

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE
AGUACATE (*Persea americana Mill*) DE LA CORPORACIÓN COLOMBIANA DE
INVESTIGACIONES (CORPOICA) UTILIZANDO MARCADORES RAMs, FASE
III.**

POR:

MARIO MODESTO SANTOS SÁNCHEZ

**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

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE
AGUACATE (*Persea americana Mill*) DE LA CORPORACIÓN COLOMBIANA DE
INVESTIGACIONES (CORPOICA) UTILIZANDO MARCADORES RAMs, FASE III.

POR:

MARIO MODESTO SANTOS SÁNCHEZ

HILSY LOURDES SANABRIA, M.Sc.

Asesor Principal

JAIME EDUARDO MUÑOZ F.

ANDRES MAURISIO POSSO T.

Asesores (Colombia)

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

DEDICATORIA

A **DIOS** por darme esta oportunidad en mi vida y enseñarme cosas que desconocía, por darme fuerza, perseverancia para luchar por lo que quiero y conseguirlo.

A mis padres **CRISTINA SÁNCHEZ** y **CARLOS SANTOS** por su apoyo incondicional y hacer de mí una mejor persona aunque a veces no les demuestre mi cariño.

A mis hermanas **MARCELA SANTOS** y **KARLA SANTOS** por compartir buenos momentos.

A mi **FAMILIA** por todo lo que he compartido con cada uno de ellos y contribuyeron a lograr mis metas y las suyas.

A la **FAMILIA DIAZ SANABRIA** por abrirme las puertas de su casa, especialmente las de su corazón, darme sabios consejos y haberme adoptado como a un hijo más.

A mi novia **ADRIANA DIAZ** por compartir conmigo, tener que soportarme y principalmente enseñarme a valorar lo que tengo.

A mis abuelos **RAMON SANTOS (Q.D.D.G)**, **ESTHER SÁNCHEZ (Q.D.D.G)**, y mi tío **ANGEL SANTOS (Q.D.D.G)**, personas que extraño y respeto mucho que me mostraron el camino que debía seguir además de compartir lindos momentos.

AGRADECIMIENTO

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA** por su formación académica como personal y darme la oportunidad de estudiar en la mejor institución agrícola del país.

A mis asesores en Colombia **Ph.D JAIME EDUARDO MUÑOZ**, el **M.Sc. ANDRES POSSO** por su colaboración como también enseñarme el mundo de la Biología Molecular y a la **Ph.D YACENIA MORILLO** por su ayuda en el laboratorio y sus consejos acertados.

A mis asesores **M.Sc. HILSY SANABRIA**, **M.Sc. HECTOR DIAZ** y **M.Sc. JOSE T. REYES** por contar con su apoyo para la realización de este trabajo.

A la **FAMILIA DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR** por las vivencias compartidas y la experiencia adquirida en tan poco tiempo.

A mis amigos **JIMMY BRUHL**, **GESLER ANTUNEZ**, **LUIS AGUILAR**, **MARVIN VELLECILLO** y **DENNIS MONTIEL** por compartir muchos tiempos juntos y estar en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de habitación **PEDRO SANTOS**, **AXEL GONZALES**, **RAMON AVILA**, **TEDDY GARCIA** y **MEDARDO BAUTISTA** por los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis amigos **MANUEL AMADOR**, **EDWIN MORENO**, **WILDER MARTINEZ**, **SAMAEL RODRIGUEZ**, **MARLON RODRIGUEZ**, **SELVIN SARAVIA**, **MELVIN**

SOTO, BAIRON SARMIENTO, EDRAS VASQUEZ, JORGE VELASQUEZ, GERMAN LANDA, EDUARDO PINTO, CECILIA PINEDA, ITZEL PINEDA, ARIEL RAMOS y DARCY MARTINEZ por el tiempo compartido con cada uno de ustedes y las vivencias inolvidables.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN.....	1
II OBJETIVOS	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos.....	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Origen del cultivo de aguacate.....	4
3.2 Clasificación botánica del aguacate	4
3.3 Morfología del aguacate	5
3.4 Valor nutricional	5
3.5 Importancia económica.....	6
3.6 Banco de germoplasma.....	8
3.7 Marcadores moleculares	9
3.8.1 Tipos de marcadores moleculares	9
3.9 Reacción de la cadena polimerasa (PCR)	15
IV MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Localización.....	17
4.2 Materiales y equipo.....	18
4.3 Colecta	18
4.4 Liofilización del material vegetal	18
4.5 Preparación de reactivos para Buffer de extracción	19
4.6 Extracción de ADN.....	20
4.7 Preparación del Gel de Agarosa.....	22

4.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa	23
4.8.1 Cebadores RAM's.....	25
4.8.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	25
4.9 Análisis de la Información	27
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1 Extracción de ADN.....	28
5.2 Estandarización de la condiciones para PCR.....	29
5.2.1 Lavado del ADN	29
5.2.2 Técnica del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	30
5.3 Características de los cebadores	31
5.4 Análisis Descriptivo.....	32
5.5 Heterocigosidad esperada (He) y % de loci polimórfico	36
5.6 Diferenciación de accesiones	36
5.7 Distancia genética	37
VI CONCLUSIONES.....	41
VII RECOMENDACIONES	42
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	43
IX Anexos	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Corrida de cinco accesiones de ADN con PCR en geles de agarosa.	28
Figura 2. Muestras de ADN corridas con PCR.	29
Figura 3. Muestras de ADN de la 1-23 amplificados con PCR.....	31
Figura 4. Dendrograma de distancia genética.	35
Figura 5. Dendrograma de distancia genética	39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Aportes nutritivos del aguacate al consumidor.....	6
Tabla 2. Preparación del Buffer de extracción.	20
Tabla 3. Orden de los reactivos con los respectivos.	24
Tabla 4. Reactivos y cantidades para realizar el gel de poliacrilamida.	25
Tabla 5. Protocolo de la PCR.	30
Tabla 6. Cantidad de bandas totales y polimórficas obtenida con los cebadores RAMs. ...	31
Tabla 7. Descripción de los grupos y subgrupos originados por el dendrograma.	33
Tabla 8. Porcentaje de Heterocigosidad y loci polimórfico.	36
Tabla 9. Clasificación de la diferenciación genética.	37
Tabla 10. Identidad y distancia de genética.	38
Tabla 11. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma	40

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Clasificación de los materiales de aguacate	47

Santos Sánchez, M.M. 2011. Caracterización molecular de la colección nacional de aguacate (*Persea americana* Mill) de la Corporación Colombiana de Investigaciones (CORPOICA) utilizando marcadores RAMs, Fase III. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras. 66 pág.

RESUMEN

El aguacate es un fruto importante de la dieta alimenticia especialmente de los países Latinoamericanos, Europeos y Norteamericano, por sus características nutricionales se ha convertido en un frutal de amplio mercado y muy cotizado por lo que sus exportaciones se convierte en una entrada económica sostenible lo que hace que existan mayores empleos y nuevas rutas de mercado. Por tanto CORPOICA ha establecido un banco de germoplasma con árboles de aguacates provenientes de todo el territorio colombiano. El presente trabajo consistió en caracterizar molecularmente 78 accesiones pertenecientes a este banco de ADN de aguacate de la colección nacional de CORPOICA, Colombia con el propósito de proporcionar información a fitomejoradores para futuras investigaciones. Se inició con la evaluación del banco establecido en 2009 el cual fue caracterizado el siguiente año, ahora se vuelven a tomar otras accesiones que no fueron caracterizadas por lo que inicio con la colecta de 78 accesiones. Utilizó el protocolo de extracción de ADN Dellaporta con algunas modificaciones y por medio de electroforesis de geles de agarosa al 8% se visualizó el ADN. Se realizó PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando marcadores moleculares RAMs que consiste en la amplificación del ADN por medio de cebadores que actúan como iniciadores arbitrarios permitiendo seleccionar regiones concretas dentro de ésta, para los cebadores utilizados se realizó una programación estándar de temperaturas indicadas según informes reportados en otras investigaciones para que se realice la amplificación. La preparación del coctel de PCR se realizó en una cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia. Con esta técnica de logro separar los productos amplificados utilizando geles de agarosa al 1.2% y visualizar en un transluminador con luz ultravioleta, al mismo tiempo se utilizaron geles de poliacrilamida para obtener una alta resolución y mejor separación de los fragmentos, obteniendo mayor números de banda por marcador. Las primeras amplificaciones mostraron que no todos los materiales amplificaban por lo que se realizó un lavado de ADN para que estos amplificaran en los geles. Se utilizaron cuatro cebadores RAMs en 78 accesiones de aguacate obteniéndose 76 bandas de 120 a 1200 pb usadas en programas para análisis de datos moleculares y estimación de los parámetros de diversidad genética. Los resultados indicaron que la colección nacional de aguacate presenta heterocigosidad en sus accesiones y se encontró una alta diferenciación genética entre los grupos formados mediante el análisis molecular.

Palabras Claves: Accesoión, RAMs, Germoplasma, CORPOICA.

INTRODUCCIÓN

Teliz (2000), citado por Vásquez el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) fue descubierto partiendo de pruebas arqueológicas encontradas en Tehuacán en el Estado de Puebla, con una antigüedad aproximada de 10,000 años, se ha comprobado que el árbol de aguacate se procede de México, Centro América hasta Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú.

El nombre aguacate, con el que se le conoce en muchos países de habla hispana, proviene del término “ahuacatl”, en lengua Maya significa testículos. El cultivo fue expandiéndose hacia Centro y Sur América y muy posteriormente a la colonización, llegó a otros lugares fuera del continente americano. Los españoles lo llevaron a Europa en el siglo XVI, junto con otros alimentos nuevos descubiertos en las primeras expediciones a América, como son la papa, el maíz, algunas frutas tropicales y el chocolate. Hoy en día es una de las frutas tropicales más populares en el mundo entero por su alto valor nutritivo, sabor agradable, versatilidad y fácil preparación (Vásquez 2004).

El aguacate mejorado ha ido tomando mucho auge en los últimos años debido a la apertura de mercados Europeos Asiáticos y de Oceanía siendo México el líder mundial en producción. Algunos países de Centro América y Sur América se continúan cultivando árboles nativos en un alto porcentaje (Vásquez 2004).

En todas las áreas donde crece el aguacate, las frutas están totalmente incorporadas a la dieta diaria de los habitantes, especialmente a la de los campesinos, quienes han sido un medio eficaz en la propagación continua el cultivo (Vásquez 2004).

En este trabajo se realizó el estudio de 78 accesiones del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigaciones (CORPOICA) para estimar la diversidad genética que posee, tomando en cuenta el lugar y las coordenadas de origen. Para poder llevar a cabo este estudio se utilizaron marcadores RAMs (Random Amplified Microsatellites) con el propósito de brindar información para futuras investigaciones y programas de mejoramiento genético.

II OBJETIVOS

2.1 General.

Caracterizar molecularmente 78 accesiones de aguacate utilizando marcadores RAMs, para completar el banco de ADN establecido en 2009 y 2010 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

2.2 Específicos.

Colectar 78 accesiones más de material vegetativo de aguacate para la extracción y adhesión al Banco de ADN establecido en 2009 y 2010.

Evaluar la metodología para la extracción de ADN Dellaporta *et al* (1983), y la de Aislamiento de ADN Genómico.

Estandarizar cebadores RAMs en las especies colectadas.

Comparar los resultados estadísticos de la Fase II y la fase III para la determinación del agrupamiento de las especies.

III REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Origen del cultivo de aguacate

El aguacate es un frutal originario de México y Centro América. La especie comprende tres grupos o razas ecológicamente definidas: raza mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), raza guatemalteca (*Persea nubigena* var. *guatemalis*) y raza antillana (*Persea americana* var. *Americana*) (PROMOSTA *et al* 2005).

Las dos primeras son originarias de los altiplanos guatemaltecos y mexicano, y la última de las tierras bajas de Centro América. Existen además híbridos antillo guatemaltecos y guatemalteco mexicanos que han dado origen a variedades y cultivares adaptados a diferentes alturas y microclimas que han hecho posible la producción de fruta durante todo el año (PROMOSTA *et al* 2005).

3.2 Clasificación botánica del aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill) pertenece a la clase de las dicotiledóneas, subclase de las dialipétalas, orden de las ranales, familia de las Lauráceas, la cual comprende alrededor de 45 géneros y más de 1,000 especies. Del género *Persea*, se conocen 50 especies que tienen similitudes con el aguacate y se caracterizan porque casi todas estas especies tienen origen americano (Vásquez *s.f*). El aguacatero cultivado, Fersini (1978), citado por Vásquez *s.f*, puede subdividirse en dos especies de importancia económica, siendo éstas la *Persea americana* Miller, la cual comprende los grupos ecológicos guatemalteco y antillano y el *Persea drymifolia* Schlecht y Chan que comprende el grupo ecológico mexicano.

3.3 Morfología del aguacate

El árbol de aguacate posee un crecimiento y desarrollo variado, en su hábitat natural pueden existir hasta de 20 o 25 metros de altura. Su tallo es leñoso, posee un gran crecimiento vegetativo y en árboles de 50 años de edad se han encontrado diámetros de hasta 1.5 metros. Es una especie perenne de tallo aéreo, con características leñosas y follaje siempre verde, su raíz es bastante superficial. La madera es un tanto vidriada, es decir se parte fácilmente (Vásquez s.f).

Las hojas son simples y enteras. De forma elípticamente alargada y nervadura pinnada. La inserción en el tallo es peciolada. Cuando es joven presenta un color rojizo y una epidermis pubescente; al llegar a la madurez estas hojas se tornan lisas, coriáceas y de un verde intenso y oscuro. Las ramas son abundantes, generalmente delgadas y frágiles, esto hace que se rompan fácilmente con la carga de fruta o por la acción del viento y tormentas.

Las raíces son superficiales dependiendo de la variedad, suelo y otras condiciones de producción. Se caracterizan por tener muy pocos pelos radicales y la absorción de agua y nutrientes se realiza principalmente en las puntas de las raíces a través de los tejidos primarios, esto determina la susceptibilidad que posee el árbol al exceso de humedad que induce a las asfixias y ataques de hongos que pudren los tejidos (Vásquez s.f).

3.4 Valor nutricional

El fruto del aguacate es libre de colesterol y de sodio, con bajos niveles de grasas saturadas con solo 5.0 gramos por porción, aceptable para cualquier dieta baja en grasa. Como hecho importante, la mayoría de las grasas encontradas en el aguacate, son monosaturadas, lo cual significa que son benéficas, porque participan en la eliminación del colesterol y los triglicéridos contribuyendo a prevenir enfermedades cardiovasculares por proteger el corazón ante cualquier enfermedad y en algunos casos de cáncer por tener la propiedad de equilibrar los niveles de azúcar en la sangre (SEA *et al* 2007).

Es la fruta que más fibra dietética contiene. Igualmente tiene 60% más de potasio que un plátano mediano, aporta vitaminas A, para la vista y E, para la piel, protege los ácidos grasos; vitamina C, que sirve como antioxidante ayudando a asimilar el hierro; B9 o ácido fólico, imprescindible para prevenir enfermedades en el feto; y B6, necesaria para metabolizar las proteínas. Contiene minerales como potasio, calcio y magnesio y tiene mucha glutamina, que es un antioxidante que sirve para capturar radicales libres que pueden dañar nuestro organismo (SEA *et al* 2007). (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Aportes nutritivos del aguacate al consumidor (porción de 100 grs de aguacate).

Componente	Aporte
Calorías	183 calorías
Grasa total	15 grs
Colesterol	0 mgrs
Grasa saturada	3 grs
Grasa monoinsaturada	9 grs
Grasa poliinsaturada	3 grs
Proteínas	3 grs
Carbohidratos	9 grs
Fibra dietética	9 grs
Vitamina A	3 %
Vitamina B1	6 %
Vitamina B2	6 %
Vitamina B6	12 %
Vitamina C	12 %
Acido fólico	18 %
Calcio	0 %
Magnesio	6 %
Hierro	0 %

mgrs: miligramos. grs: gramos.

Fuente: Instituto de Nutrición Ministerio de Salud. SEA *et al*. 2007

3.5 Importancia económica

El aguacate Hass es una de las variedades más cultivadas en Colombia. A pesar de no tener un censo confiable, en las diferentes reuniones donde se convocan los productores de las

diferentes zonas, hoy tenemos en Colombia alrededor de 5500 hectáreas de aguacate Hass (cifra lograda por consenso) donde sobresalen tres regiones en orden de importancia por su área sembrada: Antioquia en los municipios de El Retiro, La Ceja, Guarne , San Vicente, Rio negro , Marinilla, Sonsón y Abejorral entre otros, zona conocida como el Oriente Antioqueño donde hay unas 2300 has sembradas según lo expresado por el secretario técnico de la cadena de aguacate (CCI 2009).

En el norte del departamento del Tolima hay otras 2000 hectáreas sembradas en los municipios de Fresno, Herveo, Casabianca, Palocabildo y Falan. En el Departamento del Cauca, en cinco municipios: Popayan, Morales, Piendamó, Tambo y Timbío hay 420 hectáreas sembradas por igual número de agricultores dentro de otros proyectos. Las restantes 780 has están sembradas en los departamentos del Eje Cafetero (Quindío, Caldas y Risaralda) y en otros departamentos como Valle del Cauca y Santander (CCI 2009).

En la mayoría de los casos huertos jóvenes entre 0 y 8 años de edad, con buenas producciones y con buena calidad de fruta que en principio se ha destinado al mercado doméstico, sobre todo a los dos mercados más importantes del aguacate en Colombia que son Bogotá y Medellín. Vale anotar que este año se exportaron dos contenedores de Hass a Holanda desde la zona de Antioquia (CCI 2009).

El consumo de aguacate se ha incrementado a nivel mundial, con un gran aumento en las superficies plantadas en todos los países que producen la fruta. Los datos sobre la evolución del consumo de esta fruta, indican un constante crecimiento en las últimas décadas. Esta fruta tiene una excelente demanda en los mercados tanto nacionales como internacionales. La mayor parte del volumen cultivado por los principales países productores a nivel mundial, es para consumo interno, dado que los países más productores son en su mayoría los mayores consumidores.

3.6 Banco de germoplasma

Los Bancos de Germoplasma poseen colecciones de material vegetal con el objeto de vivir y preservar sus características para el futuro beneficio de la humanidad y del ambiente. Los Bancos de Germoplasma son llamados también “Centros de Recursos Genéticos”, pues se le da gran importancia al hecho de que las plantas son fuente de características genéticas, fuentes de diversidad (Puldon 2006).

Las muestras de material recolectado que se introducen en los bancos de germoplasma para su conservación suelen recibir el nombre de accesiones (también, aunque menos generalizado, muestras o entradas). Cada accesión representa la entrada en el banco de un lote de germoplasma relativo a una única recolección, para una unidad taxonómica determinada y una población biológica definida, identificada así de modo inequívoco (ISPRA *et al* 2008).

Es importante subrayar que hasta hace pocos años los bancos de germoplasma centraban su interés casi exclusivamente en la conservación de las variedades agronómicas y de sus antecesores silvestres. De hecho, el 90% de todas las accesiones actualmente presentes en bancos de semillas está representado por especies de interés alimentario, muchas de ellas variedades de alimentos básicos (trigo, maíz, arroz, alubias, sorgo, etc.), que a una escala mundial se cultivan de forma intensiva, y que en conjunto tienen gran importancia económica. La actual profusión de bancos de semillas con vocación de preservar plantas silvestres raras o en riesgo de extinción es consecuencia de los acuerdos y obligaciones adoptados tras la Cumbre de la Tierra, celebrada en Río de Janeiro en 1992 para evitar la pérdida de diversidad biológica, y que quedó materializado en el Convenio de Diversidad Biológica (CDB) (ISPRA *et al* 2008).

3.7 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares o marcadores ADN revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos (fenotipos de fácil identificación visual), las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden ser diferencias en un solo nucleótido del gen o en un pedazo de ADN repetitivo (Velasco 2005).

Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir que dan información sobre la diversidad genética. Esto es un aspecto esencial en el campo de la biología tanto aplicada como fundamental: ecología, biología de la evolución, taxonomía, agronomía, biotecnología, microbiología, genética, y otros (Velasco 2005).

3.8.1 Tipos de marcadores moleculares

A Marcadores basados en la hibridación tipo Southern

Los marcadores basados en la hibridación tipo Southern sirven para detectar algunas mutaciones y se utiliza la técnica denominada RFLP. Esta tecnología expresa diferencias en sitios específicos del ADN que fueron reconocidos por enzimas de restricción particulares (endonucleasas) (Valdes-Infante *sf*).

Para la detección de los RFLPs, en primer lugar, es necesario aislar el ADN del organismo de interés, purificarlo y cortarlo con una o más endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes se separan en un gel de agarosa por electroforesis y se transfieren a una membrana que puede ser de nailon o de nitrocelulosa ("Southern blotting"). La subsecuente hibridación con alguna sonda marcada y detección con autorradiografía,

luminografía o quimioluminiscencia (dependiendo del tipo de marcaje) hará visible un fragmento de ADN específico, que puede ser comparado con el fragmento resultante de otros genomas tratados de la misma forma (Valdes-Infante *sf*).

Las sondas que se utilizan para RFLPs se obtienen de fragmentos de ADN nuclear, de organelos, o bien de secuencias transcritas como es el caso de ADN complementario (ADNc). El grado de polimorfismo detectado con RFLPs, difiere ampliamente entre las especies de plantas dependiendo de la sonda utilizada. Por ejemplo las sondas de copia única revelan un amplio grado de polimorfismo en maíz y col, mientras que en especies como el cacahuete, frijol, chícharo y melón, no se detecta una variabilidad amplia (Valdes-Infante *sf*).

Entre las características de los RFLPs se encuentran su omnipresencia debido a que puede estar en todos los tejidos, su naturaleza codominante, que presentan una herencia mendeliana simple, el nivel de polimorfismo que detectan es alto ya que son capaces de detectar variantes alélicas. El número de loci que detectan es de 1-3, presentan una dificultad técnica intermedia, la confiabilidad es alta. Otro elemento a destacar es que requieren DNA relativamente puro en concentraciones de 2-10µg y utilizan radioisótopos (Valdes-Infante *sf*).

Los RFLPs sirven como marcadores moleculares que se han utilizado para construir mapas genéticos con selección asistida por marcadores, para la clonación de genes basados en mapas para la identificación de cultivares, o para ayudar a resolver problemas de índole taxonómica o filogenética (Valdes-Infante *sf*).

Los RFLPs brindan patrones altamente reproducibles pero las variaciones en las longitudes de los fragmentos entre individuos o especies aparecen, ya sea cuando las mutaciones alteran el sitio de restricción o como resultado de una inserción/delección entre ellos. Sus principales limitaciones técnicas son las siguientes: se necesita un buen suministro de sondas; los pasos de hibridación y secado son consumidores de tiempo y difíciles de

automatizar y se requieren cantidades suficientes de ADN de buena calidad (10µg por digestión), por lo que no son aplicables donde se dispone de una cantidad muy limitada de fuente de material o tejido preservado (Valdes-Infante *sf*).

B Marcadores basados en la amplificación del ADN

Los marcadores basados en la amplificación del ADN se hacen mediante la reacción de PCR (polymerase chain reaction) o reacción en cadena de la polimerasa de ADN. Es una técnica que se basa en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una polimerasa de ADN termoestable. Para ello se utilizan dos oligonucleótidos llamados cebadores o primers. El segmento de ADN a amplificar está compuesto por dos hebras, la secuencia de uno de los oligonucleótidos hibrida en uno de los extremos del segmento y es complementaria a la hebra, el segundo oligonucleótido hibrida en el otro extremo del segmento y es complementario a la hebra. Para que exista amplificación del fragmento es imprescindible que ambos oligonucleótidos hibriden en secuencias complementarias presentes en las hebras del ADN en estudio.

La presencia de mutaciones en el sitio de hibridación de cualquiera de los oligonucleótidos impide la amplificación del fragmento. La necesidad de disponer de información previa acerca de la secuencia del ADN a amplificar para diseñar oligonucleótidos, limitó inicialmente el desarrollo de marcadores basados en la reacción de PCR en plantas (Picca *et al sf*).

La primera solución a este problema vino de la mano de los (RAPDs random amplified polymorphic DNAs) o fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente. Esta técnica se basa en la utilización de un único oligonucleótido de 10bp que hibrida al azar con el ADN en estudio. Para que se genere un fragmento RAPD es necesario que las dos hebras del ADN en estudio presenten sitios de hibridación con el oligonucleótido en orientaciones opuestas suficientemente cercanas (menos de 3000bp) como para permitir la amplificación.

La secuencia del oligonucleótido es aleatoria al igual que los sitios de hibridación, por lo que la secuencia amplificada es desconocida. El polimorfismo que se observa entre distintos individuos consiste en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado (Picca *et al sf*).

DAF (DNA amplification fingerprinting) y AP-PCR (arbitrary primer PCR) son técnicas similares a RAPDs. DAF involucra el uso de primers arbitrarios de longitud tan corta como 5 pares de bases. Esto reduce la especificidad del apareamiento con el ADN molde y resulta en un perfil más complejo de bandas. La visualización se lleva a cabo por medio de geles de poliacrilamida teñidos con plata. AP-PCR utiliza primers ligeramente más largos que la técnica anterior (aprox. 20 pares de bases). Los productos de amplificación son marcados radiactivamente y también pueden ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida (Picca *et al sf*).

La ventaja de estas técnicas consiste en que son rápidas y sencillas, de bajo costo de implementación, automatizables y no radioactivas. La desventaja, además de su baja reproducibilidad, es que es un marcador dominante (al observar un fragmento es imposible determinar si el mismo se originó de una o dos copias de la secuencia amplificada). La disminución en los costos de secuenciación y PCR, junto a la creciente información sobre genomas animales y vegetales han permitido el desarrollo de marcadores basados en PCR con diferentes características, entre ellos los más frecuentemente utilizados en plantas son: SSR (simple sequence repeats) o microsatélites y AFLPs (amplified fragment length polymorphisms) (Picca *et al sf*).

Los microsatélites (SSR), son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tandem de unos pocos pares de bases (1 a 4) flanqueadas por secuencias de copia única. La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y consecuentemente del tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar

diferencias de 2, 3 o 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite (Picca *et al sf*).

Por el alto polimorfismo que presentan por locus (multialelismo) se los considera los marcadores ideales para el mejoramiento en especies autógamas como el trigo. Estos marcadores son codominantes, genoma específicos y altamente polimórficos en comparación con los RFLPs y RAPDs. Su implementación en un laboratorio requiere de mayor infraestructura y presupuesto que los RAPDs (Picca *et al sf*).

C Marcadores moleculares mixtos

Marcadores mixtos AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de ADN) puede considerarse como una combinación de RFLP y RAPDs. Esta técnica consiste en esencia de cuatro etapas:

- 1) El ADN genómico es cortado con enzimas de restricción (generalmente una de corte raro y otra de corte frecuente).
- 2) Adaptadores de ADN de doble cadena se adhieren en forma específica a los extremos de los fragmentos obtenidos en el paso anterior, generando así el molde para la amplificación del ADN.
- 3) Una fracción de los fragmentos obtenidos es amplificada selectivamente por la acción de primers específicos que fueron diseñados para reconocer la secuencia de los adaptadores ligados en el segundo paso, el sitio de la enzima de restricción, más una a tres bases selectivas al azar agregadas en el extremo 3'. El uso de bases selectivas al azar permite la amplificación de sólo un grupo de fragmentos de restricción (aquellos en que coincide la secuencia del adaptador + sitio de restricción + bases selectivas).

- 4) Análisis de la subpoblación de fragmentos amplificados mediante su desnaturalización por electroforesis en geles de alta resolución (poliacrilamida) y visualización por autoradiografía o por tinción con nitrato de plata.

Su implementación en laboratorio requiere de una infraestructura y presupuesto similar a los microsatélites. Estos marcadores presentan un alto poder de detección de la variabilidad genética, ya que se explora simultáneamente el polimorfismo de ausencia/presencia de sitios de restricción (como los RFLP) y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias (como los RAPDs). La base del polimorfismo es la ausencia o presencia de fragmentos amplificados de un tamaño determinado y al igual que en los RAPDs, no es posible distinguir individuos heterocigotas por lo que se trata de un marcador dominante (Picca *et al sf*).

Es un marcador mucho más robusto que los RAPDs, ya que en la amplificación se utilizan oligonucleótidos más largos, que aumentan significativamente la especificidad de la reacción sin perder las ventajas de la amplificación de secuencias al azar (no requiere información previa de secuencia de ADN). Otra ventaja de los AFLPs es el número de fragmentos resueltos por electroforesis que oscila entre 30-50 contra los 4-10 de RAPDs (Picca *et al sf*).

Para una utilización más eficiente en programas de mejoramiento de marcadores RFLPs, RAPDs y AFLPs existe la posibilidad de transformarlos en marcadores PCR alelo-específicos, que son económicos, robustos y de sencilla implementación en cualquier laboratorio. Existen distintas estrategias para la conversión de marcadores RFLP, RAPDs y AFLPs en marcadores PCR alelo-específicos, en general ligados a un carácter de interés agronómico (Picca *et al sf*).

3.9 Reacción de la cadena polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica potente que se ha convertido rápidamente en una de las más ampliamente usadas en la biología molecular porque es rápida, de bajo costo y sencilla. La técnica amplifica fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas del ADN patrón, aun cuando ese ADN sea de calidad relativamente baja (Espinosa, *sf*).

La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa. Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar (donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar) los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (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) (Espinosa, *sf*).

El PCR tiene diferentes métodos o aplicaciones en función de lo que nos interese investigar (como son los RAPDs, AFLPs, ISSRs, SSCP) y el primer paso es tener claro el tipo de información que necesitamos para elegir o diseñar la estrategia más apropiada para nuestro trabajo (Espinosa, *sf*). Brevemente podemos dividir la técnica en dos categorías:

1. PCRs para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus). Estos PCRs requieren conocer la secuencia que se trabaja (por ejemplo cuando amplificamos un gen específico como el 16S), en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de ese gen y se obtiene un solo

fragmento de un tamaño ya conocido. Con este tipo de PCRs es posible hacer filogenias, y para obtener los datos hay distintos caminos: desde hacer geles especiales que detectan cambios hasta de una sola base entre las secuencias (SSCP), hasta utilizar enzimas de restricción para generar patrones de cada individuo, aunque lo ideal es obtener la secuencia completa del gen que amplificamos, sobre todo cuando se desea responder a preguntas relacionadas con las fuerzas evolutivas que han actuado sobre él (Espinosa, *sf*).

2. PCRs en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como zonas hipervariables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento (o fragmentos) que se esperan. Éstos se utilizan para determinar polimorfismo genómico y son los más comunes para *fingerprint*, ya que es sencillo obtener los datos (un gel de agarosa después del PCR es suficiente), se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones. En general este tipo de PCRs utiliza un solo oligonucleótido con 2 características importantes: que sea de pequeño a mediano (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia esté presente muchas veces en el ADN del organismo que estudiamos. Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, por ejemplo los sitios que sirven para iniciar la síntesis de ADN en los cromosomas, conocidas como microsatélites. En el primer ciclo de reacción lo que sucederá es que el oligonucleótido utilizado hibridará en distintas zonas del ADN, y primero comenzarán a sintetizarse fragmentos de tamaños variables e indefinidos (hasta donde la polimerasa logre copiarlos). En el segundo ciclo las cadenas sintetizadas a partir de las primeras copias formadas serán del tamaño que existe entre dos oligonucleótidos que no estén muy alejados entre sí. Estos fragmentos se copiarán una y otra vez, y de esta manera al final obtendremos muchos fragmentos de tamaños diferentes, de los que conoceremos la secuencia con que inician y terminan, pero no la secuencia completa de cada uno (Espinosa, *sf*).

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

El experimento se realizó en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Municipio del Departamento Colombiano del Valle del Cauca. Latitud 03° 31'48" N y longitud 76° 18'13"O. Se encuentra a una altura de 1,001 msnm. y tiene una temperatura promedio de 23 °C, con precipitación media anual que alcanza valores de 2,000 mm a 2,100 mm (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 en el período comprendido entre Junio y Septiembre del 2011 y consistió en incorporar más accesiones al banco de ADN de aguacate establecido en el 2009 utilizando muestras de tejido vegetal (hojas), extraídas del banco de germoplasma de CORPOICA, Palmira, Colombia, para realizar la caracterización molecular de las accesiones en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Los materiales a utilizar han sido extraídos de 27 departamentos del territorio colombiano los cuales se encuentran en el banco de germoplasma de CORPOICA de donde se proporcionaron los materiales con sus lugares de origen de acuerdo a la clasificación establecida. Los nombres de los materiales se estarán proporcionando a medida que avance el proyecto.

4.2 Materiales y equipo

En la incorporación al resto de las accesiones del banco de ADN de aguacate se utilizaron los siguientes equipos: termos para nitrógeno líquido de 10 litros, centrifuga de 14000 rpm, balanzas, tijeras, papel aluminio, marcador permanente, termociclador PTC-100, agitador horizontal, liofilizador, cabina extractora de gases, micropipetas y agujas (1000, 200, 100, 20, 10, 2 ul), cámara electroforesis horizontal, transiluminador, puntas para micropipeta. Entre los materiales están: agarosa, nitrógeno líquido, tris base, EDTA, acetato de potasio, taq DNA polimerasa, DNTP'S, ácido bórico, isopropanol, agua tipo HPLC, bromuro de etidio.

4.3 Colecta

Se tomaron 78 muestras de material vegetal del banco de germoplasma de CORPOICA Palmira el cual posee una colección de accesiones de aguacate de todo el país (27 departamentos). La colecta se hace tomando de dos a tres hojas jóvenes de cada planta posteriormente se envuelven en papel aluminio previamente marcado con el nombre y número de planta colectada para luego colocarla en nitrógeno líquido para su conservación y almacenarla a una temperatura de -80 °C hasta el momento de la liofilización. Se tendrán en cuenta los sitios de distribución de las accesiones, basada en sus condiciones ambientales y geográficas. Para cada muestra colectada se registraran los datos en el formato de colecta de pasaporte establecido por el IPGRI.

4.4 Liofilización del material vegetal

A las plantas se les tomo muestras de hojas jóvenes las cuales se cortaron en pequeños fragmentos menores de un centímetro (entre menor tamaño tenga la muestra el tiempo de congelación es más rápido) a mano y se colocaron en tubos Falcon previamente marcados para luego introducirlos en un juego de Beakers y posteriormente congelarlos a una temperatura entre -20°C y/o -50°C. El tiempo de congelación está en un rango de 24 o 48

horas dependiendo del tipo de muestra, artículos recomiendan 24 horas en tejido vegetal. Las condiciones del equipo y/o liofilizador: 0.12 mBar de presión y temperatura del condensador interno del equipo es de -50°C.

4.5 Preparación de reactivos para Buffer de extracción

Para iniciar el proceso de extracción de ADN es necesario preparar anticipadamente los reactivos para el Buffer de extracción el cual necesita de tres reactivos madre como ser: Tris HCL 1M pH 8; EDTA 0.5M pH 8.0; NaCl 5M, los que se preparan utilizando la siguiente formula:

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

Donde:

PM= Peso Molecular.

[]= Concentración del reactivo.

Vol.= Volumen a preparar.

Tris HCl 1M a pH 8.0

$$121.14 \frac{gr.}{Mol} \times 1 \frac{Mol}{Litro} \times 0.1 Lts. = 12.114 gr.$$

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 agregando ácido clorhídrico.

EDTA 0.5M a pH de 8.0

$$372.24 \frac{gr.}{Mol} \times 0.5 \frac{Mol}{Litro} \times 0.1 Lts. = 18.612 gr.$$

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 destilada 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 esterilizarlas, este proceso dura aproximadamente de 40 a 50 minutos. Una vez que estén listas las soluciones madre se prepara el buffer de extracción utilizando las cantidades que aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Preparación del Buffer de extracción.

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

El Buffer de extracción se prepara de acuerdo a la cantidad de muestras que se van a extraer y así se toman las cantidades de los reactivos indicados para preparar el volumen deseado el cual se completa agregando agua desionizada, luego se autoclava por 15 minutos y se adiciona 1% de la relación P/V PVP, disolver agitando (0.5, 1, 2.5 gr respectivamente), y adicionar 2% V/V de Beta Mercaptoetanol (1, 2 y 5 ml respectivamente). El Buffer no debe de almacenarse por más de 30 días.

4.6 Extracción de ADN

La extracción se basa en la metodología Dellaporta *et al* (1983) para plantas con algunas modificaciones.

Una vez liofilizado el material vegetal se sacan aproximadamente 100 mg y se colocan en un mortero de cerámica y agregamos 800 µl de Buffer de extracción para destruir las

membranas celulares y se hace un pase de vortex. La suspensión se incuba en un baño maría a 65°C durante 30 minutos (cada 10 minutos se hace un pase de vortex). A cada muestra se le adicionaron 250 µl de Acetato de potasio 5M frío y se mezcló, incubar en hielo durante 20 minutos en agitación. Las muestras se centrifugan a 12000 RPM durante 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante y se transfirieron 800 µl a un tubo nuevo al cual se le agregaron 640 µl de Isopropanol frío y mezclar de 8 a 10 veces e incubar a (4°C) por 3 horas para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 12000 RPM durante 10 minutos para recuperar los ácidos nucleicos y eliminando el sobrenadante, remover el Isopropanol y secar las gotas con papel toalla. El precipitado se secó a temperatura ambiente durante una hora, y se resuspendió en 80µl de TE 1X. Por último se agregó a cada muestra 1µl de RNAsa. El ADN se observó en geles de agarosa al 0.8%, visualizados con Bromuro de Etidio bajo luz ultravioleta. Conservar a 4°C hasta su utilización (Henríquez 2000).

Otro método de extracción de ADN que se utilizo fue el de Aislamiento de ADN Genómico en el cual se pueden obtener entre 50 ug a 100 ug de ADN por cada 100 ml de tejido liofilizado y molido. Requiere mayor cantidad de tejido vegetal liofilizado hasta un gramo.

Una vez liofilizado el material vegetal se colocan 50 mg de este y agregamos 50 ul de solución amortiguadora CTAB y mezclamos por inversión para homogenizar el tejido y la solución. Después incube y mueva los tubos con suavidad en un agitador de balance en un baño maría a 65°C durante 90 minutos (cada 30 minutos hacer un vortex). Luego retire los tubos y deje enfriar por unos 10 minutos. Posteriormente agregamos 500 ul de FCI (Fenol Cloroformo Isoamílico 25:24:1) agite los tubos por inmersión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugan a 13500 RPM a temperatura ambiente durante cinco minutos para formar la parte acuosa (liquido claro de color amarillo) y la fase orgánica (color verde oscuro). Después recupere aproximadamente 750 ul de la fase superior acuosa y vacíela en un tubo nuevo de 1.5 o 2 ml. Posteriormente agregamos 500 ul de CI (Cloroformo Isoamílico 24:1) y agitamos por cinco minutos y después lo centrifugamos a 13500 RPM por cinco minutos y recuperamos la fase superior acuosa en

un tubo nuevo de 1.5 o 2 ml. Agregamos a las muestras medio volumen de Isopropanol (2-Propanol) al 100% previamente enfriado a una temperatura de -20°C y mezclamos por inversión para favorecer la precipitación del ADN e incubamos las muestras por tres horas a -20°C. Las muestras se centrifugan a 13500 RPM a temperatura ambiente durante 10 minutos, para precipitar y formar la pastilla de ADN en el fondo del tubo y deseamos el Isopropanol por decantación. Luego agregamos a cada muestra 1 ml de Alcohol al 75% lave suavemente la pastilla de ADN y centrifugue a 13500 RPM a temperatura ambiente por un minuto y deseche el Alcohol por decantación, deje que se evapore a temperatura ambiente hasta que la pastilla este seca (si todavía siente olor a Alcohol, esto es un indicativo que la pastilla no está completamente seca). Por ultimo vuelva a suspender la pastilla en 100 ul de TE o agua doble destilada. Guarde las muestras a 4°C hasta utilizarlas.

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 formula:

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

Dónde:

C_i : Concentración Inicial

V_i : Volumen Inicial

C_f : Concentración Final

V_f : Volumen Final

$$5X \cdot V_i = 0.5X \cdot 100 \text{ ml}$$

$$V_i = \frac{0.5X \cdot 100 \text{ ml}}{5X} = 10 \text{ ml}$$

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 diluyó 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 mezclarlos bien, 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 µl para visualizar y se corrió por 40 minutos con un voltaje de 80 voltios y lo visualizamos en el transluminador.

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 3. Orden de los reactivos con los respectivos valores de concentración final y las cantidades de microlitros a usar.

Reactivo	[] Final	µl
MgCl ₂	2.5 mM	2.5
Buffer Taq	1 X	2.5
DNTP' s	0.2 mM	4.0
Cebador (Primers)	0.65 µm	1.625
H ₂ O (Mq)	----	10.17
BSA	----	2.0
Taq Polimerasa	0.625	0.2
ADN	10 ng	1

MgCl₂: cofactor de la Taq Polimerasa.

Buffer Taq: mantiene el pH del coctel.

DNTP' s: dinucleotidos trifosfatados (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 dé acabo la PCR y estos deben estar en óptimas condiciones para su realización, el trabajo consistió con 78 muestras de aguacate del Banco de Germoplasma de CORPOICA donde fueron colectadas en diferentes zonas del país. El número de muestras a preparar se multiplicó por la cantidad de microlitros (µl) a usar para cada reactivo por lo que en cada recipiente se colocó 25µl. Una vez terminada la PCR que dura un tiempo aproximado de tres horas y medias procedimos a observar los resultados con geles de agarosa al 1.2%, se hizo para observar la calidad del amplificado.

4.8.1 Cebadores RAM's

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

CA.....55°C

CCA.....55°C

CGA.....55°C

CT.....55°C

4.8.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Los productos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida, la preparación es un poco más larga que el de agarosa con la diferencia de que este la visualización de las bandas es de mejor calidad y de alta definición, la poliacrilamida está compuesta por acrilamida y bisacrilamida 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 transluminador. La preparación en forma ordenada (Tabla 4):

Tabla 4. Reactivos y cantidades para realizar el gel de poliacrilamida.

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

Dónde:

Persulfato de amonio: agente polimerizante.

Temed: catalizador (acelera la reacción del persulfato 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 son secadas de modo para que el gel no se pegara 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 añaden los soportes a los vidrios para presionarlos.

Luego de haber preparado el gel este se volcó dentro de los vidrios por medio de una micropipeta y 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, 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 visualizarlo, luego se visualizan los geles en el transluminador y se lavan tres veces con agua destilada para quitar residuos de Bromuro y poder revelarlo.

4.9 Análisis de la Información

La información de los patrones de bandas se registró en una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0). Para la selección de las bandas polimórficas se consideró como Locus polimórfico aquel en el cual la frecuencia del alelo más común fue menor al 95%. A través de esta matriz y utilizando los programas SIMQUAL del paquete NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System for Personal Computer) y el programa TFPGA (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 u 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 de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante la metodología Dellaporta *et al* (1983) para plantas con algunas modificaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia. Se decidió trabajar con esta metodología ya que presenta buenos resultados en comparación al de Aislamiento de ADN genómico ya que esta al momento de hacer la corrida en geles de agarosa no se podía visualizar el ADN y por ende tampoco con la técnica del PCR. Se comenzó extrayendo 5 muestras, las cuales presentaron buenas condiciones (Figura 1). Posteriormente se continuó con la extracción de las demás muestras colectadas.

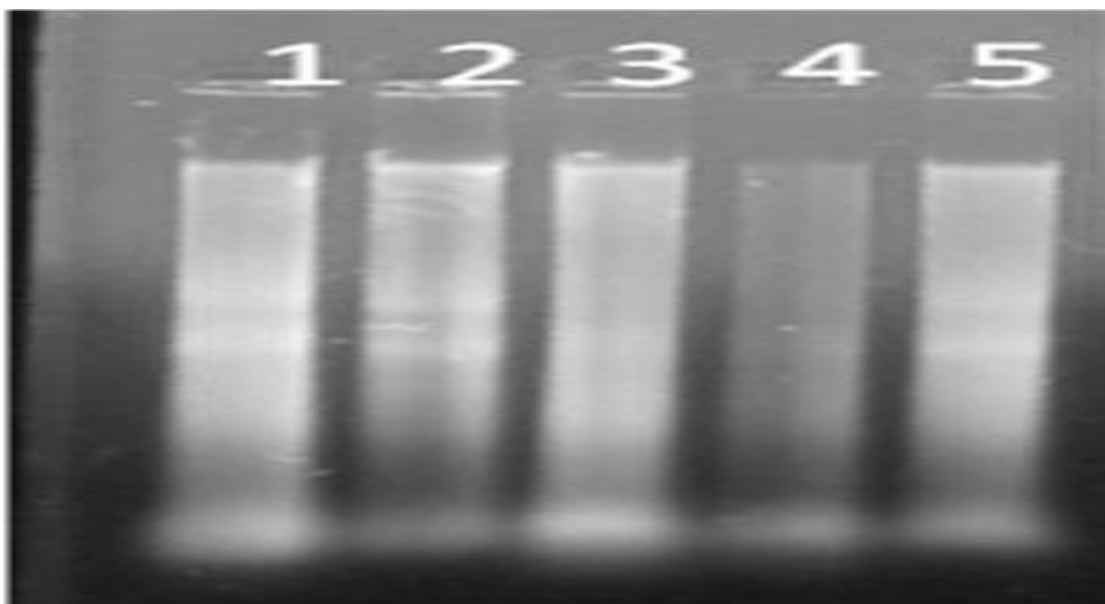


Figura 1. Corrida de cinco accesiones de ADN con PCR en geles de agarosa.

5.2 Estandarización de la condiciones para PCR

La calidad del ADN se midió a través de su amplificado siendo consistentemente no amplificable por medio de esta técnica. (Figura 2).

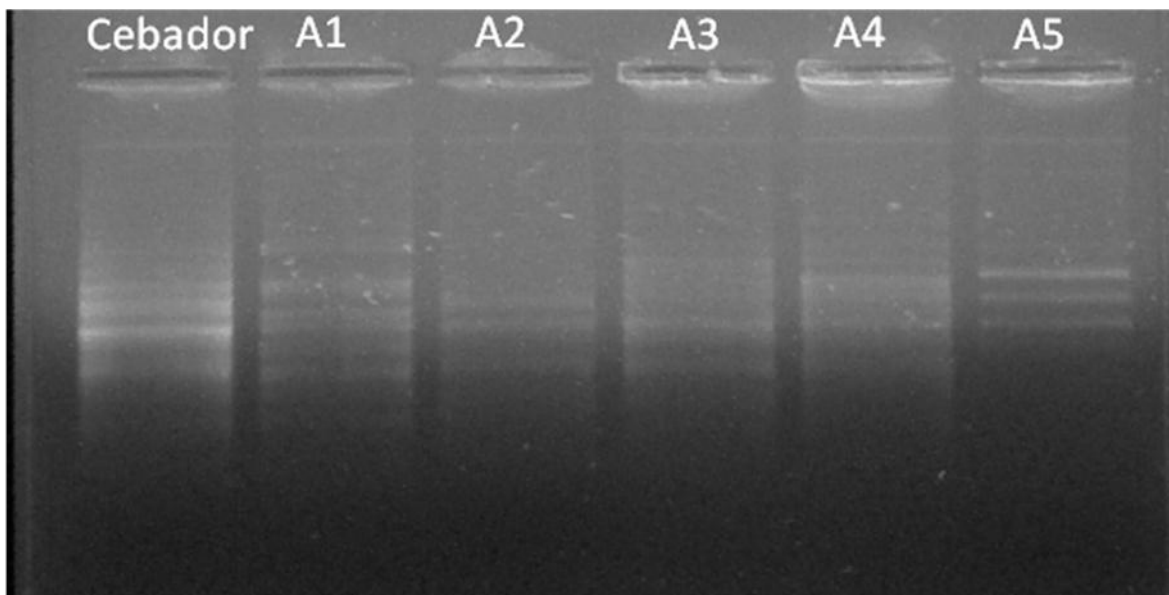


Figura 2. Muestras de ADN corridas con PCR las cuales no son un buen producto amplificable.

Por lo que se procedió a realizar un lavado del ADN debido a una o más causas posibles de las que se pueden describir a continuación: incorrecta elaboración del Buffer de extracción, contaminación de las muestras al momento de la elaboración del coctel para la PCR, no esterilización de las puntas para micropipetas y otros.

5.2.1 Lavado del ADN

Se toman las accesiones y les aplicamos 200 µl de TE 1X y hacíamos un pequeño vortex y posteriormente colocamos 400 µl de Fenol y de nuevo otro pase de vortex; luego agregamos 300 µl de Cloroformo y lo centrifugamos por cinco minutos por 13000 RPM, después tomamos el sobrenadante y agregamos 500 µl de Isopropanol frio y lo dejamos reposando por dos horas a -20 °C. Una vez terminado el tiempo de nuevo centrifugamos a

13500 RPM por 15 minutos para luego vaciar el sobrenadante y dejándolo que seque. Por ultimo agregamos 80 µl de Buffer AE.

5.2.2 Técnica del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para evaluar la diversidad del banco de germoplasma se seleccionaron cuatro cebadores RAMs de siete utilizados para presentar algún grado de polimorfismo. Se estandarizaron las condiciones para el PCR para obtener un buen promedio de bandas y buena visualización de las mismas y las condiciones fueron las siguientes (Tabla 5):

Tabla 5. Protocolo de la PCR.

Ciclo	Temperatura (°C)				Tiempo (Cebador)
	CT	CCA	CA	CGA	
Desnaturalización Inicial	95	95	95	95	5 minutos
Desnaturalización	95	95	95	95	30 segundos
Hibridación	55	55	55	55	45 segundos
Extensión	72	72	72	72	2 minutos
37 ciclos desde el paso 2	-	-	-	-	-
Extensión final	72	72	72	72	7 minutos
End	16	16	16	16	Forever

Las temperaturas de los cebadores en el ciclo de hibridación son las mismas ya que son recomendables porque muestran buena cantidad de bandas. En la Figura 3 se muestran los amplificadores del cebador CGA:

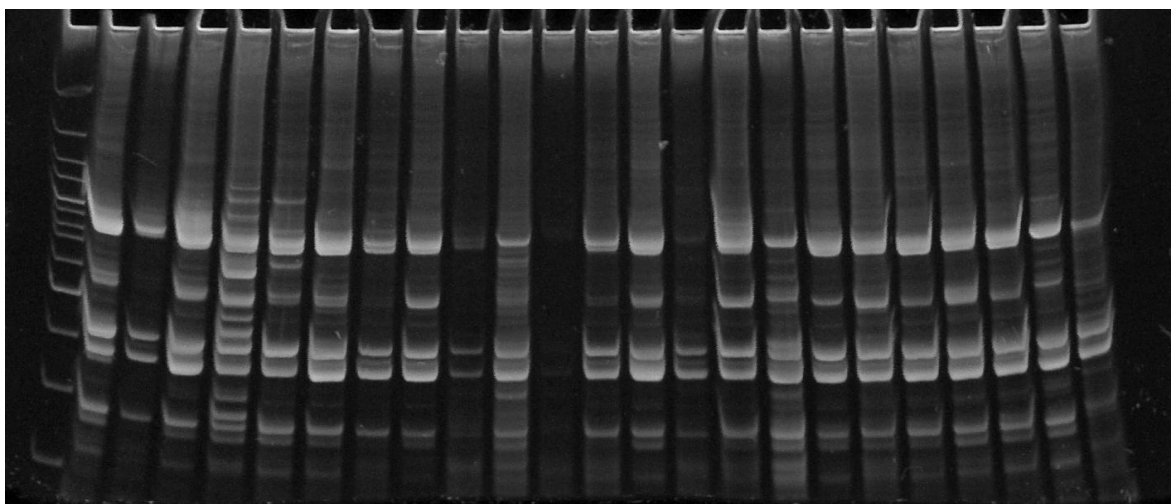


Figura 3. Muestras de ADN de la 1-23 amplificados con PCR.

5.3 Características de los cebadores

Se utilizaron cuatro cebadores para el trabajo los cuales originaron un patrón de 76 bandas y con pesos moleculares entre 120 y 1200 pb, el número de bandas por cebador estuvo entre 21 para CT, 22 para CCA, 16 para CA y 17 para CGA, el total de bandas corresponde al mismo número de bandas polimórficas como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 6. Cantidad de bandas totales y polimórficas obtenida con los cebadores RAMs.

Cebador	Número de bandas polimórficas
CT	21
CCA	22
CA	16
CGA	17
TOTAL	76

En trabajos de diversidad genética de *Persea americana* colectadas en el banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias (CORPOICA) utilizando la técnica RAMs se obtuvieron 50 bandas con pesos moleculares entre 120 a 1400 pb (Cerrato 2010). Se probaron siete cebadores RAMs en la

caracterización de 43 accesiones de Uchuva *Physalis peruviana* que generaron 50 patrones de bandas distinguibles en un rango de longitud de 250 a 1000 pb (Bonilla *et al* 2008). Se usaron seis cebadores RAMs en la caracterización de 53 accesiones de guayaba *Psidium guajava* las cuales generaron 74 bandas polimórficas con pesos de 100 a 700 pb (Sanabria 2006).

Se evaluó la diversidad de especies de *Heliconia spp* utilizando cuatro cebadores generando un patrón de 27 bandas (Cobo 2004). En nacedero *Trichanthera gigantea* se estudió la diversidad genética usando cinco cebadores RAMs generando 71 bandas con pesos moleculares de 120 a 1500 pb de las cuales 50 fueron polimórficas (Posso 2010). Al comparar el número de loci RAMs generados por los cuatro cebadores de este estudio (76 en total) se propone que fue un número adecuado para estimar parámetros genéticos para evaluar la diversidad de la colección nacional de aguacate y fue confiable para el análisis estadístico.

5.4 Análisis Descriptivo

El análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA (Figura 4) mostro que no existe alguna relación significativa entre los agrupamientos formados y los departamentos de procedencia de las accesiones, dando un nivel de similitud de 0.59.

Se formaron cuatro grupos (A, B, C, D) y cinco subgrupos subgrupos los cuales están conformados de la siguiente manera: el grupo A conformado por los subgrupos 1 que presentan accesiones provenientes de Caldas, Boyaca y Cesar; el grupo B conformado por el subgrupo 2 en el que se encuentran las accesiones provenientes de Antioquia, Santander, Nariño, Valle, Cauca, Magdalena, Tolima, Quindío, Boyacá, Caldas y Meta; el grupo C conformado con los subgrupos 3 y 4 con accesiones provenientes de Nariño, Boyacá, Santander, Magdalena, Cauca, Quindío, Valle, Cesar, Huila y Tolima; el grupo D conformado por el subgrupo 5 con accesiones provenientes de Magdalena, Nariño,

Santander, Tolima, Valle, Caldas, Putumayo y Huila. La descripción de los grupos y subgrupos se detalla a continuación (Tabla 7):

Tabla 7. Descripción de los grupos y subgrupos originados por el dendrograma.

Grupo	Subgrupo	Origen de Colecta
A	1	Caldas, Boyacá y Cesar.
B	2	Antioquia, Santander, Nariño, Valle, Cauca, Magdalena, Tolima, Quindío, Boyacá, Caldas y Meta.
C	3, 4	Nariño, Boyacá, Santander, Magdalena, Cauca, Quindío, Valle, Cesar, Huila y Tolima.
D	5	Magdalena, Nariño, Santander, Tolima, Valle, Caldas, Putumayo y Huila.

Las accesiones MA5 y MA3 provenientes de Magdalena no formaron un grupo definido por lo que se ubicaron de manera más cercana a accesiones provenientes de A. las accesiones NN1 y NN2 provenientes de Nariño se ubicaron de manera poco dispersa y relacionadas con accesiones provenientes de Santander y Tolima respectivamente. Las accesiones TO1 y TO2 provenientes de Tolima se ubicaron en grupos diferentes (grupos C y D respectivamente), relacionadas con accesiones provenientes de Hulumana y Nariño respectivamente.

Las accesiones NT2 y NT4 provenientes de Nariño se ubicaron el mismo grupo B y se ubicaron de manera dispersa con relación a accesiones provenientes de Quindio y Magdalena . Así mismo existen 6 accesiones que no están dentro de estos grupos como ser TU1, D71, ANC, CAM, QU3 y NT1 provenientes de F, C, Antioquia, Caldas, Quindío y Nariño respectivamente ya que tienden a ser accesiones atípicas. Los resultados dan la posibilidad de un flujo genético o intercambio de accesiones entre los agricultores.

También se puede incluir la diseminación de los materiales a través de los animales, como las aves, el ganado y hasta el mismo hombre. Resultados anteriores demuestran que existe

una tendencia que hay grupos que se forman con muestras colectadas en sitios diferentes, por lo que puede observarse una existente diferenciación entre especies.

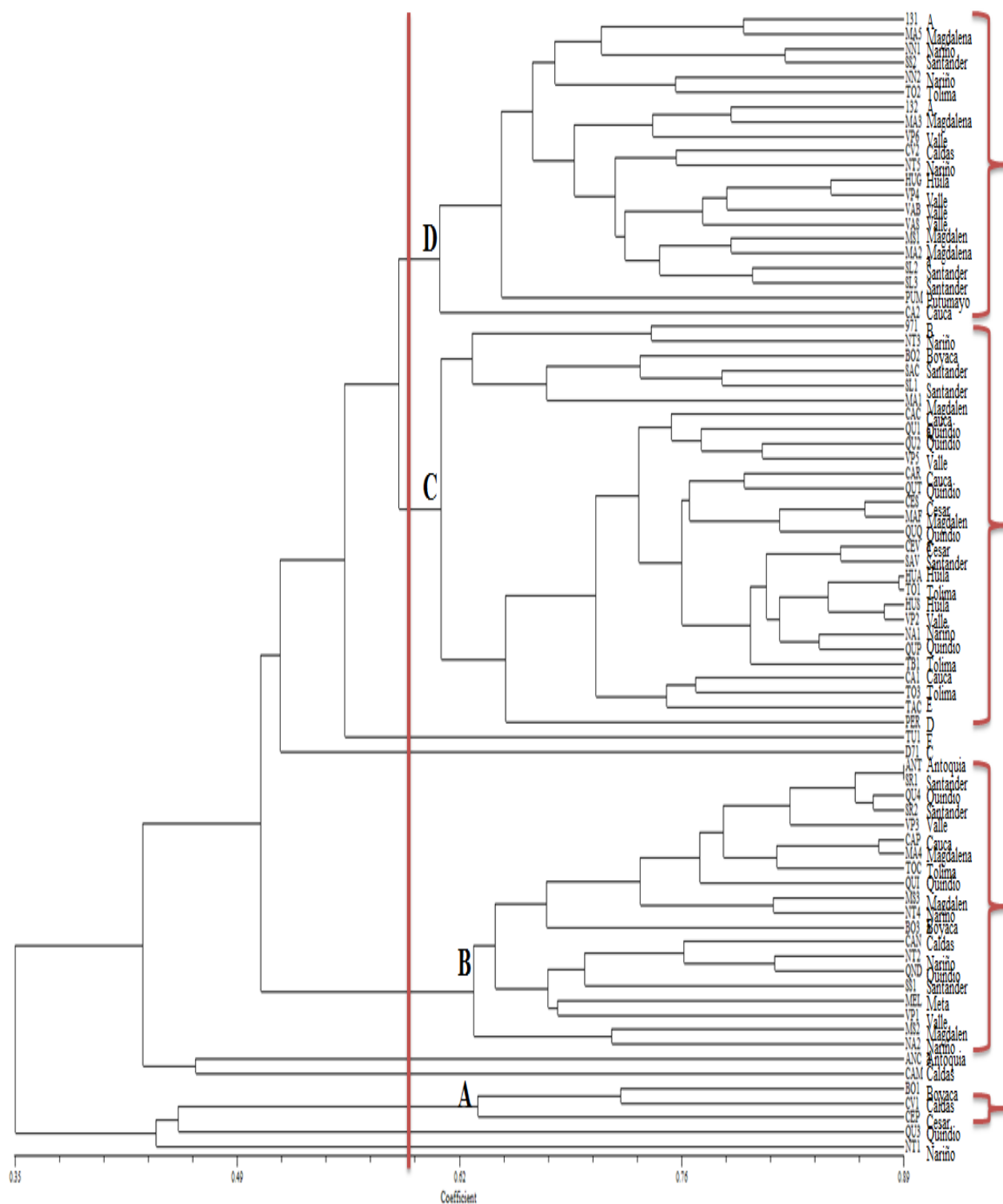


Figura 4. Dendrograma de distancia genética de 78 accesiones de aguacate, basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li (1978) y calculado con los datos combinados de los cuatro cebadores RAM's utilizados.

5.5 Heterocigosidad esperada (He) y % de loci polimórfico

Los Primers usados para este estudio fueron altamente polimórficos con valores entre 85 a 100% y a la vez presenta una He insesgada mínima de 0.2548 y una máxima de 0.3814 con un promedio total de 0.3263 (Tabla 8). En los estudios realizados con aguacate se demuestran haber encontrado valores polimórficos del 90% y una He insesgada de 0.334 de 64 accesiones colectadas (Cerrato 2010); por tanto se puede decir que existe una alta diversidad genética en las accesiones colectadas en la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias (CORPOICA).

Tabla 8. Porcentaje de Heterocigosidad y loci polimórfico de 78 accesiones de *Persea americana* para cada primer evaluado.

PRIMER	He Insesgada	Polimorfismo (%)
CT	0.2548	85.7143
CCA	0.3746	95.4545
CA	0.3814	93.75
CGA	0.3001	100
TOTAL	0.3263	93.4211

5.6 Diferenciación de accesiones

Los estadísticos de Wright (1931) citado por Posso (2010) miden la estructuración genética a diferentes niveles espaciales, por ejemplo en un conjunto de poblaciones de una misma especie o un a población dividida en varias subpoblaciones. Varios estudios de diversidad genética en colecciones y bancos de germoplasma de guayaba *Psidium sp.* (Rueda et al 2006), cacao *Theobroma sp* (Moreno et al 2004), no reportan estadísticos de estructura poblacional por considerar que las accesiones de los bancos no corresponden a una muestra representativa de poblaciones naturales.

Utilizando toda la población realizada para la estimación de H_e se realizó la estimación de del índice de fijación (F_{ST}) para verificar la existencia de diferenciación genética de las accesiones. El F_{ST} cuantifica la consanguinidad de las subpoblaciones en relación a la población total de la cual forman parte, se interpreta como la proporción de la variación total atribuible a la diferenciación entre poblaciones (Caujupe 2006 citado por Posso 2010).

El valor de F_{ST} encontrado fue de 0.1733 (S.D= 0.0119; 1000 repeticiones) lo que indica que existe una alta diferenciación genética de la población (Tabla 9). Estudios realizados anteriormente se encontró un F_{ST} del 0.1770 (S.D= 0.0242; 1000 repeticiones) (Cerrato 2010) que posee una estrecha relación con la información que se estudió.

Tabla 9. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al F_{ST} propuesta por Wright (1978).

Valor de F_{ST}.	Grado de diferenciación.
0 – 0.05	Poca diferenciación genética.
0.06 – 0.15	Moderada diferenciación genética.
0.16 – 0.25	Alta diferenciación genética.
Mayor de 0.26	Gran diferenciación genética.

5.7 Distancia genética

En la Tabla 10 se observan los valores de distancia genética de los 20 grupos de accesiones de la colección nacional de aguacate. El grupo que mostro ser más distante fue el 17 (E) con 11 (Meta) (0.6931) y la más cercana fue el 6 (Caldas) con 4 (Boyaca) (0.0024), se puede observar que entre los grupos existe una distancia genética entre si con una mínima cercanía entre ciertos individuos.

Tabla 10. Identidad (vertical) y distancia de genética (horizontal) de los cuatro grupos de accesiones de la colección nacional.

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	*****																			
2	0.4660	*****																		
3	0.1411	0.2965	*****																	
4	0.1752	0.3094	0.0430	*****																
5	0.1626	0.2403	0.0776	0.0788	*****															
6	0.1644	0.3578	0.0338	-0.0024	0.0393	*****														
7	0.1943	0.2992	0.1012	0.0680	0.0625	0.0692	*****													
8	0.2865	0.4595	0.3279	0.2174	0.2363	0.2939	0.3282	*****												
9	0.1874	0.3370	0.1982	0.2059	0.0587	0.2062	0.0929	0.3099	*****											
10	0.0881	0.2574	0.0489	0.0103	0.0319	0.0385	0.0504	0.2460	0.1185	*****										
11	0.2769	0.4595	0.1707	0.1026	0.2810	0.1727	0.2573	0.5021	0.4382	0.1653	*****									
12	0.1203	0.2545	0.0373	-0.0030	0.0620	0.0149	0.0584	0.2034	0.1401	0.0157	0.1799	*****								
13	0.3670	0.4806	0.3826	0.4106	0.2523	0.4143	0.2780	0.4806	0.3234	0.3388	0.5695	0.3703	*****							
14	0.2580	0.5931	0.3494	0.3094	0.3063	0.3095	0.3889	0.4187	0.3509	0.2528	0.4595	0.3059	0.5241	*****						
15	0.1663	0.2579	0.0553	0.0187	0.0398	0.0485	0.0391	0.2139	0.1064	0.0321	0.2032	0.0194	0.3646	0.3497	*****					
16	0.1672	0.2419	0.0836	0.0121	0.0458	0.0742	0.0710	0.1940	0.1290	0.0412	0.1814	0.0200	0.3182	0.2921	0.0264	*****				
17	0.4319	0.4595	0.3826	0.3943	0.2443	0.4027	0.2504	0.5021	0.2204	0.3413	0.6931	0.3500	0.3989	0.6419	0.2783	0.3450	*****			
18	0.1634	0.2070	0.1095	0.0962	0.0331	0.1231	0.0570	0.2773	0.0578	0.0535	0.2854	0.0663	0.2854	0.2814	0.0433	0.0474	0.2107	*****		
19	0.3159	0.4806	0.3386	0.3094	0.2604	0.3578	0.2437	0.4806	0.3792	0.2713	0.4806	0.2940	0.5465	0.5695	0.2715	0.2736	0.5695	0.3229	*****	
20	0.0635	0.3286	0.0366	0.0393	0.0365	0.0329	0.0526	0.2279	0.0875	0.0039	0.2012	0.0165	0.3205	0.2353	0.0330	0.0420	0.3286	0.0523	0.3071	*****

Procedencia:

1: A	11: Meta
2: B	12: Nariño
3: Antioquia	13: D
4: Boyacá	14: Putumayo
5: Cauca	15: Quindío
6: Caldas	16: Santander
7: Cesar	17: E
8: C	18: Tolima
9: Huila	19: F
10: Magdalena	20: Valle

El dendrograma para los cuatro grupos construidos por UPGMA (Figura 5) y con un bootstrapp de 1000 repeticiones mostró un bajo porcentaje de loci que soportan la formación de nodos (Tabla 11) debido a que el número de cebadores utilizados en la investigación fueron cuatro para determinar con exactitud la diversidad genética de la colección pero a su vez debido a los resultados obtenidos se comprobó la efectividad de la técnica molecular RAMs para el estudio realizado

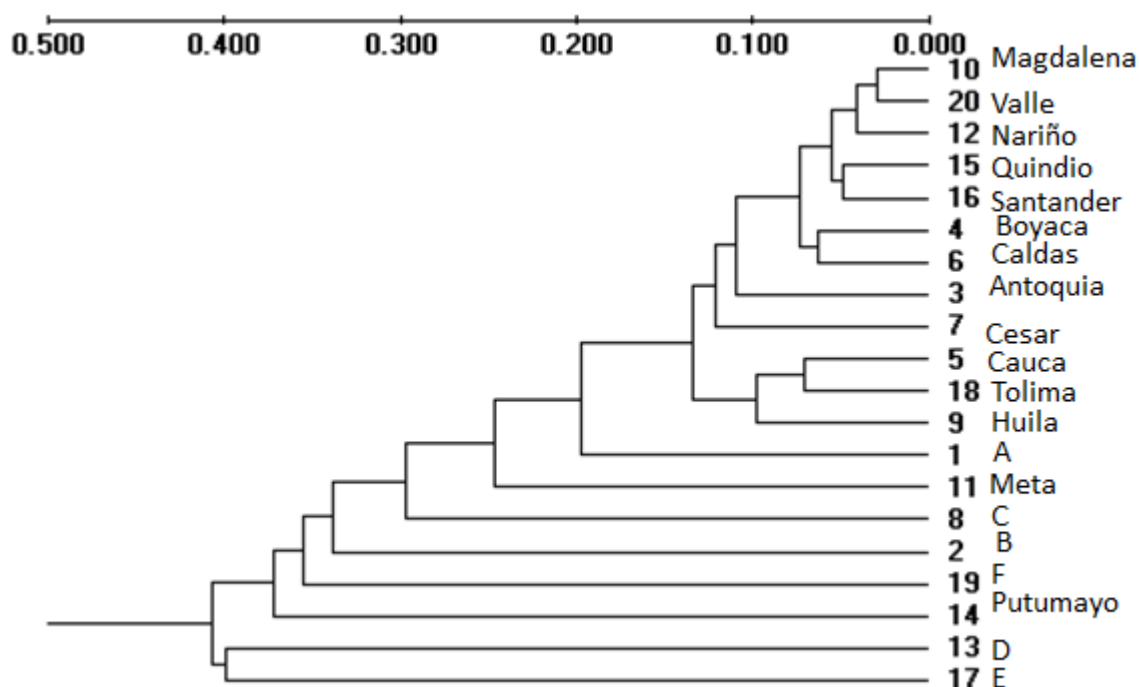


Figura 5. Dendrograma de distancia genética calculado con el índice de Nei (1978) construido con el método de UPGMA para los cuatro grupos formados.

Tabla 11. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de los grupos formados.

Nodo	Proporción de réplicas similares (1000 repeticiones)	No. De loci que soportan el nodo	% total de loci que soportan el nodo
1	84.20%	2	2.63
2	39.20%	2	2.63
3	35.10%	13	17.11
4	48.80%	1	1.32
5	50.30%	4	5.26
6	41.40%	0	0
7	18.40%	0	0
8	10.80%	0	0
9	48.20%	22	28.95
10	24.90%	0	0
11	63.90%	0	0
12	62.10%	0	0
13	52.50%	0	0
14	32.90%	0	0
15	12.70%	0	0
16	16.70%	0	0
17	30.00%	0	0
18	32.80%	7	9.21
19	100%	76	100

VI CONCLUSIONES

Se conoció la diversidad genética de 78 accesiones de la colección nacional de aguacate de la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias (CORPOICA), Palmira.

Se estandarizaron cuatro cebadores RAMs polimórficos para la especie (CT, CGA, CCA y CA); realizando un aporte a la diversidad lo que indica que estos cebadores son apropiados para su utilización en futuras investigaciones sobre la evaluación de la diversidad genética estructura poblacional de accesiones de aguacate.

El análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) para todas las accesiones de la colección mostro que hay grupos que se forman con muestras colectadas en sitios diferentes, lo que se puede observar es que existe una diferenciación entre grupos indicándolo así también el valor de FST que correspondió a 0.1733 (S.D= 0.0119; 1000 replicaciones).

La He insesgada de la colección total fue de 0.3263 y porcentaje de loci polimórfico de 93.4211% lo que revela un grado de diversidad en la colección y a su vez indica que estas presentan resistencia a cambios en su entorno.

El análisis mediante marcadores moleculares RAMs permitió detectar la variabilidad genética de las accesiones de la colección nacional de aguacate establecida por el CORPOICA que muestra 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.

VII RECOMENDACIONES

Para la extracción de ADN en aguacate es recomendable la utilización del protocolo de extracción Dellaporta *et al* (1983) para plantas con algunas modificaciones ya que la calidad de la amplificación es muy buena.

Para la preparación del coctel de PCR es importante tomar en cuenta la cantidad de muestras a tomar para dividir el total de las mismas entre dos y hacer dos cocteles y colocarlos en tubos eppendorf para que tengamos una buena cantidad y la preparación de este debe de hacerse bajo una cabina de flujo laminar y hacer una buena desinfección del lugar con etanol al 70% y luz ultravioleta.

Tomar todas las precauciones posibles al momento de utilizar el bromuro de etidio ya que es muy tóxico y debemos hacerlo bajo la cámara extractora de gases además con el fenol que es un agente corrosivo de olor penetrante.

Si en la PCR no tenemos amplificaciones hacer un lavado del ADN para quitar todo agente contaminante.

VIII BIBLIOGRAFÍA

ANACAFE (Asociación Nacional del Café). 2004. Cultivo de aguacate (*Persea americana mill*). (En línea). Consultado 23 Abril. 2011.

Bonilla M. L., Espinosa K., Posso A. M., Vasquez H., Muñoz J. E. 2008. Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. *Acta Agronómica* 57(2) 109-115.

CCI (Corporación Colombiana Internacional). 2009. Aguacate hass. (En línea). Colombia. Consultado 13 de mayo 2011.

Cerrato, IG. 2010. Caracterización molecular utilizando marcadores RAMs en la colección nacional de aguacate de CORPOICA, Colombia, fase II. Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Catacamas, Olancho. Universidad Nacional de Agricultura. pág.

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

Espinosa, L. 2005. Guía práctica sobre la técnica de PCR. (En línea). Consultado 07 mayo. 2011.

Lavaire, EL. 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. Catacamas, Olancho. Universidad Nacional de Agricultura. 55 pág.

Londoño, A. 2003. Ubicación del campus universitario. (En línea). Colombia. Consultado 13 abril. 2011.

Moreno, Y., Melgarejo, L. M., Hernández, M. S., Quintero, L., Vargas, G. 2004. Caracterización molecular de un banco de germoplasma del género *Theobroma* mediante la técnica RAPD. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4 (2): 15-24.

Morillo, AC; Morillo, YC; Muñoz, JE; Vásquez, HD; Zamorano, A. 2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp., de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. UNAL, Colombia. *Acta agronómica*. 15 pp.

Picca, A; Helguera, M; Salomón, N; Carrera, A. 2003??. Marcadores moleculares. (En línea). Consultado 07 mayo. 2011.

PROMOSTA (Proyecto de Modernización de los Servicios de Transferencia de Tecnología Agrícola); DICTA (Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria). 2005. Guía tecnológica de frutas y vegetales. (En línea). Honduras. Consultado 09 mayo 2011.

Posso, A. 2010. Diversidad genética de accesiones de nacedero *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees mediante RAM's (Random Amplified Microsatellites). Tesis de Grado para la obtención del título de Biólogo. Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia. 92pp.

Puldón, VP. 2006. Documentación, conservación y multiplicación de germoplasma. (En línea). Consultado 03 mayo. 2011.

Rueda, E., Muñoz, J. E., Saavedra, R., Palacio, J. D., Bravo, E. 2006. Caracterización molecular del banco de germoplasma de guayaba *Psidium* spp del centro de investigación Corpoica-Palmira. *Fitotécnica Colombiana* (6): 2-9

Sanabria, H; García, M; Muñoz, J; Díaz, H. 2006. Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium* guajava (guayaba) en el Valle del Cauca. UNAL, Colombia. *Acta agronómica*. 9 pp.

SEA (Secretaría de Estado de Agricultura)/ IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura)/ CNC (Consejo Nacional de Competitividad). 2007. Estudio de la cadena agroalimentaria de aguacate en la República Dominicana. (En línea). Consultado 20 de abril. 2011.

Valdes-Infante, J; Rodriguez, N. 2004. Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales. (En línea). Consultado 13 de mayo. 2011.

Vásquez, J. 1998. Recomendaciones técnicas para el cultivo de aguacate. (En línea). Consultado 01 abril. 2011.

Velasco, R. 2005. Marcadores moleculares y extracción de ADN. (En línea). Consultado 04 mayo. 2011.

IX Anexos

Anexo 1. Clasificación de los materiales de aguacate utilizadas en el establecimiento del banco de ADN.

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
1	QUINDIO 016	8	Quindio	Copa	Sep-21-2007		N10°27'664'' - W73°54'329''
2	VAPA 020	8	Valle	Copa	Sep-21-2007	Pueblo	N10-27.675 O73-54.332
3	CAPI 035	10	Cauca	Copa	Sep-21-2007	Arriba Pueblo	N10-27.652 O73-54.333
4	BOCA 021	8	Boyaca	Copa	Sep-21-2007	Santa Clara	N10-27.533 O73-54.449
5	MACI 019	11	Magdalena	Copa	Jul-10-2007	Escuela Sagrado Corazón	N11°05'29.9''-W074°04'85.1''
6	TOCHA 025	1	Tolima	Copa	Jul-11-2007	Sincinate	N11°06'36.9''-W074°05'32.7''
7	CANO 019	1	Caldas	Copa	Jul-12-2007	El Chaparral	N11°12'91.9'' - W074°02'30.6''
8	QUIAR	4	Quindio	Copa	Jul-12-2007		N11°12'90.7'' - W74°02'68.8''
9	CEPU 008	4	Cesar	Copa	Jul-12-2007		N11°12'81.9''-W74°02'65.2''
10	SASA 003	3	Santander	Copa	Jul-12-2007	San Vicente	N11°13'95.5'' - W74°02'00.1''
11	BOCA 018	6	Boyaca	Copa	Jul-10-2007	Santa Fe	N11°07'11.5'' - W074°07'13.4''
12	MELE 003	5	Meta	Copa	May-2-2007		N05°21'10.8''—

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
							W075°46'08.9"
13	NATU 003	2	Nariño	Copa	Jul-11-2007	Campano	
14	NACHA 004	8	Nariño	Copa	Jul-11-2007		N10°53'20.5" W074°06'26.9" -
15	BOCA 022	7	Boyaca	Copa	Jul-11-2007		N10°53'18.5" W074°06'26.8" -
16	VAPA 062	8	Valle	Copa	Jul-11-2007		N10°53'19.2" W074°06'25.9" -
17	MASA 032	3	Magdalena	Copa	Jul-11-2007	La Esperanza	N10°53'36.1"-W074°04'44.7"
18	NATU 009	3	Nariño	Copa	Jul-11-2007	Cañon Rojo	N10°53'23.0" W074°04'43.7" -
19	QUICO 015	2	Quindio	Copa	Jul-11-2007		N10°53'21.3" W074°04'43.3" -
20	SARI 022	5	Santander	Copa	Jul-11-2007		N10°53'21.9" W074°04'42.4" -
21	ANTU 012	5	Antioquia	Copa	Jul-11-2007	La Floresta	N10°53'10.2" W074°04'22.2" -

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
22	SARI 023	4	Santander	Copa	Jul-13-2007		N10°56'48.4" W074°07'30.7" -
23	MASA 031	7	Magdalena	Copa	Jul-13-2007	La Carolina	N10°56'47.9" W074°07'31.5" -
24	ANCA 010	8	Antioquia	Copa	Jul-13-2007		N11°07'19.1" W074°07'16.0" -
25	CAMA 001	7	Caldas	Copa	Jul-13-2007	La Maria	N10°56'53.7" W074°07'01.2" -
26	PERCAERUL	10	D	Copa	Jul-13-2007		N10°56'57.7" W074°07'10.9" -
27	CEVI 041	10	Cesar	Copa	Jul-13-2007	El Paraiso	N10°57'00.5" W074°07'10.9" -
28	MAFU 015	8	Magdalena	Copa	Jul-13-2007	Luces De Buenos Aires	N10°56'23.7" W074°07'41.1" -
29	CESU 002	6	Cesar	Copa	Jul-13-2007	Calle	N10°57'00.5" W074°07'10.9" -
30	QUIQUI 030	1	Quindio	Copa	Jul-12-2007		N10°27'54.9" W073°59'08.6" -

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
31	QUITE 020	5	Quindio	Copa	Jul-12-2007		N10°27'54,5'' - W073°58'06.3''
32	CARO 021	4	Cauca	Copa	Jul-12-2007		N10°27'51.3'' - W073°57'26.9''
33	TOAL 015	5	Tolima	Copa	Jul-11-2007		N10°53'34.8'' - W074°04'38.3''
34	NACHA 003	1	Nariño	Copa	May-3-2007		N 5°37'34.5''W74°51'50.2''
35	SALA 013	1	Santander	Copa	May-3-2007	La Antigua	N 5°37'34.1'' W 74°51'49.8''
36	TOAL 004	1	Tolima	Copa	May-3-2007	La Estrellita	N 5°36'38.9'' W 74°52'35.9''
37	HUAL 017	2	Huila	Copa	May-3-2007		N 5°37'34.5'' W 74°51'50.2''
38	VAPA 022	2	Valle	Copa	May-4-2007	Casa	N 5° 34'45'' W 74°53'32.1''
39	TACO 047	1	E	Copa	May-5-2007		N 5° 20'36.1'' W 74°54'20.2''
40	QUIPI 001	1	Quindio	Copa	May-4-2007	Las Virginias	N 5° 19'21.9'' W 74°51'41.1''

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
41	HUSU 004	2	Huila	Copa	May-3-2007	Trilladora Gomez	N05°2'56.5'' – W075°32'11''
42	TOIB 030	1	Tolima	Copa	May-2-2007	Alejandria	N05°20'17.9'' – W075°43'37.6''
43	VAPA 064	2	Valle	Copa	May-2-2007	Eros	N04°46'58.3'' – W075°41'59.3''
44	QUICO 006	2	Quindio	Copa	May-2-2007		N05°21'45.5'' – W075°44'52.9''
45	CASI 011	9	Cauca	Copa	May-2-2007		N05°21'44.6'' – W075°44'55.8''
46	CACAG 042	3	Cauca	Copa	May-1-2007	Villa Liliana	N04°44'10.9'' – W075°47'34.9''
47	QUICO	8	Quindio	Copa	May-2-2007	Suecia	N04°51'2.2'' – W075°48'8.4''
48	CASI 016	4	Cauca	Copa	May-2-2007		N05°21'43.9'' – W075°44'55.8''
49	VAPA 063	6	Valle	Copa	May-1-2007		N04°44'9.4'' – W075°47'35.8''
50	VABU 016	5	Valle	Copa	May-2-2007		N05°21'10.8'' – W075°46'08.9''

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
51	HUGA 011	7	Huila	Copa	Abr-18-2007	Casa	N02°37'37.3''– W076°34'35.4''
52	VASA 025	1	Valle	Copa	Abr-18-2007	Casa	N02°37'37.3''– W076°34'35.4''
53	CAVI 033	5	Caldas	Copa	Abr-18-2007	La Laguna	N02°37'04.2''– W076°35'5.78''
54	PUMO 001	7	Putumayo	Copa	Abr-19-2007	Estadero La Paradita	N02°08'23.7''– W076°57'04.6''
55	D7 1942	2	C	Copa	Abr-18-2007	La Cabaña	N02°37'37.3''– W076°34'35.4''
56	CAVI 030	7	Caldas	Copa	Abr-18-2007	Betania	N02°38'53.8''– W076°31'43.8''
57	NARIÑO 1	7	Nariño	Copa	Abr-18-2007		N02°38'53.8''– W076°31'43.8''
58	MASA 007	7	Magdalena	Copa	Abr-19-2007	El Bordo	N02°03'09.2''– W077°00'18.0''
59	SASA 005	3	Santander	Copa	Abr-18-2007	San Martin	N02°38'82.6''– W076°31'40.5''

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
60	TOAL 005	10	Tolima	Copa	Abr-19-2007	La Belleza	N02°031'50.3''– W076°55'47.5''
61	135 20	6	A	Copa	Abr-19-2008		N02°031'52.8''– W076°55'48.8''
62	NATU 010	6	Nariño	Copa	Abr-19-2007		N02°031'50.3''– W076°55'47.5''
63	MACI 025	6	Magdalena	Copa	Abr-19-2007		N02°03'50.7''– W076°55'44.6''
64	SALA 031	6	Santander	Copa	Abr-20-2007	Porvenir	N02°14'00''– W076°44'03.8''
65	NARIÑO 05	1	Nariño	Copa	Abr-20-2007	El Porvenir	N02°10'59.1''– W076°46'18.8''
66	135 24	4	A	Copa	Abr-20-2007	La Florida	N02°11'07.8''– W076°46'34.1''
67	MASI 018	6	Magdalena	Copa	Abr-20-2007	Bellavista	N02°18'31.6''– W076°42'28.4''
68	SACA 014	9	Santander	Copa	Abr-20-2009	San Gerardo	N02°18'35.6''– W076°41'48.9''
69	MASI 009		Magdalena	Copa			

No	Código de registro	No de especímenes	Departamento	Tipo de muestra (patrón, copa o semilla)	Fecha de colecta	Finca/ lugar	Coordenadas
70	VAPA 066	8	Valle	Copa	Abr-19-2007	Ciudadela los Puertos No. 2	N 3°52'40.6'' W 77°0'44.7''
71	NATU 008		Nariño				
72	SACA 014	1	Santander	Copa	Abr-19-2007	Urbano 2	N 3°53'19'' W 77°4'46.1''
73	SALA 013	3	Santander	Copa	Abril-20-2007	casa 5	
74	97 1315	2	B	Copa	Abr-20-2007	casa 4	N 3°52'52.8'' W 76°55'44.5''
75	MASI 005	5	Magdalena	Copa	Abr-19-2007		N 3°52'40.6'' W 77°0'44.9''
76	NATU 001	1	Nariño	Copa	Abr-19-2007	casa 1 calle del embudo	N 3°53'23'' W 77°4'49''
77	TU	6	F	Copa	Abril-20-2007	Escuela Jose Maria Cordoba	N 3°52'40,2'' W 76°55'58.5''
78	QUICO 009		Quindio				