quiroz, José Adolfo, Eduardo Pinto, Walter Pereira, Cinthya Alvares, Bessy Ferrufino, Marisol Orellana, Marizol Granados, Darcy Martinez, Nanci Raudales, Raquel Ferrera, Susan Gomez y muchos más.

A mis amigos UNA que no forman parte de mi clase, pero si de mí. Nidia Melgar, Tatiana Guevara, Julia Escobar, Nevin Molina, Victor Arriaza, a todas las persona que siempre estuvieron brindándome su apoyo, aprecio y consejos. Espero se den por aludidos.

A mis Asesores Wilmer Reyes, Hilsy Sanabria, Héctor Díaz y Andrés Posso y toda la “familia molecular”; por compartir sus conocimientos y su tiempo, con migo.

Al Lic. Alex Dubón, por brindarnos su confianza y permiso para trabajar en la sala de informática. Muchas gracias por sus enseñanzas.

Al Ministerio Amigo de Jesús, en el que compartimos grandes momentos, como amigos y hermanos, estando en un mismo pensar y sentir, siendo guiados por Dios, para lograr ser Estudiantes, Alcanzando Estudiantes.

A la Universidad Nacional de Agricultura: en especial a todos los empleados y empleadas, que sin darse o no cuenta, formaron parte de mi estadía y educación aquí en la Universidad, Porque hacen posible que personas como yo, alcancemos esta meta.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I INTRODUCCIÓN	1
I OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos específicos	2
III REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1 Clasificación botánica y Origen del aguacate:	3
3.2 Descripción botánica.....	3
3.3 Propagación	4
3.4 Requerimientos agroecológicos	4
3.5 Características fenotípicas para la diferenciación de las razas de aguacate	5
3.5.1 Raza Mexicana	5
3.5.2 Raza guatemalteca:.....	5
3.5.3Raza antillana:	5
3.6 Variedades comerciales	5
3.7. Diversidad genética comercial en Colombia	6
3.8 Composición nutricional del fruto.....	7
3.9. Producción Mundial	8
3.10. Importancia económica	10
3.11. Banco de germoplasma.....	10
3.12. Banco de ADN	11
3.13 Diversidad genética.....	11
3.14 Micro satélites Amplificados al Azar (RAMs)	12

3.15	Análisis estadístico de RAMs	13
3.16	Polimerización de ADN (PCR)	13
3.17	Análisis de grupos o clusters	14
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1	Localización	16
4.2	Materiales y equipo.....	16
4.3	Colecta.....	17
4.4	Liofilización	17
4.5	Preparación de reactivos	18
4.5.1	Preparación de reactivos para Buffer de extracción.....	18
4.5.2	Preparación de cebadores	19
4.5.3	Preparación de BSA	19
4.5.4	Preparación de DNTPs	20
4.5.5	Preparación del azul de carga para 13 ml.....	20
4.6	Extracción de ADN	20
4.7	Preparación del Gel de Agarosa.	21
4.8	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	23
4.9	Cebadores RAM's	24
4.10	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	24
4.11.	Tinción en plata de geles de poliacrilamida de 10 x 12 cm	26
4.12	Análisis de la información	27
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1	Extracción del ADN	28
5.3	Caracterización de los cebadores	29
5.4	Análisis descriptivo	30
5.5	Heterocigosidad esperada (He) y porcentaje de loci polimórfico	32
VI.	CONCLUSIONES.....	36
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS		40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización por raza (Herrera R. 2009).....	5
Tabla 2. Caracterización fenotípica de algunas variedades de aguacate comercial (Herrera 2009).	6
Tabla 3. Variedades de aguacate aptas para el cultivo en las diferentes altitudes. (ANACAFE 2004).....	6
Tabla 6. Países Productores de Aguacate Producción en 1,000 Toneladas Año 2009 (Perfil Económico del aguacate 2011).	9
Tabla 7. Principales Exportadores Mundiales de Aguacate 2006-2010 (Valores en Miles de US\$) (Perfil Económico del Aguacate 2011).	9
Tabla 8 Principales Importadores Mundiales de Aguacate 2006-2010 (Valores en Miles de US\$) (Perfil Económico del Aguacate 2011)	10
Tabla 9. Reactivos para preparación de buffer.	19
Tabla 10. Protocolo de Extracción de ADN (Dellaporta <i>et al</i> 1983)	21
Tabla 11. Orden de los reactivos con los respectivos valores de concentración final para 17 muestras..	23
Tabla 12. Reactivos y cantidades para realizar el gel de poliacrilamida.	25
Tabla 13. Preparación de geles de poliacrilamida	26
Tabla 14. Descripción de grupos y subgrupos formados por el dendrograma.	30
Tabla 15. Valores de heterosigosidad y porcentaje de loci polimórficos.	32
Tabla 16. Distancias Genéticas insesgada, entre las accesiones de Aguacate Comercial NeiSunbiased (1978).	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestras de ADN corridas en gel de agarosa**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. Muestras de ADN corridas en gel de poliacrilamida Cebador CT..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 3. Dendrograma de distancia genética de 29 accesiones de aguacate comercial, basado en el coeficiente de similitud de Nei-li (1978). Resultado del análisis de 3 cebadores (CA, CGA, CT). 31

Figura 4. Dendrograma de distancia genética calculado con el índice de Nei (1978) construido con el método de UPGMA para los cuatro grupos formados.**¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla de identificación de accesiones.....	41
Anexo 2 Aislamiento de ADN genómico.....	42

Pineda López C. I. 2011. Establecimiento de un banco de ADN de Aguacate comercial, del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agrícola. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura, Olancho, Honduras.

RESUMEN

El presente trabajo consistió en la recolección de tejido foliar joven de 29 accesiones diferentes, procedentes del banco de germoplasma de aguacate comercial (*Persea americana* Mill), establecido en CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agrícola); con el fin de extraer ADN para establecer una colección genética, en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, y así favorecer futuras investigaciones. Se trabajó con el protocolo de extracción según Dellaporta, con algunos cambios, cada muestra pasó por un proceso de purificación. Por medio de geles de agarosa al 8% y electroforesis se determinó la presencia de ADN, posteriormente se realizó PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando marcadores moleculares RAMs a temperaturas de hibridación estándar es para los tres cebadores. La preparación del coctel de PCR se realizó en una cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia. Con esta técnica se logró separar los productos amplificados; utilizando geles de agarosa al 1.2% y geles de poliacrilamida, se observó alta resolución y mejor separación de los fragmentos en este último, obteniendo mayor número de bandas por marcador. Se utilizaron tres cebadores RAMs (CCA, CGA, CT) en las 29 muestras de ADN, dando como resultado 59 bandas; con ayuda de programas para análisis de datos moleculares y estimación de parámetros de diversidad genética, se obtuvo un porcentaje de heterocigosidad de 0,3440 y loci polimórfico de 96,6102 esto indica que la colección nacional de aguacate presenta heterocigosidad en sus accesiones encontrándose alta diferenciación genética entre los grupos formados mediante el análisis molecular. En la agrupación por clúster se definieron cuatro grupos dominantes y 7 subgrupos presentándose 4 accesiones atípicas.

Palabras Claves: accesiones, germoplasma, RAMs, PCR.

ABSTRACT

I INTRODUCCIÓN

El aguacate es un cultivo originario de Mesoamérica, siendo Guatemala uno de los centros de origen mas importante en el mundo. Existen tres razas definidas, la mexicana, guatemalteca y antillana, todas con características específicas tanto en calidad como en adaptación climática. La importancia de la fruta radica en las características nutritivas que posee para consumo fresco, extracción de aceites para la elaboración de cosméticos y medicamentos Naturales (Olaeta 2003).

Ante la escasez de alimentos y las necesidades cada vez mayores de la población los estudios de la diversidad genética dentro de estos bancos de genes son una de las herramientas que ayudan a tener un control más efectivo sobre la erosión genética. Permiten definir los patrones de variación que determinan la incorporación de individuos a programas de mejoramiento genético, ya sea por sus características promisorias o por susceptibilidad a condiciones bióticas o abióticas, facilitando la incorporación de genes y el establecimiento de la mejor estrategia reproductiva (Demey 2008). Los bancos de germoplasma tienen como objetivo preservar la diversidad de los recursos fito genéticos de las especies cultivadas y sus especies relacionadas (Martín *et al.* 2002).

La Corporación Colombiana De Investigación Agrícola (CORPOICA) y la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira; han hecho innumerables esfuerzos para establecer bancos de germoplasma y ADN con el fin de realizar estudios y mejoramiento genético y de esta forma mantener información de los recursos fitogenéticos disponibles. El presente trabajo consistió en el establecimiento de un banco de ADN de 29 accesiones de aguacate comercial, para realizar estudios de variabilidad genética utilizando marcadores moleculares RAMs con tres cebadores aplicados a toda la población, técnicas de PCR

I OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Establecimiento de un banco de ADN de aguacate comercial, perteneciente a la colección Nacional de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) para su caracterización molecular.

2.2 Objetivos específicos

Colectar 29 accesiones de tejido foliar joven de aguacate comercial, pertenecientes al banco de germoplasma de CORPOICA.

Realizar análisis estadísticos con los datos moleculares obtenidos

Estandarizar el proceso de extracción de ADN y cebadores RAMs en las accesiones colectadas

III REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Clasificación botánica y Origen del aguacate:

El aguacate o palto (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae es una especie arbórea polimórfica, originaria de una amplia zona geográfica, que se extiende desde Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*), las sierras centrales y orientales de México y Guatemala, costa Pacífico de Centro América hasta Chile (*Persea lingue*), a excepción de *Persea indica* que se encuentra en las Islas Canarias (España) y probablemente otras del sur de Asia que se piensa pertenecen a *Persea*. A partir de tipos silvestres el fruto fue mejorado durante milenios; contiene alrededor de 85 especies pertenecientes a tres razas: mexicana, guatemalteca y antillana (o “de las tierras bajas”) según la clasificación de Wilson Popenoe (1920), (Herrera. 2009).

3.2 Descripción botánica

El Aguacate es un árbol de crecimiento determinado puede alcanzar de 10 a 20 metros de altura, a veces notoriamente erecto, de tronco muy ramificado con corteza áspera y a veces surcado longitudinalmente, color pardo oscuro y el leño es de color verde claro. Su copa adquiere diversas formas, desde columnar hasta de campana; la raíz principal es corta y débil, está comprendida en los 50 primeros centímetros de suelo; las hojas coriáceas dispuestas en espiral alrededor de la rama, cuando jóvenes presentan un brillo, el envés glauco y opaco (Castro V).

El fruto es una baya mono carpa, generalmente periforme, oviforme o globosa. La piel o cascara (epicarpio) puede ser gruesa, rugosa y quebradiza, delgada o gruesa y coreosa. La pulpa es de color amarillo verdosa y verde clara y de consistencia mantequillosa.

La semilla es grande, globosa o puntiaguda y está protegida por una envoltura apergaminada al endocarpio. Los cotiledones son casi hemisféricos y de color rosado, blanco amarillentos o verde claros. Las flores son hermafroditas dicogamicas en la cual la maduración de los órganos de la flor no se realiza a un mismo tiempo, como consecuencia se pierde la capacidad de autofecundación de las flores y facilita la polinización cruzada, por tal motivo existen cultivares clasificados por grupos, A y B (Herrera R. 2009).

El crecimiento de la planta coincide con la floración y puede tener uno o más ciclos vegetativos al año. El crecimiento de esta especie se da por yemas apicales (Ordúz y Rangel 2002).

3.3 Propagación

La propagación del aguacate puede realizarse de forma asexual a partir de un porta injerto, propagado sexualmente por semilla y su posterior enjertación con la variedad comercial o bien puede ser llevada a cabo a través de técnicas clónales, como la propagación por etiolación, acodo y la micro propagación, técnica que se utiliza comercialmente en los viveros de California, Sudáfrica y Australia. (Lemus *et al*; 2005)

3.4 Requerimientos agroecológicos

El aguacate se desarrolla perfectamente en alturas que van de 400 a 1,800 msnm con un máximo de un 30% de pendiente, es susceptible a vientos fuertes, a una temperaturas de 17° a 30° C, es susceptible a heladas. Necesita de 1,200 a 2,000 mm de agua anuales bien distribuidas, no tolera encharcamientos, la humedad relativa ideal es del 60%.

Los mejores son los de textura media, suelos francos arcillo arenosos, profundos (0.80 a 1.50 metros), con buen drenaje interno y superficial, de 3 a 5% de materia orgánica y PH entre 5.5 a 6.5 (ANACAFE.2004).

3.5 Características fenotípicas para la diferenciación de las razas de aguacate

3.5.1 Raza Mexicana

Las hojas y tallos jóvenes que al ser macerados o estrujados dan olor a anís, los frutos son de corteza delgada, flores con vellosidades.

3.5.2 Raza guatemalteca:

Fruto de piel dura y quebradiza a veces granulosa, la semilla usualmente llena la cavidad que la contiene.

3.5.3 Raza antillana:

Hojas y tallos jóvenes que no dan olor a anís, frutos de piel gruesa, flexible y generalmente lisa; flores poco vellosas, de poca pulpa y semilla grande.

Tabla 1. Caracterización por raza (Herrera R. 2009).

	Mexicana	Antillana	Guatemalteca
Hojas	Olor Anís	Inodora	Inodora
	colore verde y lustrosas	color verde claro amarillento	color rojo violáceo
	8 a 10 cm de largo	20 cm de largo	15 a 18 cm de largo
Frutos	corteza: delgada y lisa	corteza: coriácea y lisa	corteza: gruesa y dura
	%Aceite: Medio-alto (27%)	%Aceite: Bajo (10%)	%Aceite: medio-alto (20%)
	peso: menor de 250g	peso: 250g-205kg	peso: 100g - 205kg
Periodo de flor a fruto	7 meses (entre 6 y 8 meses)	entre 5 y 8 meses, mayor variación	12 meses (entre 10 y 15)
Forma del pedúnculo	Forma cilíndrica	Forma intermedia	Forma cónica
Vida del fruto	8 y 10 días	4 y 5 días	hasta 5 días

3.6 Variedades comerciales

De las anteriores razas se desprenden variedades que las hacen las más apetecidas en los diversos mercados por el color de la corteza, forma, peso, tipo de semilla, grasa, sabor, producción, entre otros.

Tabla 2. Caracterización fenotípica de algunas variedades de aguacate comercial (Herrera 2009).

Variedad	Tipo flor	Peso fruta	Producción	Sabor	color cascara
Lorena	B	430	muy buena	muy bueno	verde amarillo
Trapp	B	450	muy buena	muy bueno	verde amarillo
Trinidad	A	560	muy buena	Bueno	verde oscuro
Booth7	B	450	muy buena	muy bueno	verde oscuro
Both8	B	485	muy buena	bueno	Verde
Monroe	B	850	Buena	bueno	verde oscuro
Choquette	A	900	muy buena	muy bueno	verde oscuro
Hass	A	250	muy buena	muy bueno	Verde
Fuerte	B	310	Buena	muy bueno	Verde
Reed	A	425	muy buena	muy bueno	Verde

Tabla 3. Variedades de aguacate aptas para el cultivo en las diferentes altitudes. (ANACAFE 2004).

ALTURA		
De 0-100 msnm	1.000-1.500 msnm	1.500-2.500 msnm
Simmons Catalina Booth 8 Booth 7 Masutomi Kahalú	Choquete Kahalú Hall Simpson Booth 8 Guatemala Fujikawa Itzama	Nabal (G) Azteca Fuerte Hass Ettinger Wurstz

3.7. Diversidad genética comercial en Colombia

Investigaciones realizadas por D. Rios-Castaño., R. Tafur-Reyes. En el año 2003 en Colombia, describen que la variedad ‘Lorena’, es la única nativa, mientras que las demás, se introdujeron desde Estados Unidos, México y Panamá, adaptándose a las condiciones edafo climáticas tropicales de las regiones productoras de aguacate en el país, obteniéndose buena rentabilidad, excelente calidad y árboles de vida comercial amplia, entre 20 y 30 años. Tradicionalmente, se comercializa en el mercado interno, las variedades de mayor

tamaño como: ‘Lorena’, ‘Trapica’, ‘Trinidad’ y ‘Choquette’, mientras que para mercados más especializados, agroindustria o exportación, se opta por ‘Booth 8’, ‘Collinred’, ‘Reed’, ‘Fuerte’, ‘Gwen’ y ‘Hass’.

Las evaluaciones realizadas, permitieron identificar como las más sobresalientes por su alta producción y calidad de frutos, las variedades ‘Booth 8’, ‘Choquette’, ‘Collinred’, ‘Fuerte’, ‘Gwen’, ‘Hass’, ‘Lorena’, ‘Reed’, ‘Trapica’ y ‘Trinidad’. Para la descripción y caracterización de cada una de las variedades, se evaluaron los árboles madres de las variedades ‘Booth 8’, ‘Choquette’, ‘Collinred’, ‘Fuerte’, ‘Gwen’, ‘Hass’, ‘Lorena’, ‘Reed’, ‘Trapica’ y ‘Trinidad’, existentes en Profrutales Ltda., localizado en Villa Gorgona, municipio de Candelaria, Valle, Colombia.(Rios *et al.* 2003)

3.8 Composición nutricional del fruto

El contenido nutricional depende de su ecotipo, tropical o subtropical, del grado de madurez del fruto y de las condiciones del cultivo. (Herrera 2009).

El Aguacate es un alimento consumido en fresco, aporta prácticamente todas las vitaminas requeridas por el organismo; a excepción de la vitamina B12, presente solo en el reino animal; incluye un bajo porcentaje de ácidos grasos saturados sin la presencia de colesterol, ácido ascórbico que potencializa el poder antioxidante la vitamina E. Los triglicéridos presentes en el Aguacate, no son grasas sino aceites, ya que estos permanecen líquidos a la temperatura ambiente (Ortega. 2002).

Tabla 4. Contenido mineral del aguacate o palta (Ortega. 2002).

MINERALES EN PULPA		
Minerales	Contenido en 100 gm	Necesidades diarias
Calcio	10.0 mg	800.0 mg
Hierro	1.06 mg	15.0 mg
Fosforo	40.0 mg	800 mg
Cobre	0.35 mg	1.7 mg
Magnesio	41.0 mg	300 mg
Manganeso	2.30 mg	3.5 mg
Sodio	4.0 mg	3450 mg
Potacio	463.0 mg	4900.0 mg

Tabla 5. Valor nutricional del Aguacate (Ortega. 2002).

Valor Vitamínico y aporte Nutricional	
Vitaminas	Contenido en 100g
Vitamina A	85.0 mg
Vitamina D	10.0 mg
Vitamina E	3.0 mg
Vitamina K	8.0 mg
Vitamina B1	0.11 mg
Vitamina B2	0.20 mg
Vitamina B6	0.45 mg
Niacina	1.60 mg
AC. Pantotenico	1.0 mg
Biotina	10.0 mg
Acido fólico	32.0 mg
Vitamina C	14 mg

3.9. Producción Mundial

Durante el 2008 la producción mundial de aguacate alcanzó las 3, 555,265 toneladas², en tanto que, para el 2009 esta cifra presentó crecimiento, a alcanzando las 3, 585,156 toneladas siendo México el primer productor y exportador de este rubro. El área mundial cosechada de Aguacate ascendió a 438,325 hectáreas³.

Tabla 4. Países Productores de Aguacate Producción en 1,000 Toneladas Año 2009 (Perfil Económico del aguacate 2011).

Píses Productores	2008	2009
Indonesia	225,180	257,868
Colombia	183,968	165,175
Perú	136,303	155,982
China	95,000	100,000
Rwanda	79,291	80,000
Sudáfrica	83,534	75,932
Israel	53,130	68,578
Camerún	55,000	55,000
Australia	47,238	38,478
Etiopía	42,849	32,452
Filipinas	24,180	25,000
Paraguay	13,500	14,000
República Dominicana	187,398	

Tabla 5. Principales Exportadores Mundiales de Aguacate 2006-2010 (Valores en Miles de US\$) (Perfil Económico del Aguacate 2011).

RANK	Exportadores	2010
1	México	599.67
2	Chile	122.28
3	Países Bajos	159.6
4	España	115.45
5	Perú	84.638
6	Israel	
7	Nueva Zelanda	39.573
8	Italia	38.706
9	Sudáfrica	46.243
10	Francia	20.028
11	Kenia	
12	Estados Unidos	49.49

Tabla 6 Principales Importadores Mundiales de Aguacate 2006-2010 (Valores en Miles de US\$) (Perfil Económico del Aguacate 2011)

Rank	Importadores	2010
1	Estados Unidos	616.54
2	Francia	183.51
3	Países Bajos	204.83
4	Japón	120.53
5	Canadá	80.15
6	Reino Unido	63.497
7	España	63.825
8	Alemania	58.846
9	Italia	40.746
10	Suecia	33.764
11	Australia	36.51

3.10. Importancia económica

Además de ser una de las frutas de buena producción y exportación para consumo como fruta fresca, también es un fruto esencialmente medicinal debido a las grasas vegetales y carbohidratos y la cantidad de vitaminas que contiene incluyendo la semilla; se dice que es una fruta afrodisiaca y abortiva. (Ríos 2003).

Es utilizada comúnmente en la estética ya sea fresco o procesado en maquillajes, hidratantes, y otros. Es recomendado por nutricionistas gracias a la cantidad de vitaminas, minerales y grasas vegetales no saturadas (Villanueva 2007).

3.11. Banco de germoplasma

Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN (Alegría 2001).

Resguardan la fuente de variabilidad requerida por los mejoradores de plantas para el desarrollo de cultivares que permitan al agricultor las limitaciones naturales a fin de obtener mayores beneficios de su actividad, así como asegurar la fuente contra la erosión genética (Johnny R. Demey. 2008.)

3.12. Banco de ADN

Se define como el almacenamiento de material genético (ADN) extraído de individuos de una determinada población, en congeladores a -80°C o tanques de nitrógeno líquido; con el objetivo de realizar estudio de secuencias importantes de genes y la posibilidad de transferir genes a genotipos o especies relacionadas. Esta técnica puede ser utilizada con especies amenazadas o incluso extintas tomando una pequeña cantidad de material vegetal en vivo o a partir de especímenes de herbario (Alegría 2001).

3.13 Diversidad genética

La variabilidad o diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad. Son las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. La biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos. El conocimiento de la diversidad es utilizado para evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas conscientes o inconscientes; evalúa los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que disminuyen la capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie; conocer la riqueza genética de la nación y la distribución geográfica; planea estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos; entiende las formas, la velocidad y las causas de la pérdida de la diversidad genética; evalúa los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de todos los organismos vivos (Piñero 2008).

3.14 Micro satélites Amplificados al Azar (RAMs)

Entre las técnicas disponibles para estudiar la diversidad genética vegetal se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphism), ALFP (Amplified FRagment Length Polymorphism), Micro satélites y los RAM (Random Amplified Microsatellites). Esta última técnica analiza la calidad, cantidad de ADN, condiciones de amplificación, electroforesis, análisis estadístico; usando cebadores basados en micro satélites (CT, CCA, CGA, ACA,CA). Los RAMs se basan en la polimerización al azar de porciones de la cadena de ADN (PCR); estos detectan un solo alelo por locus; el poder de resolución de los marcadores genéticos están determinados por el nivel de polimorfismo que pueden detectar. Esto se ve afectado principalmente por la frecuencia de mutación en los sitios del genoma involucrados. Hay una gran posibilidad de hallar polimorfismo mediante los RAM que por otras técnicas. (Muñoz *et al.* 2008)

Para la polimerización es necesario ADN de calidad óptima para analizar el genoma, por medio de protocolos de extracción. La aplicación de las diferentes técnicas para el genoma depende de la habilidad para obtener ADN puro, con alto rendimiento y buena calidad. Técnicas en las cuales los procesos de amplificación obligan a la utilización de Kits comerciales aumentados a costos. El ADN degradado o ligado a contaminantes provenientes de la extracción (Fenol, detergentes, otros.) pueden inhibir la cantidad de polimerasa. La precipitación con etanol y lavados con etanol al 70% eliminan contaminantes e inhibidores, pero conducen a pérdidas de la concentración inicial del material (Muñoz *et al.* 2008).

Una de las ventajas de esta técnica es que puede separar los productos amplificados utilizando geles de agarosa y o de poliacrilamida, visualizándolos en un trans iluminador para obtener más alta resolución y mejor separación de los fragmentos o bandas. El número de bandas por patrón de amplificación posiblemente se vea afectada la técnica de electroforesis utilizada (Muñoz *et al.* 2008).

3.15 Análisis estadístico de RAMs

El análisis estadístico de similitud se realiza según el coeficiente de Nei Li, Análisis de correspondencia múltiple. La matriz de similitud se constituye con un programa SIMQUAL del paquete de NTSYS (Numerical Taxonomy System For Personal Computer) donde se utiliza una matriz de variables binarias de Ceros y Unos que indican la ausencia y la presencia de bandas respectivamente.

Desde el punto de vista operativo el Análisis asocia todos los individuos con todas las características con que fueron clasificados, es decir asocia todas las filas con todas las columnas (individuos). El análisis de varianza molecular AMOVA permite establecer la existencia de grupos similares en las poblaciones (Muñoz *et al.*2008).

3.16 Polimerización de ADN (PCR)

Por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta técnica es sintetiza muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa (*taq* polimerasa) proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 °C a 85 °C). La reacción en cadena simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN. En un tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios, la polimerasa, el ADN del organismo que queremos, los oligonucleótidos (llamados también cebadores, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para la iniciación de la transcripción, di nucleotidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa). Los tubos son colocados en un termo ciclador, este calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, los ciclos de reacción consisten en: Desnaturalización del ADN a 95 °C durante la cual las dobles hélice se abren quedando en forma de cadenas sencillas; la segunda etapa es el Alineamiento a 40° y 60 °C, a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrogeno entre los oligonucleótidos y el ADN, las uniones más estables

duraran mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrogeno que se forman entre las base se estabiliza más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso, la Extensión, se da a 72 °C, temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continua la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos alineados.

En el primer ciclo se sintetizaran los primeros fragmentos a partir del ADN genómico un poco más grandes, ya que la *taq* copiara hasta donde le sea posible en cantidades indetectables. El ciclo se repite, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN inicial, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo, por lo tanto la polimerasa sintetizara 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado. De esta forma con cada ciclo aumentara el número de fragmentos del tamaño deseado. Antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95°C durante varios minutos para iniciar nuevamente con el proceso de desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso ultimo de extensión a 72°C para permitir que la *taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos (Espinosa. s. f.).

3.17 Análisis de grupos o clusters

El análisis de cluster es un método que permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos que no son evidentes a priori pero que pueden ser útiles una vez que se han encontrado. Los resultados de un Análisis de Clusters pueden contribuir a la definición formal de un esquema de clasificación tal como una taxonomía para un conjunto de objetos, a sugerir de los estadísticos para describir poblaciones, a asignar nuevos individuos a las clases para diagnóstico e identificación, etc.

Un dendrograma es una representación gráfica en forma de árbol que resume el proceso de agrupación en un análisis de clusters. Los objetos similares se conectan mediante enlaces

cuya posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre los objetos (Villardón s. f.).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

El experimento se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Municipio del Departamento del Valle del Cauca. Latitud 03° 31' 48"N y longitud 76° 18' 13"O. Se encuentra a una altura de 1.001 m.s.n.m. y tiene una temperatura promedio de 23°C. (Microsoft ® Encarta ®, 2008, citado por Lavaire, 2009).

La Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, está ubicada en la carrera 32 sobre la carretera que conduce a las poblaciones de Candelaria y El Bolo. En sus alrededores se encuentran la Corporación de Investigaciones Agropecuarias (CORPOICA) y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Londoño, 2003).

El trabajo se realizó durante los meses de Julio y Agosto, consistió en la recolección de tejido vegetal (hojas jóvenes) de aguacate comercial, procedentes de la colección Nacional de germoplasma de CORPOICA, con el fin de extraer ADN de cada material genético y establecer un banco de ADN para posteriores estudios y mejoramiento genético.

4.2 Materiales y equipo

Para el establecimiento del banco de ADN se utilizaron los siguientes equipos y materiales: Termos para nitrógeno líquido, papel aluminio, marcador permanente, guantes de nitrilo, congelador, gabacha, cámara fotográfica, pinzas, papel de trazo, papel toalla, tubos falcom, equipo para liofilización, morteros, tubos de reacción, gradillas, Autoclave, horno microondas, Cabina extractora de gases, Baño María, destilador, Centrifuga de 14000 rpm,

balanzas, tijeras, papel cera, espátulas, Termo ciclador PTC-100, Agitador horizontal, Micro pipetas (1000, 200, 100, 20, 10, 2 ul), vortex, Puntas para micro pipeta Cámara electroforesis horizontal y vertical, Trans iluminador, computador, probeta, Nitrógeno liquido, hielo, Agarosa, azul de bromuro etileno, Tris base, EDTA, Acetato de potasio, Taq DNA polimerasa, DNTP'S, Cebadores o Primers CT, CCA, CGA, GT. Acido bórico, Isopropanol, Agua tipo HPLC, Bromuro de etidio, ADN de aguacate, NaCl y etanol, detergente en polvo, agua destilada, alcohol clínico al 75%, químicos para elaboración de geles de agarosa y poliacrilamida y otros reactivos descritos en el desarrollo de la metodología.

4.3 Colecta

Se tomaron de dos a tres hojas jóvenes de 29 plantas de la colección de aguacate comercial CORPOICA, Después de marcar en papel aluminio con la identificación de cada clon se procedió a envolverlas y guardarlas en un termo que contenía nitrógeno líquido para conservarlas, posteriormente en el laboratorio se almaceno el material en un congelador a -80°C hasta el momento de la liofilización.

Cada muestra fue identificada y enumerada (Anexo 1)

4.4 Liofilización

Las hojas jóvenes fueron fragmentadas manualmente en pedazos menores de 1 cm y fueron trasladadas en tubos de falcom previamente identificados, las muestras fueron congeladas a -20 °C durante 24 horas en los beakers especiales del equipo de liofilización, después de ser congeladas se liofilizaron a 0.12 m Bar de presión y temperatura del condensador interno del equipo de -50°C.

4.5 Preparación de reactivos

4.5.1 Preparación de reactivos para Buffer de extracción

Para iniciar el proceso de extracción antes se debe preparar los reactivos para el Buffer el cual necesita de tres reactivos madre como ser: Tris HCl 1M pH 8.0; EDTA 0.5M pH 8.0; NaCl 5M, los que se preparan utilizando la siguiente fórmula:

$$PM \times [] \times Vol. (Lts.) = gr.$$

Donde:

PM= Peso Molecular

[] = Concentración del reactivo

Vol. = Volumen a preparar

Tris HCL 1M a pH 8.0

$$121.14 \frac{gr.}{Mol} \times 1 \frac{Mol}{litro} \times 0.1lts. = 12.114gr.$$

Se agregan 70 ml de H₂O en un Beaker de 100 ml luego se agrega el tris y se lleva hasta 100 ml. El pH inicial es de 10.8 pero se llevó a 8.0 agregando ácido clorhídrico líquido.

EDTA 0.5M a pH de 8.0

$$372.24 \frac{gr.}{Mol} \times 0.5 \frac{Mol}{litro} \times 0.1lts. = 18.612gr.$$

El pH inicial es de 6.0 pero se lleva a 8.0 agregando hidróxido de sodio en perlitas y se completa el volumen a 100 ml con agua de tipo HPLC.

NaCl 5M

$$58.44 \frac{\text{gr.}}{\text{Mol}} \times 5 \frac{\text{Mol}}{\text{litro}} \times 0.1 \text{ lts.} = 29.22 \text{ gr.}$$

El volumen se lleva a 100 ml agregando H₂O tipo HPLC.

Luego se llevan las soluciones madre a la autoclave para esterilizar, este proceso dura aproximadamente 40 – 50 min.

Una vez que estén listas las soluciones madre se prepara el Buffer de extracción utilizando las cantidades que aparecen en la tabla 9.

Tabla 7. Reactivos para preparación de buffer.

Reactivo	Stock	50 ml	100 ml	250 ml
Tris HCl 100 mM	1M pH 8.0	5 ml	10 ml	25 ml
EDTA 50 mM pH 8.0	0.5 M pH 8.0	5 ml	10 ml	25 ml
NaCl 500 mM	5M	5 ml	10 ml	25 ml

Ajustar el volumen en cm con agua deionizada

Autoclave por 15 minutos

Adicionar 1% relación P/V PVP disolver agitando (0.5, 1, 2.5 gramos respectivamente)

Adicionar 2% V/V de betamercaptoetanol (1, 2 y 5 ml respectivamente)

No almacenar por más de un mes

4.5.2 Preparación de cebadores

10ul de cebador +90 ul de H₂O destilada y autoclavada.

4.5.3 Preparación de BSA

10 mg de BSA + 1 ml de H₂O destilada y autoclavada.

4.5.4 Preparación de DNTPs

12.5 ul de cada DNTP + 950 ul de H₂O destilada y autoclavada.

4.5.5 Preparación del azul de carga para 13 ml

60% de glicerol en agua destilada

10 mg de azul de bromofenil

60 ml de bromofenil * 13 ml / 100 ml = 7.8 ml de glicerol en agua.

4.6 Extracción de ADN

Se realizaron ensayos de extracción de ADN, basado en la metodología de ADN Genómico del cual no se obtuvieron buenos resultados por tanto se procedió la extracción con el protocolo de para plantas, con algunas modificaciones.

4.7 Tabla 8.Protocolo de Extracción de ADN (Dellaporta *et al* 1983)

Paso	Description
1	Preparar un baño María a 65 C y colocar el búfer de extracción
2	Marcar dos juegos de tubos de 1.5 ml
3	Macerar de 20 a 30 mg de tejido foliar liofilizado.
4	Adicionar 800 ml de buffer de extracción
5	Transferir la pasta a un tubo de 1.5 ml
6	Adicionar 55 ul de SDS 20 %
7	Mezclar bien usando vortex
8	Incubar a 65 C por 20 min. Invirtiendo periódicamente
9	Adicionar 250 ul de acetato de Potasio 5M frío y mezclar
10	Incubar en hielo durante 20 min. En el agitador
11	Centrifugar a 12000 RPM por 10 min.
12	Transferir 600 ul de sobrenadante a un tubo nuevo
13	Adicionar 640 ul de Isopropanol frío y mezclar 8 a 10 veces
14	Incubar a -20 C por 2 horas
15	Centrifugar a 12000 RPM por 10 min.
16	Remover el isopropanol y secar las gotas sobre una toalla
17	Re suspender en 80 ul de TE1X
18	Adicionar 1 ul de RNAsa hacer corto spin
19	Guardar las muestras a 4 C

4.7 Preparación del Gel de Agarosa.

Para preparar un Gel de Agarosa es necesario tener listos los siguientes materiales como ser: Agarosa, TBE 5X, TBE 0.5X.

Se prepararon 100 ml de agarosa en concentraciones del 0.8% por lo que se requirió 0.8 gr de agarosa. La elaboración del TBE 5X, a una concentración de 0.5X se realizó la siguiente fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Dónde:

C_i : Concentración Inicial

V_i : Volumen Inicial

C_f : Concentración Final

V_f : Volumen Final

$$5 \times V_i = 0.5 \times 100 \text{ ml}$$

$$V_i = (0.5 \times 100 \text{ ml}) / 5 = 10 \text{ ml}$$

Se utilizaron 90 ml de TBE 5X diluyéndolo en 90 ml de agua destilada para obtener un volumen final de 100 ml para llegar a una concentración de 0.5X.

Luego se diluyo la agarosa al 0.8% a la solución de TBE 0.5X, y la colocamos en el microonda por un tiempo aproximado de 3 minutos para disolver, debido a que la agarosa cuando se calienta se derrite y a temperatura ambiente se solidifica. Pasado el tiempo en la cámara extractora de gases agregamos 1 µl de bromuro de etidio (altamente toxico) y mezclamos bien. Posteriormente vaciamos el contenido en un molde de la cámara de electroforesis colocando los peines para la cantidad de muestras a montar, y se espera hasta que se solidifique. Una vez terminado este último paso se coloca el gel en la cámara de

electroforesis y agregamos la solución tampón de TBE 0.5X llenando la cámara hasta su nivel máximo.

Se montaron las muestras de ADN en cada uno de los pozos previamente a las muestras se azul de metilo con una relación 3:1 μ l para visualizar y se corrió por 40 minutos con un voltaje de 80 voltios y lo visualizamos en el transiluminador.

4.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la reacción en cadena de la polimerasa se toman en cuenta los factores como ser: número de muestras, tipo de cebador y algunos materiales a considerar.

Tabla 9. Orden de los reactivos con los respectivos valores de concentración final y las cantidades de micro litros a usar, los cálculos dependen de el numero (n) de muestras que se desea preparar en este caso para 17 muestras.

Reactivo	Volumen por muestra (ul)	[] Final
MgCl ₂	1.25	21.25
Buffer Taq	1.25	21.25
DNTP' s	2	34
Cebador (Primers)	1	17
H ₂ O (Mq)	3.9	66.3
BSA	1	17
Taq Polimerasa	0.1	1.7
ADN	2	17
TOTAL	12.5	212.5

MgCl₂: cofactor de la Taq Polimerasa.

Buffer Taq: mantiene el pH del coctel.

DNTP' s: dinucleotidostrifosfatados (A, G, C, T).

Cebador: iniciador de secuencia.

BSA: proteína extraída del suero bovino que ayuda a relajar el ADN inactivando los inhibidores de la Taq Polimerasa.

Taq Polimerasa: síntesis de ADN extendiendo la cadena 5' a 3'.

Cada uno de los reactivos sirven para que se lleve a cabo la PCR y estos deben estar en óptimas condiciones, el trabajo consistió. El número de muestras a preparar se multiplicó por la cantidad de micro litros (μl) a usar para cada reactivo. Una vez terminada la PCR que dura un tiempo aproximado de tres horas y treinta minutos, se observaron los resultados en geles de agarosa al 1.2%.

4.9 Cebadores RAM's

Se evaluaron cuatro cebadores RAM's a una misma temperatura de hibridación las cuales fueron las siguientes:

CCA.....55°C

CGA.....55°C

CT.....55°C

4.10 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Los productos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida, la preparación es un poco más larga que los geles de agarosa; la visualización de las bandas es de mejor calidad y de alta definición, la poliacrilamida está compuesta por acrilamida y bis acrilamida y se trabaja a una relación 37:1 con una concentración del 8% a 155 voltios por una hora 20 minutos, luego se tiñó con bromuro de etidio (3 μl) y se observó en el transiluminador. La preparación debe realizarse ordenadamente de la siguiente forma:

Tabla 10. .Reactivos y cantidades para realizar el gel de poliacrilamida.

Reactivo	Cantidad
TBE 5X	2 ml
Poliacrilamida	1.58 ml
Agua Destilada	6.32 ml
Per sulfato de Amonio	90 µl
Temed	20 µl

Per sulfato de amonio: agente polimerizante.

Temed: catalizador (acelera la reacción del per sulfato de amonio).

Para hacer los geles de poliacrilamida se requieren de dos piezas de vidrio una con superficie de bisel y la otra lisa y más pequeña, estas primeramente son lavadas y secadas para ser desinfectadas con alcohol al 70% y secadas para que el gel no se pegue a las paredes del vidrio. Se les añadió vaselina a los bordes del vidrio y un soporte de esponjado para evitar pérdidas de líquido, se superpusieron los vidrios uno sobre el otro, luego se le colocan los soportes a los vidrios para presionarlos.

Preparado el gel, se volcó dentro de los vidrios por medio de una micro pipeta, se le colocaron los peines después de haber extraído las burbujas que quedan dentro de los vidrios, se espera a que se solidifique por un tiempo promedio de 50 minutos, terminado el tiempo se quitaron los peines suavemente y los soportes, antes de montarlos a las cámaras de electroforesis se les agrega un poco de vaselina a cada lado de los soportes para que los vidrios no se peguen.

Una vez colocados los geles se agrega el TBE 5X de corrida entre los geles para ver si existe alguna fuga y se termina de llenar hasta el nivel máximo. Se debe evitar la formación de burbujas en la parte inferior de los vidrios para no crear el “efecto sonrisa”, luego se montaron las muestras que corresponde 5 µl de amplificado y 1µl de Azul de Metilo y se colocó en el primer pozo el marcador de peso (100 pb), se corrieron las muestras a 155 voltios por una hora con 10 minutos.

Terminado el tiempo de corrida de electroforesis se desmontaron los vidrios con una espátula especial y un poco de agua, sumergiéndolos en una solución de 100 ml de agua destilada con 3 µl de Bromuro de Etidio dejándolos en agitación por 10 minutos para que se pudiera tinter el gel de poliacrilamida y poder visualizarlo; se visualizan los geles en el trans iluminador y se lavan tres veces con agua destilada para quitar residuos de Bromuro y poder revelarlo.

Tabla 11. Preparación de geles de poliacrilamida

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN 8%
BE 5x (ml)	3.6
Poliacrilamida 37:1 (ml)	3.79
Per sulfato 10% (µl)	150
Temed (µl)	20
Agua (ml)	10.4
TOTAL (ml)	18.00

4.11. Tinción en plata de geles de poliacrilamida de 10 x 12 cm

1.-Fijación: Metanol 15 ml; Acido acético 3.6 ml; Formaldehido 37% 15 µl, completar con agua a un volumen de 30 ml, luego agitar por lo menos 1 hora.

2.-Lavado: Etanol 30 ml; agua 30 ml, hacer 3 lavados de 20 minutos cada uno.

3.-Pretratamiento: Tiosulfato de sodio (2 gr/Lit.) proteger de la luz, se agita por 1 minuto suavemente.

4.-Lavado: Se hacen 3 lavados con agua destilada por 20 segundos cada uno.

Impregnante: Nitrato de Plata 0.06 gr; Formaldehido 15 µl, completar con agua hasta 30 ml, dejar 20 minutos en agitación.

5.-Lavado: Dos lavados con agua 20 segundos cada uno.

6.-Revelado: Carbonato de Sodio 1.8 gr; Formaldehido 15 µl; Tiosulfato de sodio (2gr/Lit.) 600 µl, completar con agua hasta 30 ml, agitar hasta la aparición de las bandas, se agita por dos o tres minutos (se sugiere en hielo, porque la aparición de las bandas se demora).

7.-Lavado: Dos lavados con agua, uno rápido y otro por dos minutos.

8.-Fijador: Metanol 15 ml; Acido acético 3.6 ml, completar con agua a 30 ml, dejar por lo menos de 5-7 minutos.

9.-Preservar: Metanol 15 ml; agua 15 ml, si se desea secar los geles usar papel celofán.

Todo este proceso dura aproximadamente 2 horas con 45 minutos

Nota: En todos los casos utilizar agua destilada estéril.

4.12 Análisis de la información

Para el análisis de la información se desarrollaron las siguientes metodologías: Construcción de matriz de ceros (0) y unos (1) para la determinación del Coeficiente de Similitud. A través de esta matriz y utilizando los programas SIMQUAL del paquete NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System for Personal Computer) y el programa TFGA (Tools for Populations Genetic Analysis) se realizaron los análisis estadísticos. La similitud genética se calculó mediante el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) cuya fórmula es:

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Dónde:

S_{ij} = Similitud entre el individuo i y j.

a = Número de bandas presentes simultáneamente en los individuos i y j.

b = Número de bandas presentes en i y ausentes en j.

c = Número de bandas presentes en j y ausentes en i.

El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS-pc (Versión 2.02g, 1988) utilizando el método UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma se construyó con el programa TREE de NTSYS-pc (Versión 2.02g, 1988).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó mediante la metodología Dellaporta *et al* (1983) (con algunas modificaciones) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. De este protocolo se obtienen buenos resultados en comparación al de Aislamiento de ADN genómico del protocolo de fenoles, ya que esta al momento de hacer la corrida en geles de agarosa no se podía visualizar el ADN y por ende tampoco PCR.

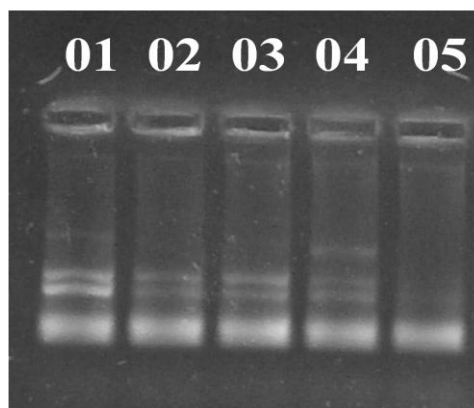


Figura 1. **Muestras de ADN corridas en gel de agarosa**

Se comenzó realizando una prueba de extracción con 5 muestras, las cuales presentaron buenas condiciones. Posteriormente se continuó con la extracción de las demás muestras colectadas.

5.2 Purificación de ADN

Dado que no se obtuvieron buenos resultados ya que las muestras probablemente estaban contaminadas; cada muestra fue purificada agregando 200 μ l de TBE 1X, agitadas por vortex durante 20 segundos, después se le agrego 400 μ l de Fenol cloroformo isoamilico frío a cada una y fueron mezcladas nuevamente por medio de vortex; las muestras se centrifugaron durante cinco min. a 13000 rpm.

Se capturo el sobrenadante y se le agrego isopropanol frío. Las muestras fueron incubadas a -20°C por 2 horas y posteriormente centrifugadas a 13500 rpm por 15 min. se elimino el isopropanol, las pastillas de ADN se dejaron secar a temperatura ambiente en la cámara de extracción de gases por más de 1 hora. Ya secas, a cada muestra se le agrego 80 μ l de TE procedente de un quit especial de reactivos para extracción de ADN.

5.3 Caracterización de los cebadores

Se utilizaron 3 cebadores CCA, CT y CGA los cuales dieron como resultado 59 bandas. El número de bandas para CCA fue de 22, para Ct 17 y para CGA 20

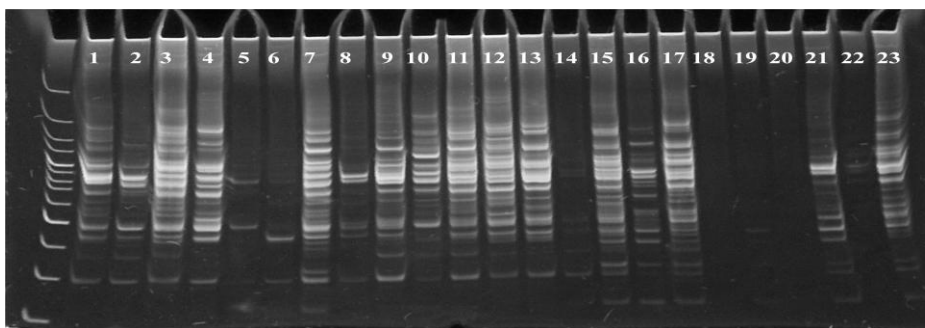


Figura 2. Muestras de ADN corridas en gel de poliacrilamida Cebador CT.

5.4 Análisis descriptivo

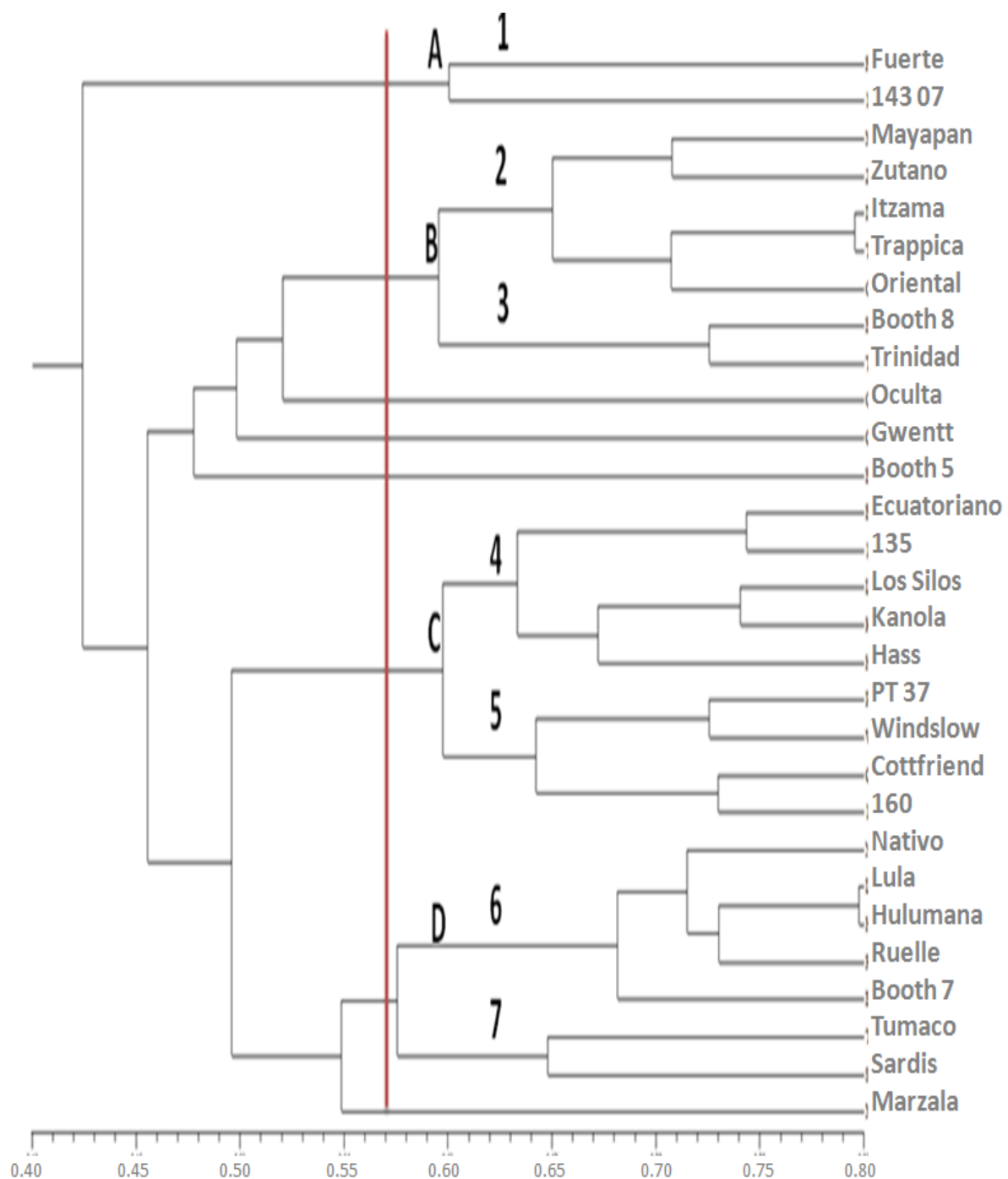
Para agrupar los materiales según la similaridad genética se elaboró un dendrograma con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA. Se formaron (A, B, C, D) y siete subgrupos. El primer grupo corresponde al grupo A este contiene las accesiones Fuerte y 143. El subgrupo 2 está integrado por las accesiones de los materiales pertenecientes a Mayapan, Zutano, Itzama, Trapica y Oriental, el subgrupo 3 con las accesiones de Booth 8 y Trinidad forman el grupo B. El grupo C está constituido por los subgrupos 4 con Ecuatoriano, 135, Los silos, Kanola y Hass; y el subgrupo 5 formado por PT-37, Winslow, Gottfrizd y 16-07. El subgrupo 6 formado por Nativo, Lula, Hulumana, Ruelle y Booth-7; y el subgrupo 7 constituido por Tumaco y Sardi; estos forman el grupo D.

Tabla 12 Descripción de grupos y subgrupos formados por el dendrograma.

Grupo	Sub-Grupos	Accesiones	Razas
A	1	Fuerte, 143-77	Guatemalteco * Mexicano
B	2	Mayapan, Zutano. Itzama, Trapica	Guatemalteco, Guatemalteco* Mexicano
	3	Booth-8, Trinidad	Guatemalteco * Mexicano, Guatemalteco * Antillano
C	4	Ecuatoriano, 135-20. Los Silos, Kanola, y Hass	Antillano, Guatemalteco
	5	PT-37, Winslow. Gottfrizd y 16-07	Guatemalteco * Antillano, Mexicano
D	6	Nativo. Lula, Hulumana. Ruelle, Booth-7.	Antillano, Guatemalteco * Antillano.
	7	Tumaco y Zardy.	Antillano

Las accesiones Oculta, Gewent y Booth-5 no formaron parte de un subgrupo en específico, pero se encuentran muy cerca de las accesiones del grupo A, así también Marzala no forma parte de un grupo en específico pero están relacionadas con el grupo D.

Figura 3. Dendrograma de distancia genética de 29 accesiones de aguacate comercial, basado en el coeficiente de similitud de Nei-li (1978). Resultado del análisis de 3 cebadores (CA, CGA, CT).



5.5 Heterocigosidad esperada (He) y porcentaje de loci polimórfico

Los cebadores utilizados para esta investigación fueron altamente polimórficos con valores de 95% a 100%. Presentando a la vez una He incesgada mínima de 0.3375 y una máxima de 35.59

Tabla 13. Valores de heterosigosidad y porcentaje de loci polimórficos.

Cebadores	HE	Polimorfismo (%)
CT	0,3375	96.61
CCA	0,3559	95.00
CGA	0,3559	95.00
TOTAL	0,3440	96,6102

Los valores de heterocigosidad esperada (He) calculados mediante el programa TFPGA considerando todas las accesiones del banco como un solo grupo y para cada uno de los cebadores mostraron que el valor más altos fue para los cebadores CCA y CGA (0,3559) y el más bajo para el cebador CT (0,3375). El valor de porcentaje de loci polimórfico más alto se encontró con el cebador CT (96.61%) y los más bajos pertenecen a los cebadores CCA y CGA (95.00%)

Los valores altos de polimorfismo y de He encontrados con los cebadores permiten concluir que estos fueron los que más aportan a la diversidad y resultan apropiados para su utilización en futuras investigaciones sobre la evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional de accesiones de *Persea americana* Hill.Sin. De manera general hubo correlación entre He y polimorfismo en los cebadores evaluados.

La He se interpreta como la probabilidad de coleccionar dos genes diferentes en un muestreo con reemplazos del total de genes en una población. También se le denomina como diversidad genética, aunque esta denominación no es aconsejable ya que puede confundirse con variación genética “en general” y no solo al valor de He

Tabla 16. Distancias Genéticas insesgada, entre las accesiones de Aguacate Comercial, según NeiSunbiased (1978).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	*****													
2	0,2933	*****												
3	0,5512	0,4140	*****											
4	0,4940	0,4666	0,2709	*****										
5	0,4140	0,6118	0,2933	0,2933	*****									
6	0,5512	0,5222	0,3163	0,2709	0,4940	*****								
7	0,7102	0,5512	0,4400	0,3399	0,5222	0,2063	*****							
8	0,7102	0,6118	0,4940	0,3887	0,5222	0,2933	0,3163	*****						
9	0,7453	0,5810	0,5810	0,5222	0,6763	0,4140	0,3887	0,3887	*****					
10	0,5810	0,6118	0,4940	0,5512	0,4140	0,6763	0,5810	0,7102	0,4400	*****				
11	0,6118	0,5222	0,5810	0,4140	0,4940	0,5222	0,3887	0,4400	0,2709	0,3887	*****			
12	0,4140	0,6118	0,6118	0,4400	0,5810	0,5512	0,5222	0,5222	0,4940	0,4666	0,4400	*****		
13	0,4400	0,5810	0,7102	0,6436	0,4400	0,7102	0,6763	0,6763	0,4140	0,4400	0,4140	0,5512	*****	
14	0,4940	0,7102	0,5810	0,7102	0,5512	0,7102	0,7453	0,6763	0,5222	0,4940	0,6436	0,5512	0,3640	*****
15	0,4140	0,4400	0,6118	0,6763	0,7102	0,5512	0,4666	0,5222	0,4400	0,6436	0,5512	0,4140	0,3887	0,4400
16	0,4940	0,6436	0,8587	0,8587	0,6118	0,7102	0,6763	0,6763	0,6436	0,6118	0,5810	0,4940	0,3640	0,4666
17	0,6118	0,7102	0,7102	0,7102	0,6118	0,7817	0,6763	0,6118	0,5222	0,6118	0,5222	0,6118	0,2274	0,3163
18	0,6763	0,7817	0,5810	0,7817	0,5512	0,4666	0,4940	0,4400	0,5222	0,6763	0,5222	0,6118	0,3640	0,3640
19	0,4666	0,6118	0,4940	0,7453	0,5222	0,6118	0,6436	0,6436	0,4400	0,5222	0,6118	0,7102	0,2489	0,1655
20	0,4666	0,4940	0,4940	0,6763	0,4666	0,6118	0,5810	0,5810	0,5512	0,5222	0,5512	0,5810	0,3399	0,2063
21	0,5222	0,4940	0,4400	0,7453	0,5810	0,5512	0,5810	0,5810	0,6118	0,5810	0,7453	0,6436	0,3399	0,4400
22	0,8194	0,6436	0,7102	0,6436	0,8194	0,5810	0,5512	0,4400	0,5810	0,7453	0,4666	0,6118	0,5222	0,5810
23	0,4140	0,4940	0,5512	0,6763	0,4666	0,6118	0,7102	0,5222	0,6763	0,6436	0,6763	0,7102	0,4940	0,4400
24	0,6763	0,7102	0,5810	0,7102	0,5512	0,5222	0,7453	0,4400	0,6436	0,6763	0,6436	0,6763	0,4666	0,522
25	0,6118	0,6436	0,5810	0,7102	0,6118	0,5222	0,6763	0,3399	0,6436	0,6763	0,6436	0,6118	0,5810	0,5222
26	0,7102	0,7453	0,6763	0,6763	0,5810	0,7453	0,7817	0,4140	0,7453	0,7102	0,7453	0,6436	0,8194	0,6118
27	0,5222	0,4400	0,5512	0,7453	0,5222	0,8194	0,7817	0,7102	0,8995	0,6436	0,7453	0,8587	0,6763	0,6118
28	0,3887	0,5222	0,5222	0,7102	0,5512	0,4666	0,6763	0,4940	0,7102	0,6118	0,6436	0,6118	0,4666	0,4140
29	0,5810	0,4940	0,8194	0,9865	0,8587	0,8995	0,8587	0,7817	0,8194	0,7817	0,8194	0,7102	0,6118	0,4940

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29

0,2489	*****													
0,2933	0,3163	*****												
0,3887	0,4666	0,3163	*****											
0,4140	0,4400	0,2933	0,2933	*****										
0,3640	0,4940	0,3399	0,2063	0,2274	*****									
0,4140	0,4940	0,3399	0,3887	0,3640	0,2709	*****								
0,6118	0,5222	0,4666	0,5222	0,7453	0,5512	0,3887	*****							
0,5810	0,4940	0,5512	0,5512	0,4666	0,5222	0,5222	0,4400	*****						
0,6763	0,5222	0,5222	0,5222	0,4940	0,5512	0,4400	0,3163	0,2489	*****					
0,6763	0,5222	0,7102	0,5222	0,5512	0,4940	0,4400	0,3163	0,2933	0,1857	*****				
0,6436	0,5512	0,6118	0,6118	0,7102	0,5810	0,5810	0,3887	0,4666	0,3399	0,2489	*****			
0,6436	0,6118	0,7453	0,7453	0,6436	0,5810	0,5810	0,7453	0,2709	0,4940	0,6118	0,5810	*****		
0,6118	0,4666	0,5810	0,4666	0,4940	0,4940	0,3887	0,4140	0,2489	0,2709	0,2274	0,3887	0,3887	*****	
0,5810	0,6118	0,6118	0,6118	0,5810	0,4140	0,4140	0,3399	0,4666	0,5512	0,4940	0,6436	0,4666	0,5512	*****

VI. CONCLUSIONES

Se conoció la diversidad genética de 29 accesiones de la colección nacional de aguacate comercial de la Corporación Colombiana de Investigación Agrícola (CORPOICA), Palmira.

Se estandarizaron tres cebadores RAMs polimórficos para la especie (CCA, CGA, CT); obteniéndose 59 bandas polimórficos, analizados en el programa estadístico NTSYs dando como resultado un porcentaje de loci polimórfico de 96,6102 y de H_e 0,3440; lo que indica una alta diversidad genética entre las accesiones de aguacate comercial.

El análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li para todas las accesiones de la colección mostró que existe una tendencia a formarse grupos genéticos de acuerdo a las variedades (Antillano, Guatemalteco, Antillano y sus interacciones)

El análisis mediante marcadores moleculares RAMs permitió detectar la variabilidad genética de las accesiones de la colección nacional de aguacate comercial establecida por el CORPOICA y mostró un alto grado de polimorfismo y sensibilidad para su discriminación. Por lo anterior esta técnica puede ser considerada como una herramienta útil para evaluar la diversidad genética de colecciones, bancos de germoplasma y poblaciones naturales.

Las muestras de ADN permitirán realizar **estudios genéticos** encaminados a identificar factores de riesgo responsables de enfermedades y posibles marcadores de cambio por adaptación a otros ambientes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alves-de Oliveira¹, A; Koller¹, O; Villegas-Monter, A. 1999. Propagación vegetativa por acodo en contenedor de aguacate (*persea p.*). Revista Chapingo Serie Horticultura. Facultad de Agronomía da Universidad Federal de Río Grande do Sul. Porto. 221-225 p.

ANACAFE (Asociación Nacional del Café). 2004. Cultivo de aguacate (*Persea americana mill*). (En línea). Consultado 23 oct. 2011. Disponible en <http://portal.anacafe.org/Portal>

Dellaporta, SJ; Wood, J; Hicks, JB. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. Plant Mol Biol. Rep. 1:19-21pp.

Lavaire, E. L. 2009. Establecimiento de un banco de ADN de la colección nacional de aguacate de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Agricultura, Honduras. 55 p

Villanueva, M; Vertí, S. 2007. El Aguacate: Oro Verde De México, Orgullo De Michoacán. Congreso Mundial del Aguacate (VI, 2007, Viña Del Mar, Republica de Chile.) Michoacán. Casa de Gobierno, Periférico Paseo de la Republica # 1500, Col. General Oviedo Mota, Morelia, México.

Olaeta, A. J. 2003. Industrialización Del Aguacate: Estado Actual Y Perspectivas Futuras, Congreso mundial del Aguacate V, República de Chile; Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Valparaíso-Chile 2950Av. Brasil.749-754 p.

Ríos Castaño, D; Tafur Reyes, R. 2003. Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia; V Congreso Mundial del Aguacate. Profrutales Ltda., Km. 14 vía Cali Candelaria, Valle Colombia. 143-147. p.

Herrera, R. Francisco. 2009. El cultivo del aguacate (Palta), razas y variedades. Colombia consultado el 4 de nov. 2011. En línea; disponible en:<http://www.engormix.com/MA-agricultura/cultivos-tropicales/articulos/cultivo-aguacate-palta-razas-t2267/078-p0.htm>.

Olaeta, J. A. 2003. Industrialización Del Aguacate: Estado Actual y Perspectivas Futuras. Facultad de Agronomía Pontificia. Universidad Católica de Valparaíso-Chile, Av. Brasil. 749 p.

Muñoz, F. J; Morillo Ana, C; Morillo Yacenia C., 2008. Micro satelites amplificados al azar RAM en estudios de diversidad genética vegetal. Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia AA237. Palmira, Valle del Cauca. 219-226 p.

Demey, J. R. 2008. Diversidad Genética En Bancos De Germoplasma: Un Enfoque Biplot. Tesis Doctoral. Universidad Departamento De Estadística. Salamanca, España.

Alegría Iriondo, J. M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, 28-40 p.

Lemus, S. Gamalier; Ferreyra, E.; Raúl, Gil M.; Maldonado Pilar, B.; Toledo G. Patricio; Barrera M. Carlos; Celedón de A. Cristián; J.M. 2005. El Cultivo del Palto. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 129. La Cruz, Chile, 76 p.

Levitus, G.; Rubinstein, E. C.; Hopp, E.; Mroginski, L. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. II Edición, Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. Argenbio Consejo Argentino Para La Información y El Desarrollo De La Biotecnología. En línea. Consultado 15 de oct. De 2011 Disponible en http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Indice_e_introduccion.pdf

Ortega, M. Ángel. 2002. nutrimental de la pulpa fresca de aguacate Hass. V Congreso Mundial del Aguacate. Secretaría de Desarrollo Agropecuario. Michoacán. Consultado el 7 nov. De 2011, en línea disponible en: http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p741.pdf VALOR

Nuez Martín, A.; Carrillo, J. M F.; Lozano, R. 2002. Los marcadores genéticos en la Mejora Vegetal. En: Genómica y Mejora Vegetal. Sevilla, España. 37-64 p.

Castro, Mónica, V; 2004 Propagación de plantas de aguacate. Tercer congreso nacional de la palta. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Casilla 4-D Quillota... 2-39 P En línea. Consultado el 10 de nov. Disponible en <http://portal.anacafe.org/Portal/Documents/Documents/200412/33/5/Cultivo%20de%20Aguacate.pdf>

Ordúz, R., J. O.; Rangel M., J. A. 2002, Frutales tropicales potenciales para el piedemonte llanero, Manual de Asistencia Técnica No. 8, Villavicencio, Meta, Colombia CORPOICA - PRONATTA.

Perfil Económico del Aguacate 2011.- Gerencia de Investigación de Mercados Dominicana Exporta centro de investigación y exportación Republica Dominicana. Consultado el 10 de oct. De 2011. En línea. Disponible en http://www.ceird.gov.do/estudios_economicos/estudios_productos/perfiles/aguacate.pdf

Piñero, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México. 438 p.

Posso, A. 2010. Diversidad genética de accesiones de nacedero *Trichanthera gigantea* (Humb & Bonpl.) Nees mediante RAMs (Random Amplified Microsatellites). Tesis Biología. Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia. 92 p.

Sanabria, H., García, M., Díaz, H., Muñoz, J.E. 2006. Caracterización molecular con marcadores RAMs de árboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca. Acta Agronómica 55 (1): 23-30.

Villardón, Vicente J. L. Introducción al análisis de cluster Departamento de Estadística Universidad de Salamanca, España. En Línea. Consultado el 16 Nov de 2011. Disponible en <http://biplot.usal.es/ALUMNOS/CIENCIAS/2ESTADISTICA/MULTIVAR/cluster.pdf>

Anacafe Asociación Nacional del Café, ANACAFE. 2004, Cultivo de aguacate. Programa de diversificación de ingresos en la Empresa cafetalera, En línea. consultada el 7 de nov. 2011. Disponible en <http://portal.anacafe.org/Portal/Documents/Documents/2004-12/33/5/Cultivo%20de%20Aguacate.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de identificación de accesiones.

No.	Nombre Com	IPAL	ABREVIACION	RAZAS
1	FUERTE	0303	FUE	G * M
2	143-77	0338	143	G * M
3	MAYAPAN	0335	MAY	G.
4	ZUTANO	0325	ZUT	G * M
5	GWENT	0290	GWE	G * M
6	ITZAMA	0286	ITZ	G.
7	TRAPP	0295	TRA	A.
8	ORIENTE	0300	ORI	A
9	BOOTH-8	0306	BO8	G. * A.
10	BOOTH-5	0316	BO5	G. * A.
11	TRINIDAD	0304	TRI	G. * A.
12	OCULTA	0327	OCU	A.

13	PT-37	0338	PT3	A
14	ECUATORIANO	0342	ECU	
15	GOTTFRIZD	0281	GOT	M.
16	16-07	0611	160	M.
17	WINSLOW	0282	WIN	G. * A.
18	LOS SILOS	0298	LOS	A.
19	135-20	0287	135	G. * M
20	KANOLA	0289	KAN	G.
21	HASS	0321	HAS	G.
22	NATIVO2011	0329	NAT	A.
23	TUMACO	0313	TUM	A.
24	LULA	0307	LUL	G. * A.
25	HULUMANA	0280	HUL	A.
26	RUELHE	0309	RUE	A.
27	SARDI	0340	SAD	G*A
28	BOOTH-7	0305	BO7	G. *A.
29	MARZALA	0312	MAR	A.

Anexo 2. Aislamiento de ADN genómico

Con este método se obtienen de 50 a 100 ug de ADN por cada 100 mg de tejido liofilizado y molido. Si se requiere una mayor cantidad de tejido (hasta 1.0 g), escale directamente las cantidades dadas a continuación.

1. Coloque 50 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 1,5 o 2 ml.
2. Agregue 800 ul de solución amortiguadora CTAB. Mezcle por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
3. Incube y mueva los tubos con suavidad en un agitador de balance en un baño a 65° C durante 90 min.

4. Retire los tubos los tubos del horno y deje enfriar durante 5 a 10 min.
5. Agregue 500 ul de FCI (Fenol cloroformoisoamilico25:24:1) agite los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugue a 13500 rpm a temperatura ambiente durante 5 min. para formar la parte acuosa (liquido claro de color amarillo) y la fase orgánica (de color verde oscuro)
7. Recupere aproximadamente 750 ul de la fase superior acuosa y vacíela en un tubo nuevo de 1.5 o 2.0 ml.
8. Agregar 500 ul CI (Cloroformo isoamilico 24:1) agitar 5 min. Centrifugar 5 min a 13500 rpm. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
9. Agregue ½ volumen de isopropanol (2-propanol) al 100% previamente enfriado en un refrigerados a -20 °C. Mezcle por inversión para favorecer la precipitación de ADN. Incube las muestras toda la noche a -20°C.
10. Centrifugue a 13500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. para precipitar y formar la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Deseche el isopropanol por decantación.
11. Agregue 1 ml de alcohol al 75% lave suavemente la pastilla de ADN. Centrifugue a 13500 por 1 min. Deseche el alcohol por decantación. Deje q se evapore a temperatura ambiente hasta que la pastilla seque. Si todavía siente olor a alcohol, esto indica que la pastilla no está completamente seca.
12. Vuelva a suspender la pastilla en 100 ul de TE o agua doble destilada. Guarde las muestras a 4°C hasta utilizarlas; si no va utilizarlas mucho tiempo, almacénelas a -20°C.

Solución amortiguadora con CTAB para extracción1

		1 RXN	5 RXN	10 RXN	20 RXN	50 RXN	60 RXN
Sol. Concen.		10 ml	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml	600 ml
[final]							
D H2O		6.5 ml	32.5 ml	65.0 ml	130.0 ml	325.0 ml	390.0 ml
1 M Tris-7.5	100 mM	1.0 ml	5.0 mL	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
5 MNaCl	700 mM	1.4 ml	7.0 ml	14.0 ml	28.0 ml	70.0 ml	84.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml

CTAB2	1 %	0.1 g	0.5 g	1.0 g	2.0 g	5.0 g	6.0 g
14 M BME3	140 mM	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml	5.0 ml	6.0 ml

1 Utilice la solución recién hecha; calentar a 60-65°C antes de agregar CTAB y BME.

2 CTAB = bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio (Sigma M-7635).

3 Agregar BME (mercaptoetanol) bajo una campana extractora, justo antes de usarse

