



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias  
y de los Alimentos**

**TESIS:**

**Caracterización genotípica y fenotípica de guayabo  
(*Psidium guajava* L.)**

**Que para optar por el grado de maestro en ciencias  
agrícolas**

**PRESENTA:**

**BIÓLOGO JORGE MARTÍNEZ DE LARA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez**

**Dr. Alfonso de Luna Jiménez**

**Dr. José de Jesús Luna Ruiz**

**Dr. Antonio de Jesús Meraz Jiménez**

Jesús María, Aguascalientes, Junio de 2011.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias  
y de los Alimentos**

**TESIS:**

**Caracterización genotípica y fenotípica de guayabo  
(*Psidium guajava* L.)**

**Que para optar por el grado de maestro en ciencias  
agrícolas**

**PRESENTA:**

**BIÓLOGO JORGE MARTÍNEZ DE LARA**

El presente documento fue revisado, presentado, defendido y  
aprobado en el examen de grado correspondiente

**Dr. Alfonso de Luna Jiménez** \_\_\_\_\_

**Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez** \_\_\_\_\_

**Dr. José de Jesús Luna Ruiz** \_\_\_\_\_

**Dr. Antonio de Jesús Meraz Jiménez** \_\_\_\_\_

### VOTOS APROBATORIOS

OF. NO. CCA-D-111500-155-11

LIC. FRANCISCO JAVIER AVELAR GONZÁLEZ  
SECRETARIO GENERAL DE LA U.A.A.  
P R E S E N T E .

AT'N: C.P. MARIA ESTHER RANGEL JIMÉNEZ  
JEFA DEL DEPTO. DE CONTROL ESCOLAR

Por medio de la presente me permito informarle a Usted, que el C. JORGE MARTINEZ LARA, alumno del Programa del Posgrado en Ciencia y Tecnología Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria los requisitos académicos del programa y ha recibido la aprobación explícita de su tesis titulada "CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.)

Lo anterior es a fin de que el C. Jorge Martínez Lara pueda proseguir en los trámites correspondientes pertinentes a la obtención del grado académico respectivo.

Agradeciendo de antemano su atención al presente, me despido de usted, enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Jesús María, Ags., 25 de Mayo de 2011.

"SE LUMEN PROFERRE"

M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

*Stem fel  
26 mayo / 2011*

c.c.p. Control Escolar  
c.c.p. Secretario de Investigación y Posgrado  
c.c.p. Archivo  
GEPA/aba





SECRETARÍA  
DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA




M.C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E.

Por este medio manifiesto a usted que el **C. Jorge Martínez de Lara**, alumno del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.)**".

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi *voto aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, a los veinticuatro días del mes de **Mayo del año dos mil once**.

ATENTAMENTE



DR. NETZAHUALCOYOTL MAYEK PÉREZ  
TUTOR

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS


M.C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PRESENTE.

Por este medio manifiesto a usted que el estudiante Jorge Martínez de Lara, alumno del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada **CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.)**

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi *voto aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, a los veintisiete días del mes de **mayo del año dos mil once.**

ATENTAMENTE

  
Dr. Alfonso de Luna Jiménez  
TUTOR

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

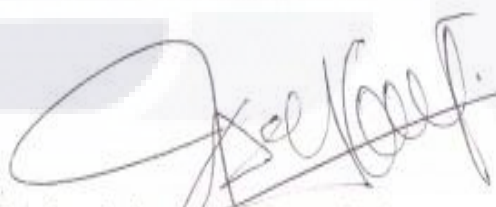
M.C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E.

Por este medio manifiesto a usted que el **Biol. Jorge Martínez de Lara**, alumno del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada "**Caracterización Genotípica y Fenotípica de Guayabo (*Psidium guajava* L.)**"

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi *voto aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, a los veintisiete días del mes de mayo del año 2011.

ATENTAMENTE



Dr. José de Jesús Luna Ruiz  
ASFSOR

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



M.C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E.

Por este medio manifiesto a usted que el **JORGE MARTÍNEZ DE LARA**, alumno del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada **CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.)**.

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi *voto aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, a los **veinticinco** días del mes de **mayo** del año **dos mil once**.

ATENTAMENTE

ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ  
INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

## AGRADECIMIENTOS

**Esta tesis fue realizada en el municipio de Calvillo, Aguascalientes y en las instalaciones del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), México; así como en las del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional en Reynosa, Tamaulipas, México.**

**El autor agradece el apoyo financiero a sus estudios de posgrado a la UAA, a través del proyecto Elaboración y utilización de composta para la producción orgánica de guayabo (*Psidium guajava L.*) en Calvillo, Ags. clave PIAG/RN08-3 del Dr. Alfonso de Luna-Jiménez, así como con el apoyo en infraestructura y planta física del CBG-IPN. También agradece el apoyo a los productores cooperantes en el proyecto.**

**Expreso mi agradecimiento a todas las personas involucradas en mi formación, como los maestros, compañeros y en especial a mi familia.**



## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Descripción botánica .....	4
2.2 Distribución e importancia en México .....	5
2.3 Diversidad genética. ....	6
2.4. Diversidad fenotípica y genotípica en guayabo .....	8
2.4.1. Análisis Morfológico.....	9
2.4.2. Análisis genético .....	11
2.4.3 Estudios moleculares de <i>P. guajava</i> L. en el mundo.....	15
3. OBJETIVO .....	16
4. HIPÓTESIS.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Ubicación y selección de huertas.....	18
5.2 Material vegetal.....	19
5.3 Caracterización fenotípica.....	20
5.4 Caracterización genética.....	21
5.4.1 Aislamiento de ADN en guayaba con el método CTAB modificado.....	22
5.4.2 Análisis AFLP.....	23
5.5 Análisis estadístico. ....	24
5.5.1 Datos morfológicos.....	24
5.5.2 Datos AFLP.....	24
6. RESULTADOS.....	26
6.1 Análisis fenotípico.....	26
6.2 Análisis AFLP.....	31
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES .....	45
9. REFERENCIAS.....	46
Glosario .....	55

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro 1	Ubicación de los huertos y algunas características agronómicas y de manejo en Calvillo, Aguascalientes.-----	19
Cuadro 2	Características morfológicas medidas en germoplasma de guayabo en Calvillo, Aguascalientes.-----	21
Cuadro 3	Resumen de las características morfológicas registradas de guayabo de 17 huertos de Calvillo, Aguascalientes.-----	26
Cuadro 4	Correlaciones de Pearson entre características cuantitativas medidas en guayabo.-----	27
Cuadro 5	Vectores característicos con mayor valor descriptivo en el ACP de los datos morfológicos registrados en 105 accesiones de guayabo en Calvillo, Ags.-----	28
Cuadro 6	Vectores característicos de variables de hoja y fruto medidas en germoplasma de guayabo en Calvillo, Ags.-----	29
Cuadro 7	Vectores con mayor nivel descriptivo de germoplasma de huertos de guayabo en Calvillo Ags.-----	30
Cuadro 8	Número y porcentaje de bandas polimórficas producidas con el análisis AFLP de 105 árboles de guayabo.-----	32
Cuadro 9	Índice de diversidad genética de germoplasma de guayabo.-----	33
Cuadro 10	Análisis de varianza molecular de germoplasma de <i>P. guajava</i> L. con base en marcadores moleculares AFLP.-----	36

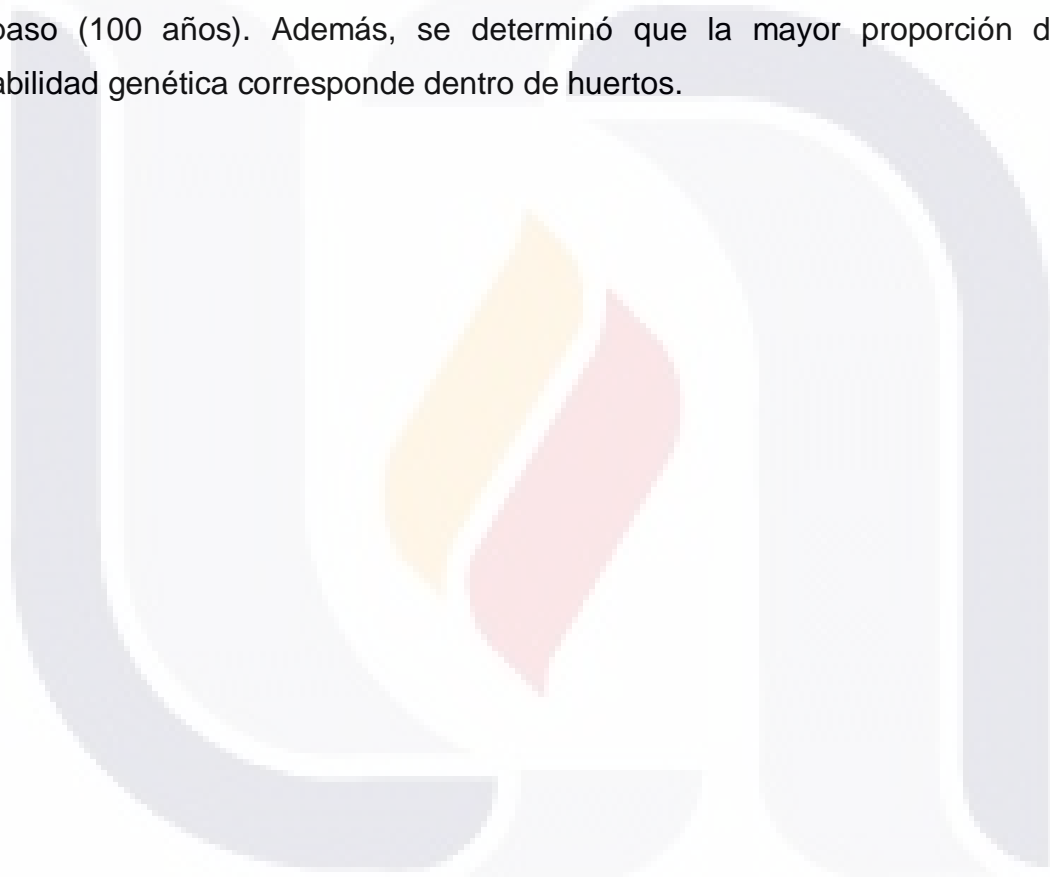
**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1	Localización de selección de los huertos y los sitios de colecta a partir de coordenadas terrestres.-----	20
Figura 2	Dispersión con base a los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales de las variables de frutos y hojas medidas en guayabo.-----	31
Figura 3	Dispersión con base a los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales de datos morfológicos de los huertos de guayabo.-----	34
Figura 4	Dendograma de las distancias euclidianas entre las siete características morfológicas más importantes medidas en huertos de guayabo de Calvillo, Ags.-----	34
Figura 5	Dendograma de distancia euclidianas con base en a datos AFLP´s de germoplasma de guayabo.-----	35
Figura 6	Análisis de coancestrías con enfoque Bayesiano con un valor de $K=2$ , $K=3$ , $K=4$ y $K=5$ de árboles de <i>P. guajava</i> L. con base en su origen geográfico.-----	37

## RESUMEN

El estudio de los recursos genéticos disponibles a una región agro-ecológica permite mejorar el conocimiento acerca de la disponibilidad, utilización, conservación y aprovechamiento de los mismos directamente o enfocados al mejoramiento genético. En este estudio se caracterizaron los patrones de diversidad genética de plantas de guayaba de 21 huertos distribuidos en la región de Calvillo, Aguascalientes, México con base en descriptores morfológicos (medidos sólo 17 huertas pues el resto no fructificó en el año de estudio) y genéticos (marcadores moleculares AFLP). El ACP de datos morfológicos explicó más del 82% del total de la variación observada en los cuatro primeros componentes principales y siete características fueron las más explicativas: peso, diámetro polar y diámetro ecuatorial del fruto; forma de fruto, color de peciolo, forma del ápice de la hoja y forma de hoja. El ACP definió cuatro grupos mayores de germoplasma; uno fueron árboles con frutos grandes y redondos con colores claros (amarillo, beige) del fruto y de su mesocarpio (Barranca del Roble, Malpaso, Cerro Blanco, Ojo de Agua, Jaltiche), pero con hojas más pequeñas, menos cordadas en la base y el ápice. Otro grupo se caracterizó por árboles con frutos grandes pero con forma tendiente a aplanada y con color externo y de pulpa rosa o naranja, así como hojas cordadas en la base y el ápice (Mesa Grande, El Rodeo). Un tercer grupo incluye guayabos con frutos pequeños y aplanados y hojas redondeadas (El Papantón, La Palma, Los Adobes, La Panadera). Finalmente, se ubican árboles con frutos pequeños y colores externo y de mesocarpio claro, así como hojas oblongas y pecíolos rojos (El Riego, La Loma, Las Parejas, Ojo Caliente, Mesa del Charcote, El Zapote). El análisis de conglomerados, si bien ratificó los agrupamientos de árboles obtenidos con el ACP también sugiere que, más que los tamaños del fruto, fueron los colores del fruto y del mesocarpio y la forma de las hojas las variables más discriminantes del germoplasma. El análisis AFLP amplificó 302 bandas, 89% polimórficas. El análisis de conglomerados de

datos genéticos mostró la formación de dos grupos principales. Un grupo incluyó guayabas de diez huertos y el otro nueve. Los huertos La Primavera y Mesa del Roble fueron genéticamente diferentes al resto. El análisis de la estructura genética de las poblaciones de guayaba con el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano ratificó en general el agrupamiento de huertos mostrado por el análisis de conglomerados. Un grupo de diez huertos parecen haberse originado de Mesa Grande (40 años) y el otro, que incluye árboles de huertos genéticamente más heterogéneos y que, parecen originarse de los huertos de Ojo Caliente y Malpaso (100 años). Además, se determinó que la mayor proporción de la variabilidad genética corresponde dentro de huertos.





## SUMMARY

The study of plant genetic resources available to any agro-ecological region improves our knowledge about availability, usefulness, conservation and exploitation for direct use or to use in plant breeding. In this work, we analyzed the genetic diversity patterns of guava trees from 21 orchards distributed through-out the region of Calvillo, Aguascalientes, México based on morphologic (measured in 17 orchards only, due the others not produced fruits during the year of study) and genetic (AFLP molecular markers) descriptors. The PCA analysis of morphologic data explained more than 82% of total variation with the major four principal components. Seven traits were the most explicative: weight, polar and equatorial fruit diameters; fruit shape, petiole color, and leaf apex shape and leaf shape. PCA defined four major groups of orchards. One group included trees with large-round fruits with clear colors of mesocarp and fruit (yellow, beige) (Barranca del Roble, Malpaso, Cerro Blanco, Ojo de Agua, Jaltiche) but small leaves and less cordate at base and apex. The second group included trees with large fruits but with pear shape as well as external and mesocarp pink or orange as well as cordate leaves (Mesa Grande, El Rodeo). The third group showed guava trees with small-pear fruits and round leaves (El Papantón, La Palma, Los Adobes, La Panadera). Finally, we found guava trees with small fruit and clear fruits as well as oblong leaves and red petioles at trees (El Riego, La Loma, Las Parejas, Ojo Caliente, Mesa del Charcote, El Zapote). Cluster analyses ratified PCA results and also suggest fruit and mesocarp colors and leaf size were more discriminative traits compared with fruit size traits. AFLP analysis amplified 302 bands, 89% were polymorphic. Cluster analysis of genetic data showed two major groups of guava trees. One included ten orchards and the other, nine. Orchards La Primavera and Mesa del Roble were genetically distinct to all others. The analysis of genetic structure of guava populations based on Bayesian way ratified orchard clustering

obtained with cluster analysis. One group of trees from ten orchards appear to be originated from the orchard of Mesa Grande (40 years-old) and the other group which includes the more genetically heterogeneous trees appeared to be originated from the orchards Ojo Caliente and Malpaso (100 years-old). In addition, the highest proportion of genetic variability was found within guava orchards.



## ABREVIATURAS

L=litro

$\mu$ L=microlitro

cm=centímetros

h=horas

A=Adenina

C=Citosina

G=Guanina

T=Timina

LN=Latitud norte

LO=Longitud Oeste

g=gramo

M=Molar

RAPD= ADN Polimórfico Amplificado al Azar

AFLP= Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

pmol= picomolar

PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa

AMOVA= Análisis de Varianza Molecular

ACP= Análisis de Componentes Principales

ADN= Acido Desoxirribonucleico

bp= pares de bases

dNTPs= mezcla de trifosfatos de desoxinucleotidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

EDTA= sal disódica del ácido etilendiaminotetraácetico

rpm= revoluciones por minuto

° C= grados Celsius

NaCl= Cloruro de sodio

SAGARPA= Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

INIFAP= Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

TEMED= N,N, N', N'-tetrametil-etilendiamino

TBE= tris/ácido bórico/sal disódica del ácido etilendiaminotetraácetico

TE= trizma-ácido clorhídrico/sal disódica del ácido etilendiaminotetraácetico

Tris-HCl= trizma/ácido clorhídricoUPGMA= Metodo de agrupamiento de pares no ponderados con media aritméticas

x= por

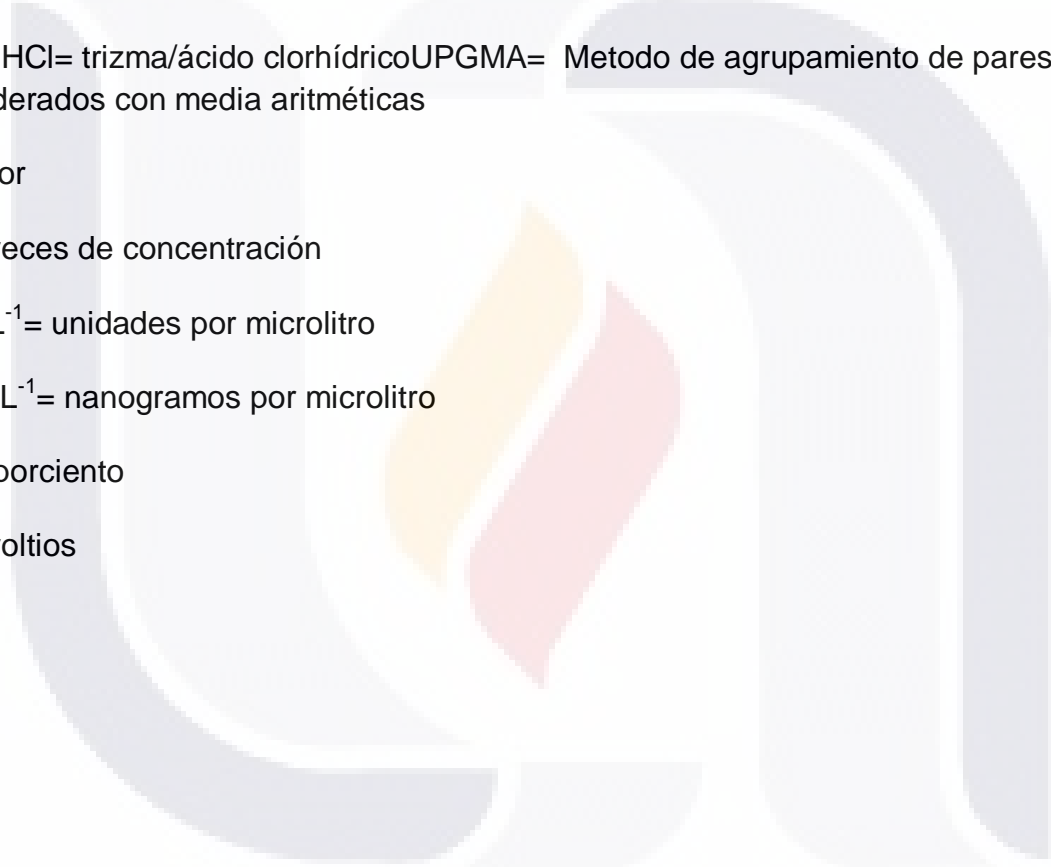
X= veces de concentración

U  $\mu\text{L}^{-1}$ = unidades por microlitro

ng  $\mu\text{L}^{-1}$ = nanogramos por microlitro

%= porciento

V= voltios



## 1. INTRODUCCIÓN

Las zonas productoras más importantes del país se localizan en los estados de Aguascalientes y Zacatecas, en donde se encuentra el área compacta más grande plantada con guayaba, conocida como “Calvillo-Cañones”, y la región guayabera del estado de Michoacán, con 10,757 y 9,788 ha respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2011).

Por su composición nutrimental la guayaba es una excelente fuente de vitamina C, ya que llega a tener de 200 hasta 400 mg 100 g<sup>-1</sup> de fruto fresco, superando a otras frutas como la naranja y la manzana (González *et al.*, 2002). Datos obtenidos en un grupo de selecciones de guayabo del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) indicaron variaciones en el contenido de vitamina C que varió de 202 a 485 mg 100 g<sup>-1</sup> de tejido fresco. Además, la guayaba contiene otras vitaminas como β-caroteno, niacina y vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> así como importantes minerales como calcio, magnesio, potasio, hierro y fósforo (Vasco *et al.*, 2003). Los frutos de guayabo tienen sabor agradable y son bastante apreciados para su consumo en fresco así como materia prima para la agroindustria de jugos, néctares, helados, jaleas y dulces.

A pesar de todo lo anteriormente indicado, el germoplasma de guayabo conservado en el mundo es aún escaso, lo que compromete sobremanera la sustentabilidad de su cultivo. América Latina y el Caribe son responsables de la conservación de aproximadamente 67% de los genotipos mantenidos en colecciones en el planeta y Brasil es el país que detenta el mayor número de accesiones (26%) de todo el germoplasma conservado *ex situ* en el mundo. Otros países como India, Costa Rica, Venezuela, Cuba, Puerto Rico también han



desarrollado acciones de conservación de la especie (Bettencourt *et al.*, 1992; Bezerra *et al.*, 1999; Ferreira, 1999; Knudsen, 2000). Y, para Hawaii, EUA, Neal (1965) indica que existen unas cuantas variedades reconocidas que difieren sólo en los frutos producidos: la guayaba 'limón' (kuawa-Lemi) de pulpa ácida de color rosa, kuawa momona que tiene mayor número de semillas y piel más gruesa, kuawa-ke'oke que es como la guayaba limón pero con pulpa de color blanquecino; así como los cultivares Beaumont (introducido en 1960) y Ka Hua Kula (identificado en 1972) (Shigeura y Bullock, 1983). Ambas variedades son de alto rendimiento, son de color rosa, son relativamente bajas en acidez, tienen un aroma agradable y sabor delicado y alto contenido de sólidos totales

La variación genética y morfológica presente en los huertos de guayabo de la región Calvillo-Cañones se atribuye a que el material genético utilizado en el establecimiento del huerto muy probablemente se originó de semilla o bien de hijuelos de raíz, lo que explica la variación soma-clonal. Primeramente es importante definir los conceptos de variación genética y variación somaclonal, los cuales se refieren respectivamente a la variación heredable que se transmite por vía sexual a la descendencia de plantas obtenidas a partir de cultivos de células y la variación genética observada en plantas que se han regenerado *in vitro*. Además, se puede presentar también variación epigenética, como resultado de un cambio en la expresión epigenética, misma que es reversible y no hereditaria (Pierik, 1990).

La posibilidad de experimentar variación somaclonal constituye una limitante de importancia en el uso de plantas propagadas por cultivo de tejidos, en donde pueden presentarse mutantes en un 2 % a un 50 % (Ortiz *et al.*, 1999). Entre las anomalías observadas en *Musa* spp se pueden encontrar: variaciones en la altura de la planta (enanismo y gigantismo), anomalías en las inflorescencias y frutos, variación en la pigmentación de las hojas y pseudotallos, filotaxia anormal y resistencia a *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*, entre otras (Arias, 1993). En un estudio realizado por Israeli *et al.* (1991) acerca de la variación somaclonal en plantas del Subgrupo Cavendish de banano cultivadas *in vitro* se observó que en

el cultivar Williams las variantes más comunes en orden decreciente fueron el enanismo, el mosaico, el pseudotallo rojizo y otras variantes menos frecuentes.

El uso de plantas con origen sexual ha producido la ampliación de la variabilidad genética del cultivo en la región. Ello repercute en la baja productividad y en la poca uniformidad en la calidad de los frutos (Martínez de Lara *et al.*, 2004). Por lo tanto, debemos considerar que la caracterización del germoplasma de guayabo en México potenciaría el aprovechamiento del recurso genético nacional para elevar paulatinamente la producción y productividad del cultivo dado que actualmente se dispone de cinco variedades cuyos frutos son apropiados para el consumo en fresco y la industria (Padilla, 2010); además de siete variedades con pulpa del fruto color salmón y una con pulpa blanca (Mondragón-Jacobo *et al.*, 2009); genotipos con características específicas para su explotación comercial generados en México. La posibilidad de ofrecer una gama de variedades de guayabo a los productores de este cultivo permitiría la diversificación de los mercados e, incluso, favorecer la producción de guayaba por regiones de acuerdo con sus preferencias tal como sucede con otras especies frutales como el duraznero y el manzano (Giancinti, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Descripción botánica

Los frutos de guayabo son bayas piriformes, globosas, esféricas, elipsoidales, ovaladas o cilíndricas, con un epicarpio de color amarillo, rosado, verdoso, amarillo-verdoso o amarillo claro en su madurez. En algunas variantes se distingue un tinte ligeramente rosado con textura rugosa o lisa. El mesocarpio y endocarpio va del color blanco al rojo y el fruto cuenta con gran cantidad de semillas pequeñas, redondeadas, triangulares y duras. El diámetro polar puede variar de 3 a 12 cm y el ecuatorial de 3 a 5 cm; la masa total del fruto puede oscilar entre 25 y 500 g (Mata y Rodríguez, 1990; Avilán, *et al.*, 1992; Hoyos, 1994).

El guayabo pertenece al reino vegetal, sub-reino Fanerógamas, clase Angiospermas, subclase Dicotiledónea, subdivisión Lignosae, orden Myrtales, familia Myrtaceae, género *Psidium*, especie *guajava* (Hutchinson, 1973; Samson, 1990 citado por García, 1997). La Familia Myrtaceae cuenta con alrededor de 80 géneros y cerca de 3,000 especies, en su mayoría árboles o arbustos distribuidos principalmente en los trópicos con dos centros de concentración: América tropical, donde predominan las especies con fruto tipo baya (Myrtoideae) y Australia, donde predominan las especies con fruto tipo capsular (Leptospermoideae) (Lawrence, 1951).

El género *Psidium* comprende 233 especies, cinco de las cuales se utilizan como frutales comestibles, entre ellas *P. guajava*, a la cual pertenecen los ecotipos de guayaba que se cultivan comercialmente. *P. guajava* es originaria de América tropical; probablemente del sur de México o Centroamérica; no obstante, se han

encontrado semillas en excavaciones realizadas en Perú. El centro de dispersión de la especie va desde México hasta Brasil, encontrándose en 50 países del trópico y subtropical (Lozano *et al.*, 2002). Dinesh e Iyer (2005) mencionan que De Candolle (1904) indicó que la guayaba es originaria de Brasil. Ortega *et al.* (2000) destacan la enorme trascendencia que tiene la región de Mesoamérica en el mundo como un centro primordial de origen y diversidad de muchas especies vegetales cultivadas actualmente, entre las que se encuentra el maíz, frijol, algodón, chile, jitomate, cacao calabaza, agave y nopal, entre otros y, además, menciona a la guayaba como un recurso fitogenético autóctono de México. La guayaba se distribuyó hacia Europa en el siglo XVI y posteriormente a Asia y la India donde se introdujo en el siglo XVII (Dinesh e Iyer, 2005).

## **2.2 Distribución e importancia en México**

Como ya fue mencionado anteriormente aunque se produce guayaba en casi todo México, las zonas productoras más importantes se localizan en los estados de Aguascalientes y Zacatecas, en donde se encuentra el área compacta más grande plantada con guayaba, conocida como “Calvillo-Cañones”, y la región guayabera del estado de Michoacán, formada principalmente por los municipios de Jungapeo, Benito Juárez y Zitácuaro (De Luna-Jiménez, 2003). El SIAP (2010) indica que la guayaba se cultiva en más de 19 mil hectáreas anuales y reporta que se produjeron más de 285 mil toneladas de guayaba; casi 290 mil en 2009 y se estimaron más de 292 mil para 2010. El cultivo de la guayaba representa un papel importante en la economía local de algunos municipios donde la fruticultura a pequeña escala es una actividad importante como son los casos de Abasolo y Silao, Guanajuato; Coatepec–Harinas. Estado de México y Talpa de Allende, Jalisco. En su forma silvestre, *P. guajava* se distribuye en todo el país (De Luna-Jimenez, 2003).

En Aguascalientes, el municipio de Calvillo tiene la mayor superficie dedicada a la producción de guayaba. En dicha región la especie se introdujo hace más de un

siglo y posteriormente se extendió hacia el Cañón de Juchipila, en el estado de Zacatecas aproximadamente 50 años después (Cortés, 1977).

México es el segundo mayor productor de guayaba en el mundo. Este cultivo es representativo de la temporada decembrina, toda vez que el 50 % de la producción nacional se cosecha entre los meses de septiembre y febrero; además, contiene vitaminas principalmente A, B y C que previenen enfermedades respiratorias en especial durante la temporada invernal.

### **2.3 Diversidad genética.**

Una de las tareas más importantes y difíciles que enfrentan los colectores de germoplasma vegetal es la definición de la estrategia de colecta más apropiada para una especie y región en particular. Como consecuencia, los colectores de plantas han muestreado y colectado accesiones que representan solo una fracción de la variación que ocurre en la naturaleza. La preocupación es definir un procedimiento de muestreo que incluya la máxima cantidad de variación genética útil en un número limitado y específico de muestras. La estrategia de muestreo debe tener en cuenta información taxonómica, geográfica y ecológica con el fin de maximizar la diversidad genética. Este proceso se define como una encuesta eco-geográfica porque toma en cuenta las características del clima y suelo que influyen en la variabilidad genética y, en última instancia, la frecuencia de alelos de una especie determinada (Maxted *et al.*, 1995).

La diversidad de los recursos fitogenéticos es fundamental para hacer frente a las condiciones cambiantes, pues la reducida base genética en los cultivos los hace más vulnerables a la aparición e incidencia de nuevas plagas y enfermedades, la introducción de microorganismos exóticos y los cambios ambientales. Por lo anterior es importante conservar una amplia base genética con la cual se pueda reducir el grado de vulnerabilidad de los recursos genéticos. En este sentido, la caracterización y evaluación de las colecciones de germoplasma proporcionan



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

información sobre el tipo de material genético conservado y su variabilidad, facilitando el aprovechamiento de los caracteres que representan algún beneficio. Con el fin de establecer más claramente la utilización conceptual de los términos diversidad y variabilidad genética, que son comúnmente usados de manera indistinta para representar la variación genética, Vilela-Morales y Candiera (1996) citados por Rojas (2003) sugieren que la diversidad indica la suma de la información genética potencial conocida o desconocida, mientras que la variabilidad se utiliza para indicar la porción de la diversidad colectada o disponible. Por lo anterior, el término de variabilidad genética es más apropiado para el estudio de colecciones de germoplasma.

La diversidad genética de guayabo en las poblaciones silvestres o criollas se atribuye principalmente a que esta especie se propaga fácilmente por semilla y que éstas pueden ser diseminadas por el hombre, aves y animales. Las variaciones en vigor, tamaño de planta, características de fruto (forma, tamaño, color de pulpa, número de semillas, sólidos solubles totales, etc.) en las plantas derivadas de semilla se deben a la polinización cruzada que ocurre en forma natural y que ocurre del 25 hasta el 41% de los casos (Morton, 1987).

Los trabajos de mejoramiento genético en otros países han permitido el aprovechamiento del germoplasma de alto potencial de rendimiento o bien para otros fines específicos (Nakasone *et al.*, 1976; 1978). La lista de variedades mejoradas de guayabo obtenido en varios países y reportados en la literatura rebasa los 50 (Zee, 1997; Padilla *et al.*, 2002). En México, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) inició a principios de 1980 trabajos de selección de germoplasma de guayabo en la región Calvillo-Cañones, dando origen al establecimiento de un banco de germoplasma que se encuentra localizado en Huanusco, Zacatecas. Durante los últimos años se han intensificado los trabajos para la caracterización de selecciones sobresalientes, logrando identificar un grupo de materiales que presenten alto potencial de rendimiento y fruto de buena calidad (Padilla *et al.*, 2002). Por su parte,

Mondragón-Jacobo (2009) reportaron para Guanajuato siete variedades con pulpa del fruto color salmón (23-1, 23-1, 26-8, 23-5, 25-5, 21-17, 22-11 y 25-9) y una con pulpa blanca (21-9). No obstante se considera de suma importancia ampliar la base genética mediante la colección *ex situ* y caracterización de germoplasma de otras regiones del país, con lo que se pueda incrementar y enriquecer la disponibilidad de materiales para su adecuada protección y aprovechamiento. En este sentido, en 2008 el INIFAP entregó cinco nuevas variedades y un porta-injerto de guayaba: Calvillo, S-XXI, Merita, Caxcana, Hidrozac y Huejucar, germoplasma cuyos frutos son apropiados para el consumo en fresco y la industria (Padilla, 2010).

#### **2.4. Diversidad fenotípica y genotípica en guayabo**

México es considerado centro de origen del guayabo (Hayes, 1960; Pepenoe, 1974; Mata y Rodríguez, 1990), por lo que presenta amplia variabilidad fenotípica (Lakshminarayana y Moreno, 1978; Perales y Silguero, 1995; Hernández-Delgado *et al.*, 2007). La variabilidad fenotípica se expresa en caracteres visibles que pueden ser de tres tipos: botánicos-taxonómicos (caracteres morfológicos que describen e identifican la especie, de alta heredabilidad y poca variabilidad); morfo-agronómicos (relevantes en la clasificación de las especies cultivadas, aceptable heredabilidad y son afectadas por el ambiente) y evolutivos (características cualitativas afectadas por el ambiente como la presencia de plagas, enfermedades, estrés a temperatura, agua, nutrimentos y otros). El otro tipo de variabilidad es la que no se expresa en características visibles y, para su identificación, se requieren técnicas especiales de laboratorio, tales como los marcadores moleculares de ADN (Hidalgo, 2003; Chávez, 2003).

En guayabo, se han hecho varias investigaciones que dan cuenta de la variabilidad expresada en caracteres visibles. Por su parte, esta debe mencionarse primero pues es la más antigua Perales y Silgueiro (1995) evaluaron la variabilidad morfológica de 17 genotipos de guayabo de Zacatecas y reportaron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

variabilidad en la forma, color de la epidermis y contenido de sólidos solubles totales de los frutos. Padilla-Ramírez *et al.* (2002) evaluaron doce selecciones de guayabo “Media China” y encontraron diferencias entre ellas las dimensiones de las hojas y frutos; sin embargo no obtuvieron diferencias estadísticas entre las selecciones estudiadas, lo que los condujo a la conclusión de que el guayabo “Media China” tiene una reducida variabilidad fenotípica. También Martínez-de Lara *et al.* (2004) observaron amplia variabilidad fenotípica de la planta de guayabo entre y dentro de árboles seleccionados de cada una de cuatro plantaciones estudiadas en Calvillo.

#### **2.4.1. Análisis Morfológico**

Los descriptores morfológicos permiten conocer al germoplasma y su utilidad potencial. Los descriptores deben ser específicos para cada especie, capaces de diferenciar genotipos y expresar el atributo de manera precisa y uniforme. Varios atributos pueden describir un material genético, pero los caracteres realmente útiles son aquellos que realmente pueden detectarse a simple vista y registrarse fácilmente; que tengan alta heredabilidad y alto valor taxonómico y agronómico; que se puedan aplicar a muestras pequeñas y que permitan diferenciar entre accesiones (Jaramillo y Baena 2000). La identificación de una variedad con base en el uso de marcadores fenotípicos es muy limitada, consume mucho tiempo y únicamente es visible en etapas vegetativas específicas del desarrollo de la planta, aunque algunos de dichos marcadores son altamente heredables y estables y, por tanto, pueden utilizarse en el registro de una variedad, especialmente si dicho análisis es extenso (Tatinemi *et al.*, 1996).

Los frutos, flores, semillas, hojas y árboles de guayabo son ampliamente variables entre y dentro de poblaciones (Avilán *et al.*, 1992; Hoyos, 1994; Mata y Rodríguez, 1990). Los agricultores han sometido las plantaciones a procesos de selección, y junto con las presiones selectivas impuestas por la heterogeneidad temporal o espacial de las condiciones de crecimiento, han generado las ‘variedades del

agricultor' que se han adaptado a las condiciones locales impuestas por el hombre y el ambiente físico (Frankel *et al.*, 1995; Koornneef *et al.*, 2001). Para la utilización y el aprovechamiento de dicha variabilidad se requiere del conocimiento detallado acerca de las características presentes en los materiales, con el fin de suplir las demandas futuras de producción de germoplasma mejorado (Medina *et al.*, 2001). Lo anterior se logra mediante procesos de caracterización de diversa índole que incluyen aspectos morfológicos, organolépticos, químicos, bioquímicos, moleculares, fisiológicos y/o citogenéticos (Lobo, 2004). El conocimiento de la variabilidad aprovechable inicia con la caracterización y evaluación morfológica. La primera corresponde a la toma de información cualitativa en forma sistemática y la segunda al registro de variables cuantitativas, mismas que son influenciadas por el ambiente (Medina *et al.*, 2001).

Tapia y Legaria (2007) analizaron los caracteres morfológicos de 17 genotipos de guayaba con base en tres componentes principales para explicar 81% de la variabilidad observada; características morfológicas de las hojas tales como longitud de peciolo de hoja chica y hoja grande, ángulo de la 3ª nervadura de hoja chica y hoja grande, ángulo de la 5ª nervadura de hoja chica y hoja grande, forma de hoja chica y hoja grande, curvatura de la sección transversal de hoja chica y de hoja grande permitieron identificar y discriminar genotipos. De manera similar Sánchez-Urdaneta *et al.* (2007) observaron diferencias significativas para la masa del fruto, mesocarpio y endocarpio, diámetro polar y ecuatorial del fruto, masa y número de semillas; también con los tres primeros CPs explicaron 100 % de la varianza en cuatro variantes de guayaba (Blanca, Criolla Roja, Cubana y Montalbán). Por su parte, Mondragón-Jacobo (2009) seleccionó, con base en criterios de elección de planta (productividad, vigor, fenología, tolerancia a *Pestalotiopsis psidii*, hábito de crecimiento y tolerancia a bajas temperaturas), fruto (color de pulpa, peso de fruto, calibre, forma y contenido de semilla) y químicos (acidez, contenido de azúcares, vitamina C y licopeno) en ocho selecciones de guayaba provenientes de una colección de 248 árboles originados de semillas de árboles de Brasil y México.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rodríguez *et al.* (2010) elaboraron descriptores ilustrados de guayaba en donde se incluyeron caracteres que son generalmente heredados de manera dominante y pueden ser fácilmente detectadas a simple vista. Por su parte, Fernandes-Santos *et al.* (2008) obtuvieron germoplasma silvestre de *Psidium* proveniente de varias regiones eco-geográficas en diez estados brasileños. Las 109 accesiones se caracterizaron con 40 descriptores de UPOV (1987) y encontraron diferencias para el número de venas en la hoja, largo y ancho de fruto, forma de la parte basal del fruto y color de pulpa del fruto. Aranguren *et al.* (2010a) conjuntaron el rango de variabilidad observada en el campo, tomando 100 muestras de tantas localizaciones como fuera posible, sobre todo en ambientes contrastantes en Venezuela. Las muestras fueron geo-referenciados y se clasificaron los ejemplares de *P. guajava* o de mirtáceas silvestres. Toda la información adicional de los especímenes se registró *in situ* de acuerdo con UPOV (1987) y se evaluaron 23 marcadores fenotípicos, 13 cualitativos y 10 cuantitativos. Los caracteres con más variabilidad fueron el color de tallos, de epidermis y pulpa; número de semillas; pH y contenido de azúcares.

#### **2.4.2. Análisis genético**

La utilización de los marcadores moleculares genéticos de ADN se fundamenta en su capacidad para la definición de especies dentro de grupos taxonómicos donde la información proporcionada por la morfología es ambigua; en la reconstrucción de filogenias; en estudios filogeográficos; en la evaluación de flujos genéticos y la estructura espacial de las poblaciones; así como en el estudio del estado genético de las poblaciones vía el análisis de la resistencia de éstas a agentes de presión de selección (García de León, 2001).

Las caracterizaciones morfo-agronómicas y bioquímicas no son suficientes para establecer diferencias entre especies o entre accesiones o bien para establecer con precisión la relación genética entre individuos, debido a que presenta



desventajas en la discriminación entre individuos estrechamente relacionados (Lavi *et al.*, 1989).

Un marcador molecular es cualquier fenotipo oriundo de la expresión de uno o varios genes o de segmentos específicos de ADN que pueden detectarse y monitorear su herencia. La variabilidad o polimorfismo de estos marcadores puede utilizarse en estudios de la diversidad genética de especies vegetales, ya que proporcionan datos útiles al fitomejorador para la selección de progenitores entre poblaciones básicas utilizadas en programas de mejoramiento genético (Franco e Hidalgo, 2003). El concepto de marcadores moleculares fue descrito por Botstein *et al.* (1980), quienes propusieron el uso de la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción para la detección de polimorfismos. Esta idea se basó en el hecho de que la mayoría de las poblaciones naturales tienen niveles relativamente altos de polimorfismos fenotípicos neutrales debido a cambios en las secuencias del ADN originados por las mutaciones puntuales, que pueden a su vez ocurrir por sustitución de bases, inserciones, deleciones y/o translocaciones.

Los primeros marcadores moleculares de ADN fueron los RFLPs (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), capaces de detectar cualquier mutación pequeña que afecte al sitio de restricción de una enzima o la región cercana al sitio, dando lugar a fragmentos de restricción de tamaños diversos en individuos diferentes. El uso de una sonda específica permite detectar los fragmentos mediante hibridación tipo Southern (Southern, 1975).

El surgimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, 1990) permitió el desarrollo de los marcadores moleculares basados en dicha técnica, tales como el ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Los RAPDs se basan en el uso de oligonucleótidos cortos para la iniciación de las reacciones de amplificación al azar por PCR. La presencia o ausencia de fragmentos amplificados en diferentes individuos discriminan entre ellos. La presencia o ausencia de fragmentos RAPD se deben a

mutaciones que ocurren y afectan regiones del ADN cercanas a los sitios de alineamiento de los iniciadores. En la mayoría de los casos esta técnica no distingue heterocigotos (Nuez y Carrillo, 2000).

A la fecha se ha mejorado las tecnologías de marcadores moleculares para la caracterización genética de plantas y otros organismos. La técnica AFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) conceptualmente es simple y combina las técnicas RFLP y RAPD. En el AFLP el ADN genómico primero es cortado con dos enzimas de restricción, una de corte raro (por ejemplo Eco RI) y otra de corte frecuente (por ejemplo MseI). Luego, los oligonucleótidos adaptadores son ligados a los extremos de estos fragmentos de restricción. Un adaptador es conjunto de nucleótidos de unión específica a los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas con la finalidad de ser empleado como base para la amplificación selectiva. Con la utilización de iniciadores correspondientes a los sitios de restricción EcoRI y MseI solamente aquellos fragmentos con el sitio EcoRI y MseI en uno de los extremos son primero amplificados por PCR. Esta amplificación inicial puede reducir el número total de fragmentos de restricción, mismos que son sometidos una amplificación selectiva utilizando iniciadores que corresponden a las secuencias del adaptador y al sitio de restricción, además de cero a cinco nucleótidos adicionales en el extremo 3´ extendiéndose hacia dentro de los fragmentos de restricción. La amplificación es selectiva porque un nucleótido selectivo de cada iniciador resultará en la amplificación de solo uno de 16 fragmentos, mientras que dos bases selectivas disminuirán el número a 1/256 fragmentos (Vos *et al.*, 1995). El paso final de la técnica AFLP es la generación y el análisis de las huellas genéticas. Para este propósito, los productos de reacción son marcados usualmente con radioactividad y luego se separan en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Después de la electroforesis, los geles se secan y exponen a películas de rayos X para visualizar las huellas AFLP. Lo anterior ocurre cuando utilizan radioisótopos para la detección, aunque en la actualidad existen otras técnicas para la visualización de los productos AFLP tales

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como el marcaje de iniciadores con digoxigenina (Osborn, 2000), fluorocromos (Remington *et al.*, 1998) o nitrato de plata (Bassam *et al.*, 1991).

Entre los estudios realizados en guayabo que documentan la variabilidad genética mediante el uso de marcadores moleculares están los trabajos de Prakash *et al.* (2002) quienes analizaron la diversidad molecular en cuatro genotipos de guayabo con marcadores RAPD y determinaron una distancia genética máxima del 54% y, además, a *P. guajava* y *P. quadrangularis* con una distancia mínima de 11% entre las selecciones SWY-1 y GR-1 de *P. guajava*, lo que se consideró como un nivel de variabilidad de bajo a moderado. Padilla-Ramírez *et al.* (2002) analizaron con RAPDs doce selecciones de guayabo tipo 'Media China' de México y observaron similitudes genéticas de 88 al 96% entre selecciones, lo que indicó la reducida variabilidad genotípica entre las plantas. Martínez-De Lara *et al.* (2004) analizaron 48 árboles de cuatro huertas de Calvillo con 15 oligonucleótidos RAPD y amplificaron 112 fragmentos, todos polimórficos. Por lo tanto no se observó agrupamiento definido de árboles con base a la huerta de origen.

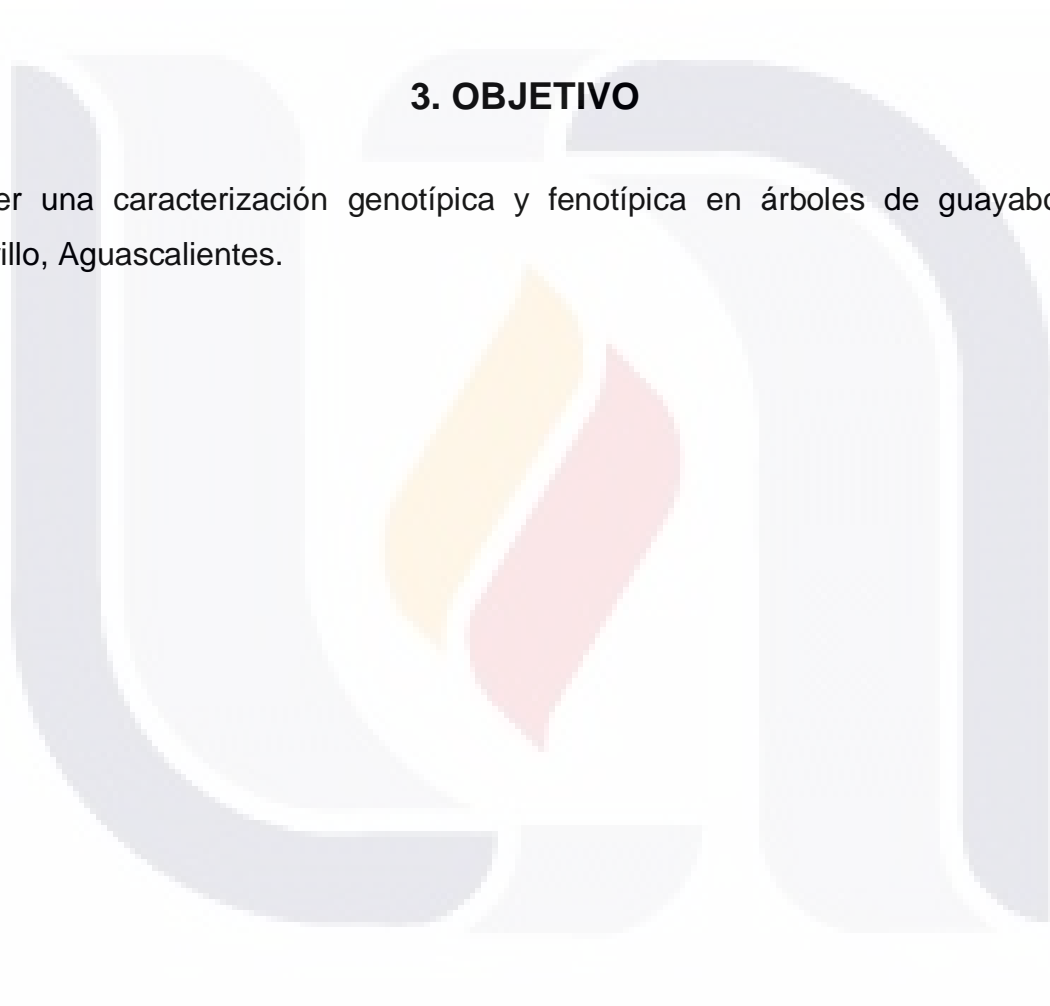
Por su parte, Domínguez *et al.* (2005) analizaron árboles de tres plantaciones de guayabo de Benito Juárez y Zitácuaro, Michoacán, México con marcadores moleculares RAPD y detectaron polimorfismo mayor de 95%. Tapia y Legaria (2007) evaluaron la diversidad genética en 17 cultivares de guayaba con 15 iniciadores RAPD, y amplificaron 226 bandas, 84% de ellas polimórficas. Sánchez-Teyer *et al.* (2010) evaluaron 68 accesiones de guayaba de doce estados de México con marcadores AFLP y generaron 335 bandas, 71% polimórficas. Finalmente, Hernández-Delgado *et al.* (2007) analizaron con AFLPs 48 accesiones de guayaba de la colección de germoplasma de la región Calvillo-Cañones y plantada en Huanusco Zacatecas, México así como accesiones de *P. cattleianum* y de *P. friedrichstbalianum* de Costa Rica como grupos externos. El análisis produjo 349 productos de amplificación, más del 90% de ellos polimórficos. El índice de diversidad genética fue de 0.58 en promedio.

### 2.4.3 Estudios moleculares de *P. guajava* L. en el mundo.

El análisis molecular del germoplasma de guayaba en el mundo ha sido intensamente desarrollado a últimas fechas, lo que denota la importancia científica y económica de la especie no sólo en México sino a nivel mundial. Por ejemplo, Valdes-Infante *et al.* (2010a) obtuvieron 37 accesiones de guayabo originarias de Cuba. Polinizaron abiertamente los genotipos N6, Roja Suprema, India Rosa y Roja Perú y obtuvieron las generaciones segregantes. Con 34 marcadores microsatelites (SSR) se amplificaron de tres a siete alelos por locus con un promedio de alelos putativos = 4.57. A su vez, Ritter *et al.* (2010) mapearon tres poblaciones de guayaba producidas por polinización controlada de tres árboles de la variedad Enana Roja Cubana como la madre y el polen de N6, Roja Suprema y Belic L-207. Sometieron a mapeo de QTLs las poblaciones y su relación con dieciséis características morfológicas de hoja y frutos, altura de planta y rendimiento. Por su parte, Lepitre *et al.* (2010) también mapearon con AFLP y SSR la progenie de 80 hermanos completos procedentes de la cruce entre Enana Roja Cubana (♀) y N6 (♂) y obtuvieron 1103 de marcadores segregantes AFLP. En adición, 171 loci generaron 258 fragmentos alélicos. Por su parte, Valdes-Infante *et al.* (2010b) compararon 23 accesiones de guayaba cultivadas en Cuba con marcadores SSR (100% de polimorfismo) y AFLP (38.4%). Aranguren *et al.* (2010) realizaron su estudio de SSRs en 31 genotipos de banco de germoplasma de guayaba y otras Myrtaceae en Mérida, Venezuela. Todas las muestras fueron evaluadas con 16 loci SSR, los cuales fueron todos 100% polimórficos. Risterucci *et al.* (2010) analizaron con SAT ('SSR Analysis Tool') germoplasma de guayaba, misma que es una aplicación web de fácil uso desarrollada para minimizar operaciones manuales tediosas y reducir errores, dado que facilita la integración, análisis y desplegando de secuencias de datos desde genotecas SSR enriquecidas. La técnica SAT se diseñó para eliminar vectores de clonación, adaptadores y secuencias de baja calidad y puede detectar quimeras o secuencias parcialmente digeridas; también, para la búsqueda de SSR motivos, las agrupaciones, montar secuencias y diseñar pares de cebadores SSR.

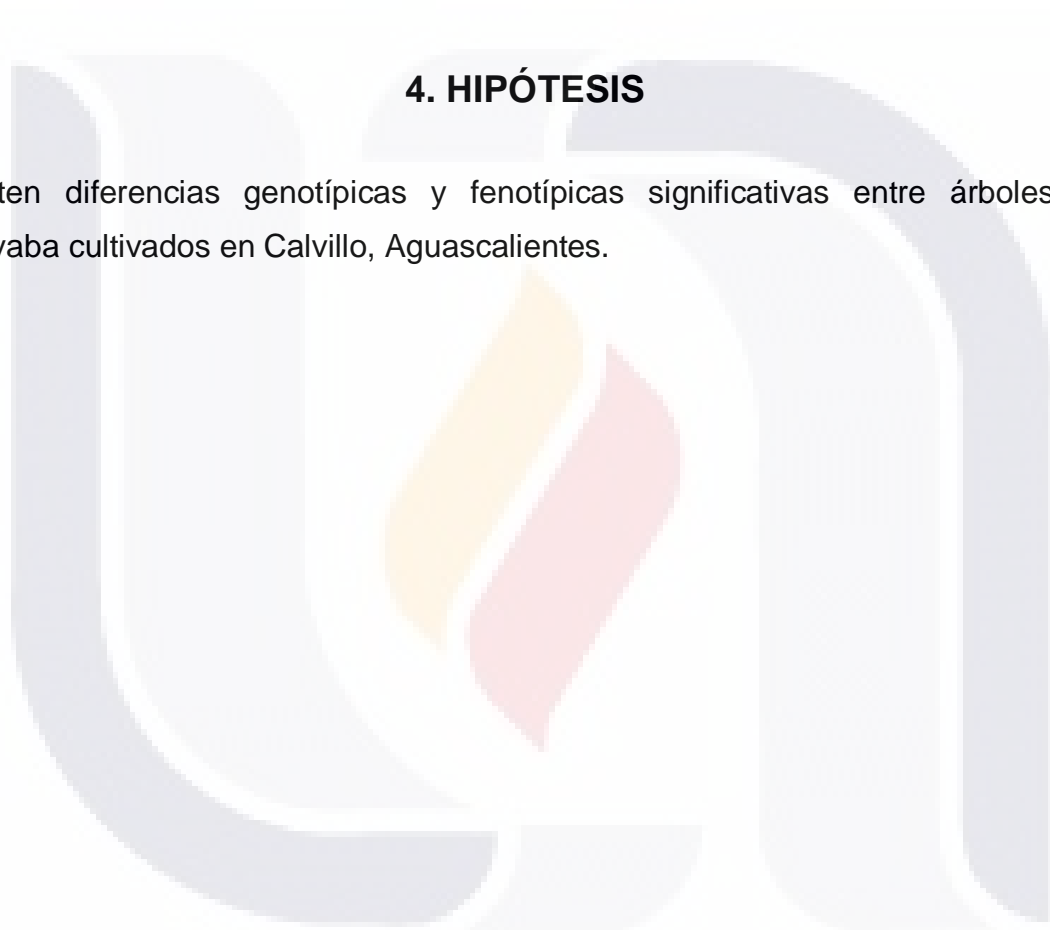
### **3. OBJETIVO**

Hacer una caracterización genotípica y fenotípica en árboles de guayabo de Calvillo, Aguascalientes.



#### **4. HIPÓTESIS**

Existen diferencias genotípicas y fenotípicas significativas entre árboles de guayaba cultivados en Calvillo, Aguascalientes.





## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Ubicación y selección de huertas.

El presente estudio se llevó a cabo en el municipio de Calvillo, Aguascalientes, México. La selección de los huertos se basó en los resultados de entrevistas personales entre los productores locales y donde se registraron datos sobre el manejo de los huertos y con una densidad de plantación de 204 árboles ha<sup>-1</sup>. Los huertos seleccionados se geo-referenciaron mediante el registro de sus coordenadas terrestres con un GPS 48 GARMIN. Una vez obtenidos dichos datos se utilizó el programa Arc View 3.2 ESRI para elaborar un mapa de posicionamiento global (Figura 1). Además, se utilizó el programa Internet Google Earth [[http://earth.goggle.com/intl/es\\_es/tips/v5/tip14.html](http://earth.goggle.com/intl/es_es/tips/v5/tip14.html)] para el rápido reconocimiento de la zona productora de guayaba (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicación de los huertos y algunas características agronómicas y de manejo en Calvillo, Aguascalientes.

Localidad	Propietario	LN	LO	Altitud (msnm)	Tipo de Poda	Deshierbe	Riego	Fuente de Agua	Edad (años)
El Zapote	MA	21° 58	102° 40	1824	severa	Mecánico	aspersión	presa	30
La Loma	RSu	21° 55	102° 41	1805	despunte	mecánico	aspersión	pozo	25
Mesa del Charcote	JC	21° 56	102° 42	1892	despunte	pastoreo	aspersión	pozo	30
La Primavera	SRa	21° 56	102° 41	1762	despunte	pastoreo	rodada	pozo	25
La Panadera	AV	21° 52	102° 41	1726	despunte	mecánico	aspersión	pozo	35
Las Parejas	AV	21° 52	102° 42	1690	despunte	mecánico	aspersión	pozo	30
Jaltiche	VP	21° 46	102° 47	1596	severa	mecánico	aspersión	pozo	25
Mesa de Roble	CL	21° 45	102° 45	1945	despunte	mecánico	rodado	presa	15
Cerro Blanco	PE	21° 50	102° 48	1689	severa	mecánico	rodado	presa	25
El Tepetate	SC	21° 47	102° 44	1703	severa	mecánico	rodado	presa	30
Ojo de Agua	JO	21° 47	102° 47	1659	severa	mecánico	aspersión	pozo	35
Los Adobes	PL	21° 49	102° 42	1810	severa	pastoreo	aspersión	pozo	30
El Rodeo	RL	21° 53	102° 45	1726	despunte	pastoreo	aspersión	presa	7
La Palma	GC	21° 51	102° 40	1698	severa	mecánico	aspersión	pozo	70
El Riego	GC	21° 50	102° 39	1784	severa	pastoreo	rodado	presa	70
Ojo Caliente	CR	21° 52	102° 39	1724	severa	mecánico	aspersión	pozo	60
Barranca del roble	GF	21° 46	102° 45	1705	despunte	pastoreo	aspersión	pozo	30
Las Cabras	FC	21° 49	102° 44	1712	severa	mecánico	aspersión	pozo	30
Mesa Grande	FR	21° 47	102° 43	1783	severa	mecánico	rodado	pozo	40
El Papanton	RM	21° 54	102° 43	1765	despunte	pastoreo	rodado	presa	45
Malpaso	MH	21° 51	102° 39	1710	despunte	mecánico	rodado	presa	100

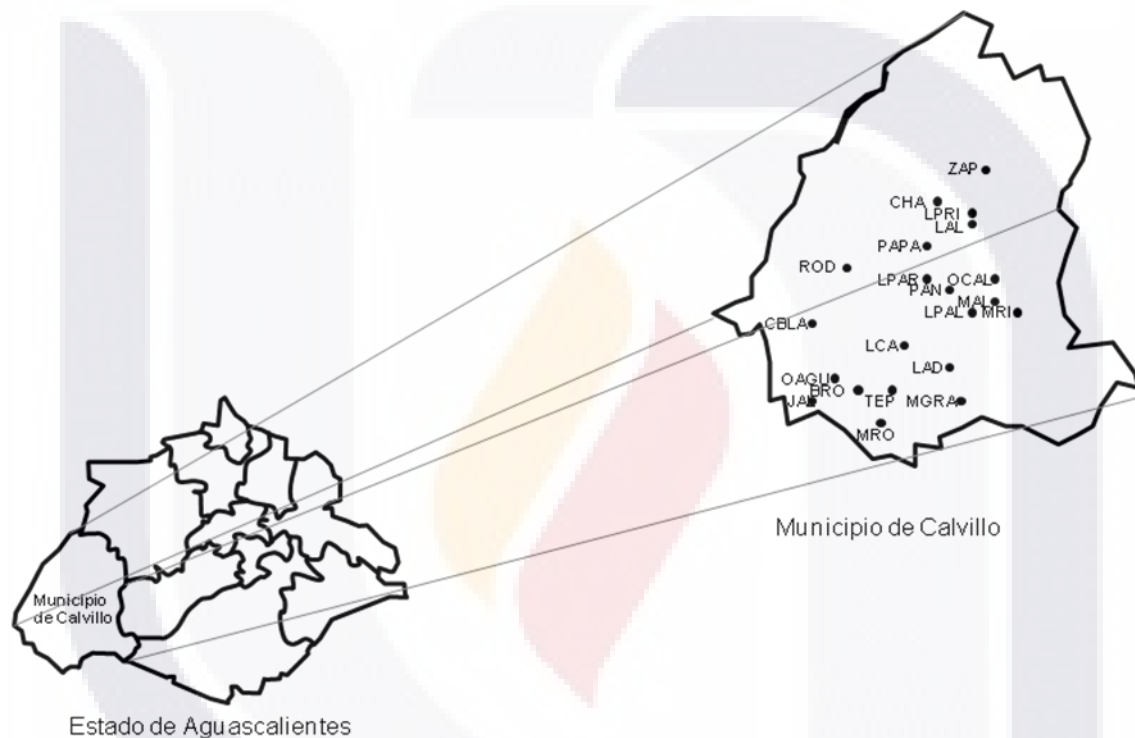
MA=Manuel Aranda, RSu=Rubén Sustaita, JC=Jesús Contreras, SRa=Sergio Ramírez, AV=Alejandro Velasco, VP=Vicente Pasillas, CL=Celebonio Lara, PE=Pedro Esparza, SC=Salvador Contreras, JO=Jesús Ortiz, PL=Pedro López, RL=Refugio López, GC=Gerardo Cardona, CR=Cesar Ruiz Loera, GF=Gildardo Frausto, FC=Francisco Calzada, FR=Fernando Román, RM=Rodolfo Macías, MH=María del Refugio Hernández.

## 5.2 Material vegetal.

Para este estudio se seleccionaron 21 huertos de cada uno de los cuales se identificaron cinco árboles por medio del uso de una tabla de números aleatorios y que resultaran menores o iguales a 204, dado que este es el número de árboles sembrados en una hectárea con una densidad de plantación de 7 x 7 m. En total se seleccionaron 105 árboles para el estudio (Cuadro 1).

### 5.3 Caracterización fenotípica.

De los 21 huertos sólo se pudieron caracterizar 17 con el uso de los descriptores UPOV (1987) para guayaba y cartas de colorimetría Kollmorgen (1977). Los árboles de los huertos no analizados no produjeron frutos durante el año de estudio. De noviembre de 2009 a enero de 2010, en los cinco árboles de cada huerto se registraron 15 características morfológicas, diez del fruto y seis de hoja.



**Figura 1.** Localización de selección de los huertos y los sitios de colecta a partir de coordenadas terrestres. MRO=Mesa del Roble, LPRI=La Primavera, PAN=La Panadera, LPAL=La Palma, MRI=El Riego, CHA=Mesa del Charcote, OCAL=Ojo Caliente, LPAR=Las Parejas, ROD=El Rodeo, LAL=La Loma, MAL=Malpaso, PAPA=El Papanton, ZAP=El Zapote, LAD=Los Adobes, LCA=Las Cabras, MGRA=Mesa Grande, CBLA=Cerro Blanco, TEP=El Tepetate, BRO=Barranca del Roble, JAL=Jaltiche, OAGU=Ojo de Agua.

Para ello se consideraron por árbol 20 frutos en etapa de madurez fisiológica, que se distingue por el cambio de color verde-amarillo a amarillo en el fruto. Los frutos

se pesaron individualmente; se midió el diámetro ecuatorial, diámetro polar y diámetro cavidad del cáliz, así como el color del mesocarpio o ‘casco’. También, se determinó la forma, color y textura del fruto, así como el color de la pulpa de acuerdo con UPOV (1987). Igualmente, de cada uno de los 105 árboles se tomaron 20 hojas maduras a las que se midió largo y ancho, así como la forma de la hoja, de la base de la hoja y de su ápice y, finalmente, el color del pecíolo (UPOV, 1987). Las escalas de medición de las variables medidas antes indicadas se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas medidas en germoplasma de guayabo en Calvillo, Aguascalientes.

Características	Escala
Forma de fruto	Redondo=1, Ovalado=2 y Aperado=3. <sup>&amp;</sup>
Color de fruto	Verde claro=1, Amarillo claro=2, Amarillo oscuro=3, Verde naranja=4, Naranja oscuro=6 y Rojo=7. <sup>§</sup>
Color de pulpa	Blanco=1, Crema=2, Rosa claro=3, Rosa=4, Rosa fuerte=5, Naranja claro=6 y Naranja=7. <sup>§</sup>
Peso de fruto	Gramos
Diámetro polar	Centímetros
Diámetro ecuatorial	Centímetros
Grosor del mesocarpio	Centímetros
Diámetro de cáliz	Centímetros
Textura del fruto	Lisa=1, Rugosa=2 y Desigual=3. <sup>&amp;</sup>
Color de pecíolo	Verde=1, Amarillo=2, Rojo=3 y Rojo oscuro=4. <sup>§</sup>
Forma de hoja	Redonda=1, Ovada=2, Oblonga-ovalada=3, Lanceolada=4, Oblonga-lanceolada=5 y Oblonga=6. <sup>&amp;</sup>
Forma base de hoja	Obtusa=1, Redonda=2 y Cordada=3. <sup>&amp;</sup>
Forma ápice de hoja	Aristado=1, Acuminado=2, Agudo=3; Redondo=4 y Cordado=5. <sup>&amp;</sup>
Largo de hoja	Centímetros
Ancho de hoja	Centímetros

<sup>&</sup> (UPOV, 1987).

<sup>§</sup> (Kollmorgen, 1977).

#### 5.4 Caracterización genética.

La análisis genético se realizó a partir de diez hojas jóvenes y sanas, colectadas por cada árbol mismas que se conservaron a -70° C hasta que se aisló el ADN con el método CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) modificado para guayabo por

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Esparza *et al.* (2000). En el estudio se utilizaron las enzimas EcoRI y MseI (New England Biolabs® Inc., Beverly, MA, EUA) y la técnica utilizada fue la de los marcadores moleculares AFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) (Vos *et al.*, 1995).

#### **5.4.1 Aislamiento de ADN en guayaba con el método CTAB modificado.**

Un gramo de tejido foliar joven se pesó y se molió hasta obtener una consistencia de talco en mortero y con pistilo y nitrógeno líquido (-196 °C). El tejido molido se pasó a un tubo 'sorrall' de 50 mL y se agregó 10 mL de buffer de extracción estéril (CTAB 2%, NaCl 5M 1.4M, EDTA pH 8 0.5M 20mM, Tris HCl pH 8 1M 100 mM, y β-Mercaptoetanol 0.3% y agua desionizada milli Q). La mezcla se incubó en baño maría durante 10 min a 65° C agitado constantemente y las muestras reposaron a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se agregó un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) y se agitó en vortex por 2 min; se centrifugó a 12.000 rpm por 12 min a 10° C. Luego, el sobrenadante se pasó a un tubo sorvall limpio para precipitar los ácidos nucleicos con 0.5 vol de NaCl 5 M y 1 vol de isopropanol a -20° C durante 2 h Los ácidos nucleicos se recuperaron al centrifugar las muestras a 13,000 rpm por 15 min a 10° C y su posterior decantación. La pastilla resultante se lavó con 600 µL de etanol al 70 % y luego se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL con micropipeta y se re-suspendió en 300 µL de agua desionizada milli Q estéril. Finalmente, se agregaron 15 µL de RNAsa. La mezcla se incubó a 37° C por 40 min La extracción del ADN se llevó a cabo con 400 µL de fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1 y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. La fase acuosa se recuperó y precipitó con 200 µL de acetato de amonio 7.5 M más 2 vol de etanol absoluto durante 1 h a -20° C. La pastilla se recuperó centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min y desechando el sobrenadante. La pastilla resultante se lavó con 300 µL de etanol 70 % por 10 min. La pastilla se re-suspendió en 30 µL de TE 1X estéril. La calidad y cantidad del ADN obtenido se estimó en gel de agarosa al 0.8 %. Las muestras se tiñeron con 3 µL de Orange G (Sigma, EUA y 1 µL de SyBR Gold (MoBiTec, Göttingen, Germany) se sometieron a electroforesis a

80 V por 1 h. Las muestras de ADN se visualizaron con luz ultravioleta y la ayuda de un trasiluminador (Gel Doc EQ, BIO-RAD Laboratories-Segrate Milan, Italy).

#### 5.4.2 Análisis AFLP.

La digestión del ADN consistió en una mezcla de reacción de 20  $\mu\text{L}$  constituida por 1  $\mu\text{L}$  de ADN 200  $\text{ng mL}^{-1}$ , 3  $\mu\text{L}$  de endonucleasa EcoRI (New England Biolabs® Inc., Beverly, MA EUA); 1  $\mu\text{L}$  de MseI (New England Biolabs® Inc., Beverly, MA EUA); 2  $\mu\text{L}$  de Buffer 2, 0.5  $\mu\text{L}$  de BSA (Bovine Serum Albumin), 12.5  $\mu\text{L}$  de agua mili Q. Las muestras se incubaron en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, versión 3.03, C. T. EUA) a 37°C por 3 h 30 min. La mezcla se dejó a 4°C hasta la ligación de los adaptadores. La secuencia del adaptador EcoRI fue 5'-CTCGATGACTGCGTACC-3'/3'-CTGACGCATGGTTTAA-5' y la del adaptador MseI fue 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTAAT-5'. Al ADN digerido se adicionó la mezcla de ligación que incluía 1  $\mu\text{L}$  del adaptador EcoRI (5 pmol), 1  $\mu\text{L}$  del adaptador MseI (1 pmol), 1.2  $\mu\text{L}$  de ATP 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de buffer 2, 0.4  $\mu\text{L}$  de T<sub>4</sub> DNA ligasa (Roche) (1 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y 0.9  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura Promega™ en un volumen total de 5  $\mu\text{L}$ . La ligación se llevó a cabo en termociclador a 20°C por 2 h. La mezcla de reacción para pre-amplificación incluyó 4  $\mu\text{L}$  de la mezcla de ligación, 1.5  $\mu\text{L}$  de los oligonucleótidos EcoRI+A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') (50  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) y 1.5  $\mu\text{L}$  MseI+A (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3') (50  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs 10 mM, 8  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 5X, 2  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura y 0.2  $\mu\text{L}$  de enzima Taq DNA polimerasa (Roche) (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) en un volumen total de 40  $\mu\text{L}$ . La mezcla se sometió a PCR con el siguiente programa: 94°C por 30 s; 56°C por 60 s y 72°C por 60 s durante 20 ciclos. Doce combinaciones de oligonucleótidos selectivos EcoRI+3 (5'-GACTGCGTACCAATTC/NN-3'), marcado con fluorescencia IRDye™ -800 y MseI+3 (5'-GATGAGTCCTGAGTAA/NNN-3') se amplificaron en seis muestras de ADN seleccionadas al azar. De aquellas, se seleccionaron las cuatro con mayor número de bandas amplificadas y de polimorfismos producidos. Entonces se



procedió de la siguiente forma: la mezcla se preparó combinando 0.65  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido EcoRI+3 y 0.4  $\mu\text{L}$  de MseI+3 ambos con 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de concentración se tomaron 6  $\mu\text{L}$  del ADN pre-amplificado, 0.4  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 2.4  $\mu\text{L}$  de Buffer 5X, 1.3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0.55  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura y 0.1  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) con un volumen final de 12  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de PCR: 94° C por 30 s, 56° C por 30 s y 72° C por 60 s durante seis ciclos continuando con 94° C por 30 s, 56° C por 30 s y 72° C por 60 s durante 23 ciclos. Las muestras amplificadas se almacenaron a -20° C hasta su uso. La mezcla a utilizarse en la separación de los fragmentos amplificados se diluyó 1:15 en TE 0.1X y luego se tomaron 6  $\mu\text{L}$  de la dilución y 4  $\mu\text{L}$  de colorante y se desnaturalizaron a 94° C por 4 min. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo. El gel de poliacrilamida al 6 % se preparó mezclando 25 mL de acrilamida, 230  $\mu\text{L}$  de PSA 10% (Persulfato Amónico) y 23  $\mu\text{L}$  de TEMED® 99%. La separación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en un sistema de secuenciación automática IR2 (modelo 4200-02G: LICOR®, Lincoln, NE, EUA).

## **5.5 Análisis estadístico.**

### **5.5.1 Datos morfológicos.**

Las variables cuantitativas se sometieron al análisis de componentes principales (ACP) para identificar las variables que mejor explican la variación morfológica de *P. guajava*. Posteriormente, se realizó el análisis de conglomerados que incluyó sólo las características más explicativas de acuerdo con el ACP y se construyó un dendrograma con base en el algoritmo UPGMA y las distancias euclidianas. El análisis estadístico de datos morfológicos se llevó a cabo con el programa STATGRAPHICS Centurión XV (Statpoint, 2006).

### **5.5.2 Datos AFLP.**



Los geles se leyeron visualmente; se cuantificó el número de productos de amplificación generados en cada muestra y se asignó un número de acuerdo con su migración en el gel. A la banda con el peso molecular mayor en cada combinación se le asignó el número uno y así sucesivamente hasta la banda con menor peso. Se asumió que las bandas con el mismo peso molecular en individuos diferentes eran idénticas. Para cada individuo la presencia o ausencia de cada banda se determinó designando la presencia con 1 y la ausencia con 0. Con los ceros y unos se construyeron matrices binarias que se utilizaron para estimar los coeficientes de similitud (Nei y Li, 1979) y las distancias genéticas entre genotipos, mismas que a su vez se utilizaron para producir dendrogramas por el método UPGMA (Nei y Dice, 1979) con el programa Free Tree 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001). La estructura genética de poblaciones se determinó con el programa STRUCTURE versión 2.3.3 considerando valores  $K$  de 2 a 5 y un modelo genético de mezcla. Las cuatro corridas independientes se llevaron a cabo considerando en cada caso 30,000 repeticiones de Cadenas de Markov-Monte Carlo (CMMC) y 300,000 períodos de 'rodaje' ('burn-in periods') (Pritchard *et al.*, 2000). Para calcular la tasa global de asignación los individuos se asignaron arbitrariamente a un conglomerado genético cuando su proporción de ascendencia en dicho conglomerado fue mayor a 0.8. También se estimaron los niveles de diversidad genética con base en el índice de Powell *et al.* (1996) entre poblaciones o huertos mediante el cálculo de los porcentajes de *loci* polimórficos. Por último, la matriz de similaridad genética se usó en el desarrollo del análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 1997). Se analizaron las jerarquías entre y dentro de los huertos.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Análisis fenotípico.

El análisis fenotípico incluyó tanto variables cualitativas como cuantitativas. De los 15 caracteres morfológicos ocho fueron cualitativos, mismos que presentaron tres o más clases fenotípicas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de las características morfológicas registradas de guayabo de 17 huertos de Calvillo, Aguascalientes.

Característica	Clases <sup>1</sup>
	Fruto
Forma	1(7), 2(56), 3(11)
Color	1(9), 3(54), 5(1), 7(10)
Color Pulpa	1(27), 2(10), 3(2), 4(2), 5(26), 6(4), 7(3)
Textura	1(23), 2(50), 3(1)
	Hoja
Forma	2(12), 3(29), 4(37), 5(1), 6(1)
Forma de Base	2(4), 3(15), 4(61)
Forma de Ápice	1(43), 2(36), 3(3)
Color de Pecíolo	1(38), 2(10), 3(36)

<sup>1</sup>Los números entre paréntesis indican el número de genotipos observados en cada clase. Los valores de clase son los descritos en el Cuadro 2.

Entre las características cuantitativas medidas se observaron asociaciones estadísticas entre pares de variables altamente significativas, no para el caso del par de variables Diámetro de Cáliz y Largo de Hoja (Cuadro 4).

Cuadro 4. Correlaciones de Pearson entre características cuantitativas medidas en guayabo.

	Grosor del Mesocarpio	Diámetro Ecuatorial	Largo de Hoja	Peso de Fruto	Diámetro Polar
Diámetro de Cáliz	0.64 **	0.86 **	0.39 NS	0.81 **	0.84 **
Grosor del Mesocarpio		0.86 **	0.62 **	0.90 **	0.88 **
Diámetro Ecuatorial	0.86 0.00		0.59 **	0.92 **	0.90 **
Largo de Hoja	0.62 0.01	0.59 0.01		0.70 **	0.69 **
Peso de Fruto	0.90 0.00	0.92 0.00	0.70 0.00		0.96 **

\*\*Altamente significativo, \*Significativo, NS No significativo

El ACP de los datos morfológicos explicó más del 50% del total de la variación observada en los dos primeros componentes principales obtenidos, mientras que primeros cuatro componentes principales explicaron poco más del 82% (Cuadro 5). Siete características fueron las más importantes, tres cuantitativas (peso, diámetro polar y diámetro ecuatorial del fruto) y cuatro cualitativas (forma de fruto, color de peciolo, forma del ápice de la hoja y forma de hoja) (Cuadro 6). Se construyó una gráfica de dispersión bi-dimensional con cuatro cuadrantes con base en los vectores característicos de los dos primeros componentes principales del ACP cinco variables (peso, grosor del casco, diámetro polar, diámetro ecuatorial y forma de fruto) se agruparon juntas (Fig. 2). El ACP en el análisis de los datos por huertos se puede observar que los cinco huertos más importantes fueron El Zapote, El Papanton, Barranca del Roble, El Rodeo y Mesa del Charcote. Al realizar la gráfica de cuadrantes se observó que El Zapote es el huerto con los frutos de mayor tamaño, caso contrario fue El Papanton con los frutos más pequeños (Cuadro 7).

Cuadro 5. Vectores característicos con mayor valor descriptivo en el ACP de los datos morfológicos registrados en 105 accesiones de guayabo.

Componente Principal	Valor característico	Porcentaje de varianza explicada	Porcentaje acumulado
1	6.40	42.69	42.69
2	2.96	19.74	62.43
3	1.82	12.14	74.57
4	1.13	7.53	82.10

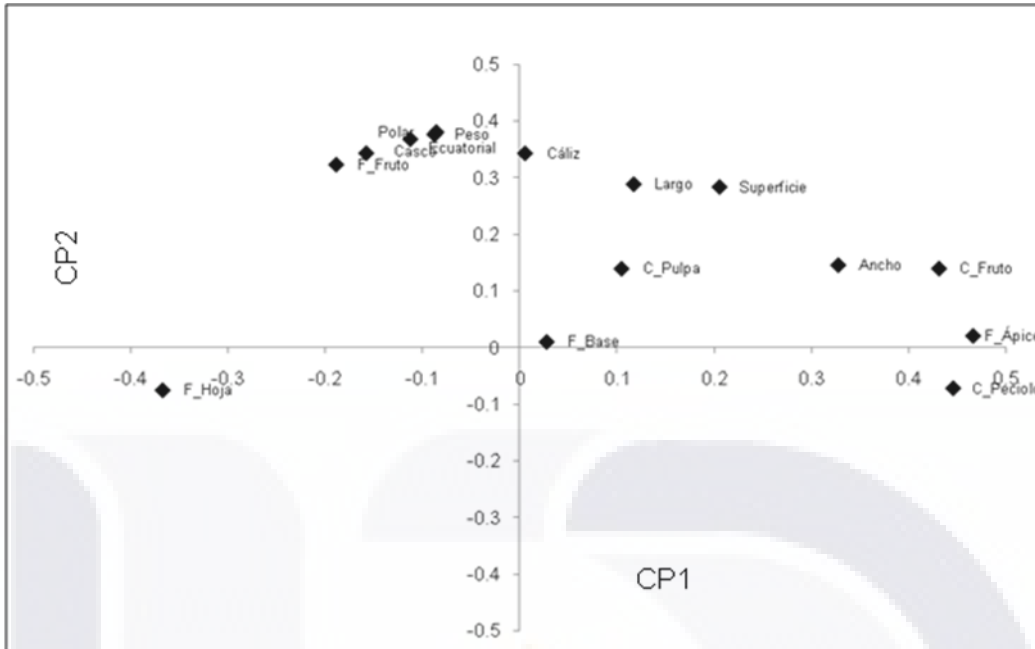


Cuadro 6. Vectores característicos de variables de hoja y fruto medidas en germoplasma de guayabo.

Variables	Componente 1	Componente 2
Peso de fruto	0.38	-0.09
Diámetro polar	0.38	-0.09
Textura de fruto	0.28	0.21
Ancho de hoja	0.15	0.33
Color de fruto	0.14	0.43
Color de peciolo	-0.07	0.45
Color de pulpa	0.14	0.10
Diámetro de cáliz	0.34	0.01
Grosor del mesocarpio	0.34	-0.16
Diámetro ecuatorial	0.37	-0.11
Forma de ápice	0.02	0.47
Forma base de hoja	0.01	0.03
Forma de fruto	0.32	-0.19
Forma de hoja	-0.07	-0.37
Largo de hoja	0.29	0.12

Cuadro 7. Vectores con mayor nivel descriptivo de germoplasma de huertos de guayabo.

Localidades	Componente 1	Componente 2
Malpaso	-2.46	-0.93
El Zapote	5.54	-2.08
La Loma	0.90	-0.61
Mesa del Charcote	2.50	-0.86
La Panadera	-1.90	-2.55
Las Parejas	1.50	-0.53
Jaltiche	-0.25	0.16
Cerro Blanco	-0.85	2.38
Ojo de Agua	-0.30	2.83
Los Adobes	-0.95	-1.04
El Rodeo	2.91	1.41
La Palma	-1.14	-0.69
El Riego	0.12	-0.53
Ojo Caliente	1.49	-0.84
Barranca del Roble	-3.79	0.76
Mesa Grande	1.44	3.86
El Papanton	-4.76	-0.74



**Figura 2.** Dispersión con base a los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales de las variables de frutos y hojas medidas en guayabo.

Con base en el método de Ward y el cálculo de la distancia métrica Euclidiana se construyó un dendrograma con los datos de las siete características más importantes según el ACP (Fig. 4). El dendrograma mostró dos grupos de huertos con distancias euclidianas de 2 a 27. En el grupo I se agruparon diez huertos y en el II siete.

### 6.2 Análisis AFLP.

En el análisis AFLP las cuatro combinaciones de oligonucleótidos selectivos amplificaron 302 bandas de las cuales 268 fueron polimórficas (89%) (Cuadro 8).



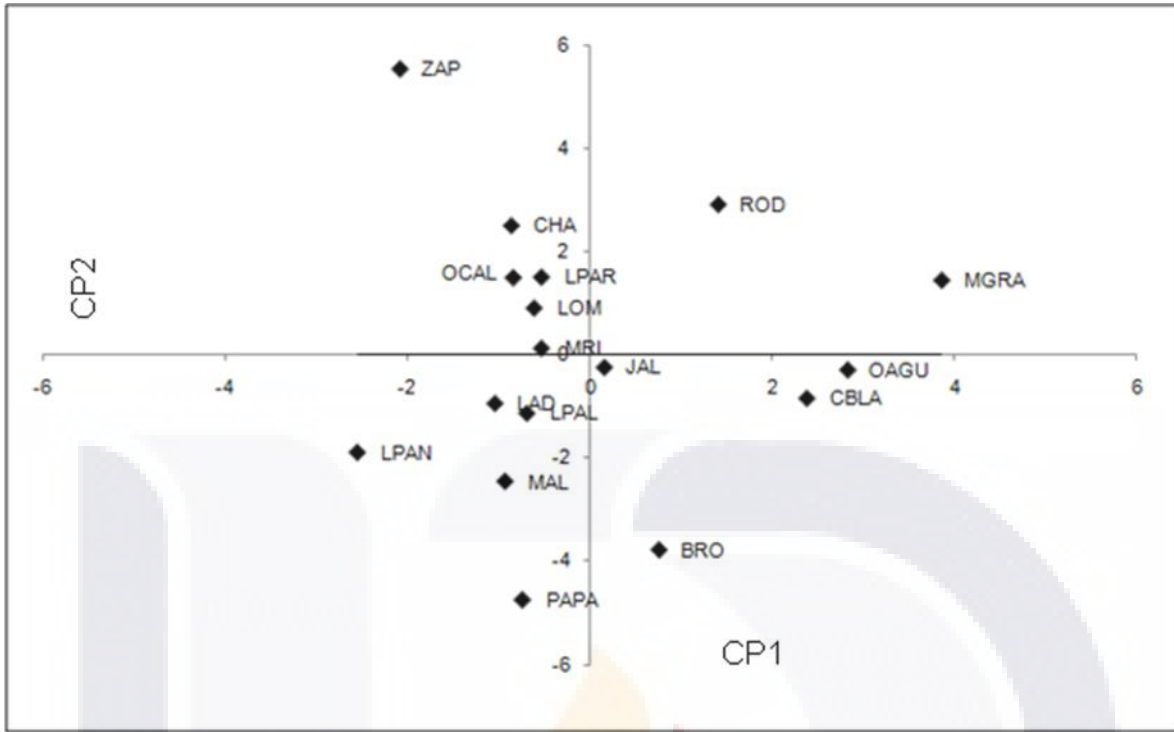
Cuadro 8. Número y porcentaje de bandas polimórficas producidas con el análisis AFLP de 105 árboles de guayabo.

Combinación de iniciadores EcoRI/MseI	Bandas			Polimorfismo (%)
	Monomórficas	Polimórficas	Totales	
AGG/AGG	8	69	77	90
AGG/ACA	5	61	66	93
AGG/AAA	8	72	80	90
ACG/ACC	13	66	79	84
Total	34	268	302	89

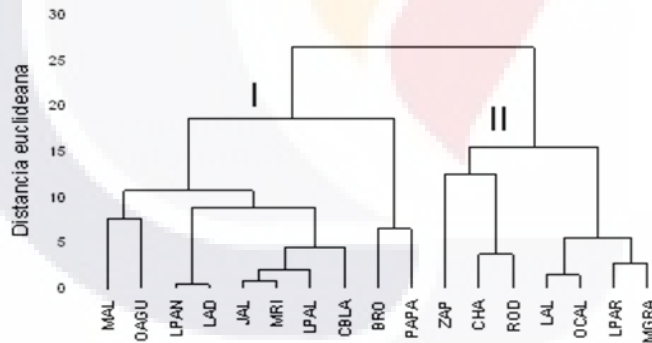
El análisis índice de diversidad genética de Powell (IP) fue mayor en la combinación E-AGG/M-AAA (38%) y E-ACG/M-ACC mostró el menor (32%) (Cuadro 9). El análisis de conglomerados de datos genéticos mostró la formación de dos grupos principales (Fig. 5). El grupo I incluyó guayabas de diez huertos y el II, de nueve. También, los huertos La Primavera y Mesa del Roble fueron genéticamente diferentes al resto.

Cuadro 9. Índice de diversidad genética de germoplasma de guayabo.

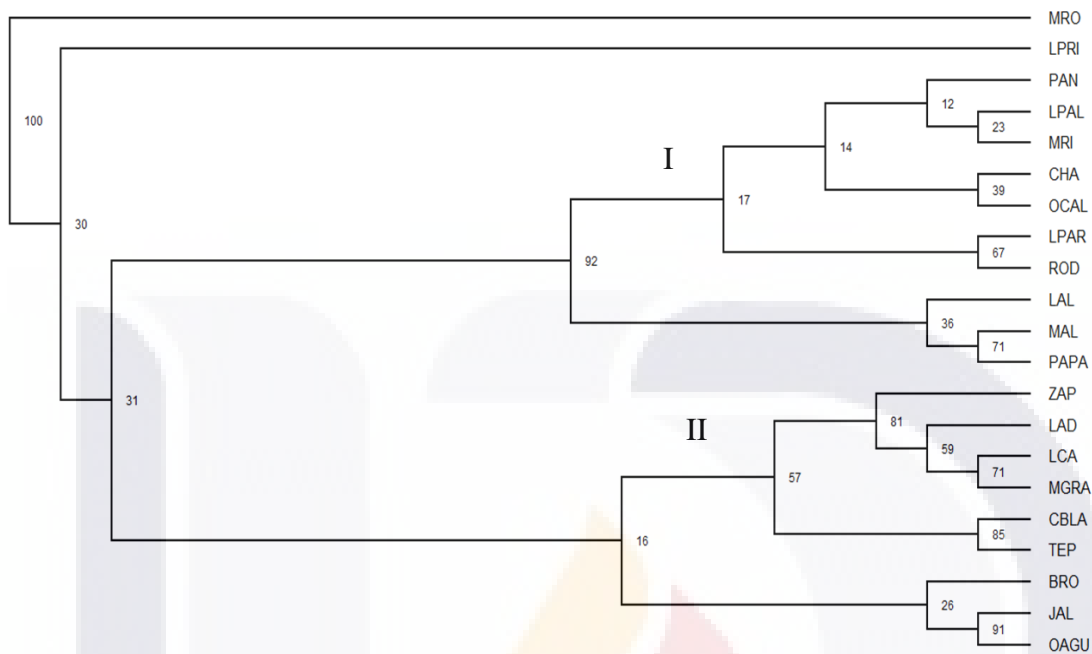
Localidad	Índice de diversidad de Nei				$\bar{x} \pm SE$
	AAD/AGG	AGG/ACA	AGG/AAA	ACG/ACC	
El Zapote	0.44	0.34	0.39	0.32	0.37±0.03
La Primavera	0.41	0.31	0.36	0.29	0.34±0.04
Mesa del Roble	0.39	0.25	0.32	0.27	0.31±0.03
Barranca del Roble	0.41	0.24	0.39	0.35	0.35±0.02
Jaltiche	0.39	0.34	0.46	0.35	0.39±0.03
Cerro Blanco	0.34	0.42	0.47	0.36	0.4±0.02
Ojo de Agua	0.34	0.24	0.46	0.36	0.35±0.01
El Tepetate	0.27	0.22	0.45	0.37	0.33±0.02
Mesa Grande	0.4	0.33	0.44	0.37	0.39±0.04
Las Cabras	0.41	0.43	0.4	0.38	0.41±0.03
Los Adobes	0.43	0.43	0.34	0.3	0.38±0.02
El Rodeo	0.44	0.44	0.42	0.35	0.41±0.02
La Panadera	0.43	0.43	0.33	0.31	0.38±0.03
Las Parejas	0.43	0.42	0.33	0.28	0.37±0.03
La Palma	0.36	0.31	0.27	0.29	0.31±0.05
El Riego	0.32	0.28	0.42	0.34	0.34±0.03
Ojo Caliente	0.29	0.29	0.41	0.3	0.32±0.03
Mesa del Charcote	0.3	0.3	0.38	0.28	0.32±0.01
La Loma	0.26	0.32	0.37	0.32	0.32±0.02
El Papanton	0.33	0.31	0.35	0.3	0.32±0.05
Malpaso	0.34	0.36	0.3	0.3	0.33±0.03
$\bar{x}$	0.37	0.34	0.38	0.32	



**Figura 3.** Dispersión con base a los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales de datos morfológicos de los huertos de guayabo.



**Figura 4.** Dendrograma de las distancias euclidianas entre las siete características morfológicas más importantes medidas en huertos de guayabo de Calvillo, Ags. MAL=Malpaso, ZAP=El Zapote, LOM=La Loma, CHA=Mesa del Charcote, LPAN=La Panadera, LPAR=Las Parejas, JAL=Jaltiche, CBLA=Cerro Blanco, OAGU=Ojo de Agua, LAD=Los Adobes, ROD=El Rodeo, LPAL=La Palma, ELRIE=El Riego, OCAL=Ojo Caliente, BRO=Barranca del Roble, MGRA=Mesa Grande, PAPA=El Papanton.



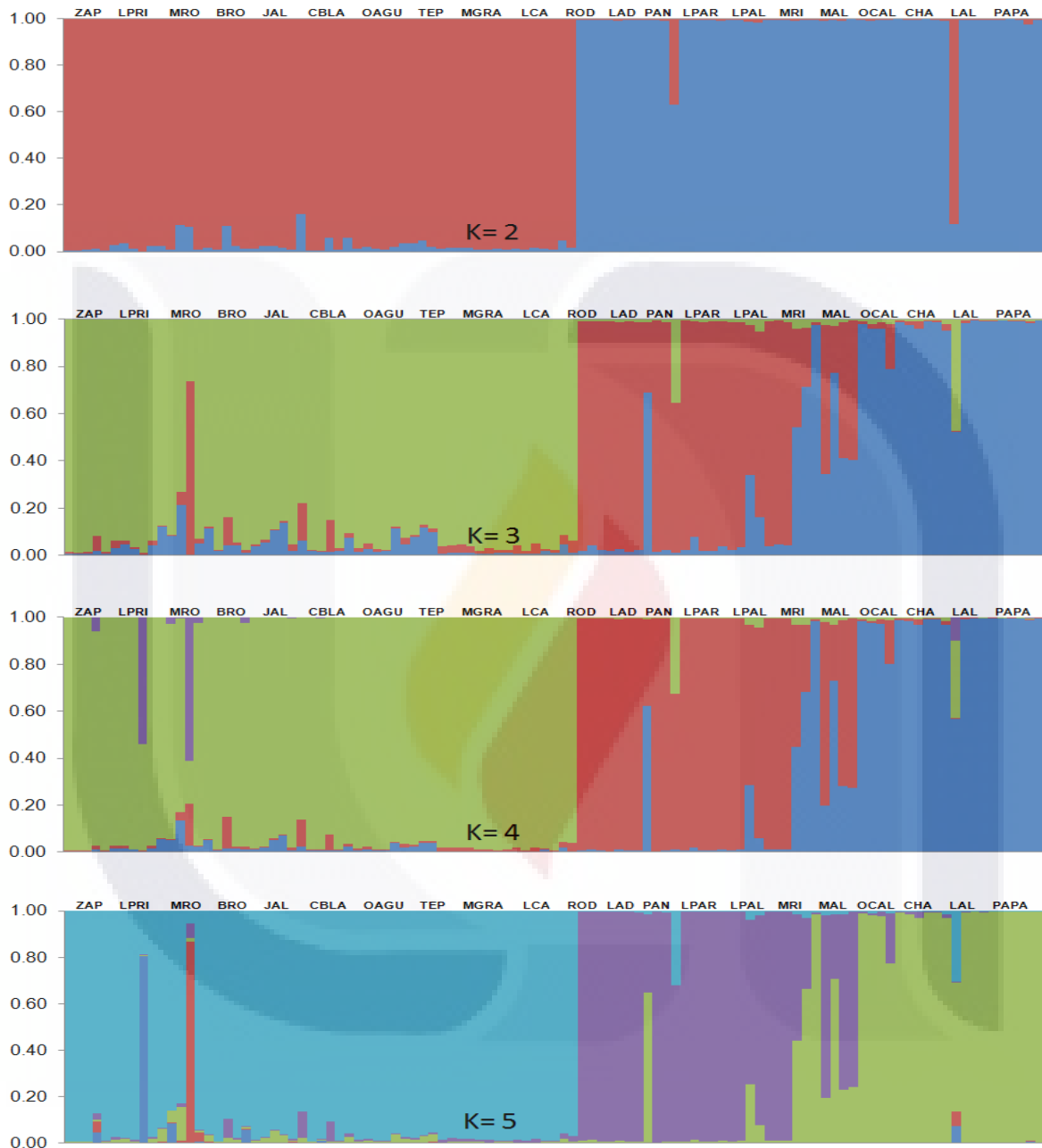
**Figura 5.** Dendrograma de distancia euclidianas con base en a datos AFLP’s de germoplasma de guayabo (100 repeticiones y Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas). MRO=Mesa del Roble, LPRI=La Primavera, PAN=La Panadera, LPAL=La Palma, MRI=El Riego, CHA=Mesa del Charcote, OCAL=Ojo Caliente, LPAR=Las Parejas, ROD=El Rodeo, LAL=La Loma, MAL=Malpaso, PAPA=El Papanton, ZAP=El Zapote, LAD=Los Adobes, LCA=Las Cabras, MGRA=Mesa Grande, CBLA=Cerro Blanco, TEP=El Tepetate, BRO=Barranca del Roble, JAL=Jaltiche, OAGU=Ojo de Agua.

La estructura genética de las poblaciones de guayabas con base en el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano con valores de  $K=2$ ;  $K=3$ ;  $K=4$  y  $K=5$  tomó como referencia el origen geográfico de individuos y huertos. El valor de  $\Delta K$  de  $K=2$  a  $K=5$  fue de 480.5 a 5.2. El valor  $K$  idóneo se determinó al graficar los incrementos de las probabilidades para cada  $K$  ( $\Delta K$ ); para partir de  $K=3$  empieza a tender a cero (datos no incluidos). El análisis Bayesiano ratificó la división de los huertos como se demostró en el análisis de conglomerados, con excepción de uno (LAD). Los árboles del grupo II del análisis de conglomerados (Fig. 5) son genéticamente muy parecidos y sus niveles de coancestrías son altos y, además, los resultados sugieren un huerto de origen de los 10 huertos, Mesa Grande (40

años). El otro grupo incluye árboles de huertos genéticamente más heterogéneos y que, de acuerdo con los valores de coancestrías, sugieren dos huertos de origen del germoplasma del resto, uno es Ojo Caliente y el otro, el huerto más antiguo del que se tiene noticia en la región (Malpaso) y aparente origen de la mayoría de árboles de la región Calvillo (Fig. 6). En el análisis de la varianza molecular (AMOVA) indicó diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre las jerarquías analizadas; la mayor varianza se encontró dentro de los huertos (84 %), lo que indica alta variabilidad genética dentro de ellos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza molecular de germoplasma de *P. guajava* L. con base en marcadores moleculares AFLP.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Componentes De varianza	P
Huerto	926.69	20	46.33	<0.0001
Dentro	668	84	7.95	<0.0001
Total	1594.69	104	15.33	



**Figura 6.** Análisis de coancestrías con enfoque Bayesiano con un valor de  $K=2$ ,  $K=3$ ,  $K=4$  y  $K=5$  de árboles de *P. guajava* L. con base en su origen geográfico. MRO=Mesa del Roble, LPRI=La Primavera, PAN=La Panadera, LPAL=La Palma, MRI=El Riego, CHA=Mesa del Charcote, OCAL=Ojo Caliente, LPAR=Las Parejas, ROD=El Rodeo, LAL=La Loma, MAL=Malpaso, PAPA=El Papanton, ZAP=El Zapote, LAD=Los Adobes, LCA=Las Cabras, MGRA=Mesa Grande, CBLA=Cerro Blanco, TEP=El Tepetate, BRO=Barranca del Roble, JAL=Jaltiche, OAGU=Ojo de Agua.



## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio reveló y ratificó la amplia diversidad fenotípica y genética entre árboles de guayabo de una misma huerta y entre huertas productoras de Calvillo, Aguascalientes. De los 15 caracteres morfológicos medidos, ocho fueron cualitativos y todos presentaron tres o más clases fenotípicas. Además, el análisis de componentes principales de la información morfológica explicó 74% de la variación morfológica observada en los dos primeros componentes principales obtenidos y 82% con los cuatro primeros. Estos valores son bajos comparados con los reportados por Sánchez-Urdaneta *et al.* (2009) (100%) pero altos a los reportados con los dos primeros CPs por Padilla-Ramírez *et al.* (2002) en germoplasma selecto (62%); Hernández-Delgado *et al.* (2007) (30%) y Tapia y Legaria (2007) (40%). Los CPs con mayor poder explicativo incluyen descriptores capaces de discriminar a los árboles de guayabo con base en características del fruto y de las hoja que ofrecen como ventaja que o son de medición visual o bien, medibles fácil y rápidamente; además, dichas características se asocian positivamente con la variabilidad morfológica del germoplasma. Por ello, es recomendable su uso en futuros análisis morfológicos de germoplasma silvestre, criollo o mejorado de *P. guajava* para así discriminar, clasificar o seleccionar germoplasma con alto grado de confianza (Fernandes-Santos *et al.*, 2008).

Los grados de variabilidad morfológica observados en este estudio son contrarios a los mostrados en germoplasma de guayabo seleccionado o mejorado genéticamente en México (Padilla-Ramírez *et al.*, 2002) u otros países (Du Preez y Welgemoed, 1990; Tong *et al.*, 1991; Ribeiro *et al.*, 1998) pero similares a los reportados por Martínez-De Lara *et al.* (2004) en cuatro huertas de Calvillo y por

Hernández-Delgado *et al.* (2007) en germoplasma de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México.

Siete características morfológicas fueron las más importantes, tres cuantitativas (peso, diámetro polar y diámetro ecuatorial del fruto) y cuatro cualitativas (forma de fruto, color de peciolo, forma del ápice de la hoja y forma de hoja). Además, entre las características cuantitativas del fruto hubo asociación positiva y significativa. Padilla-Ramírez *et al.* (2002), Martínez de Lara *et al.* (2004) y Hernández-Delgado *et al.* (2007) reportan asociaciones positivas y significativas entre las variables de fruto con lo que se deduce que, a medida que se incrementa el peso del fruto, se incrementarán en forma proporcional sus parámetros y viceversa. También, en general, mayores tamaños de frutos se asocian con variables del crecimiento de los árboles de guayaba (Padilla-Ramírez *et al.*, 2007a, b), mango (Gálvez-López *et al.*, 2007) y tejocote (López-Santiago *et al.*, 2008). Las características del fruto tales como diámetro ecuatorial, grosor de mesocarpio y forma de fruto tienen alto valor descriptivo de la variabilidad fenotípica en guayabo (Jiménez-Lozano *et al.*, 2009). Se observó también alta asociación entre características del fruto y entre la forma del fruto y el grosor del mesocarpio, tal como lo consignaron El Agamy *et al.* (1976), Du Preez y Welgemoed (1990), Padilla-Ramírez *et al.* (2002); Martínez-De Lara *et al.* (2004) y Hernández-Delgado *et al.* (2007). En comparación con el germoplasma de otros países como Colombia (Quijano *et al.*, 1999), Venezuela (Tong *et al.*, 1991), Malasia o Vietnam (Yusof, 1989), los árboles aquí evaluados exhiben menores tamaños promedio de fruto y grosor de mesocarpio. Esto se debe a que las condiciones de cultivo del guayabo en la región de Calvillo, Aguascalientes no son las óptimas en comparación con las de aquellos países (González-Gaona *et al.*, 2002). Aún así, la especie se ha adaptado, se recombina y genera nuevas variantes o morfotipos (Martínez-De Lara *et al.*, 2004). Esta se ve reflejada en la amplia variabilidad morfológica detectada.

El ACP de la información morfológica definió cuatro grupos mayores de germoplasma de guayabo de Calvillo. Por una parte, se ubicaron árboles con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

frutos grandes y redondos con colores claros (amarillo, beige) del fruto y de su mesocarpio (BRO, MAL, CBLA, OAGU, JAL), pero con hojas más pequeñas, menos cordadas en la base y el ápice. Otro grupo se caracterizó por árboles con frutos grandes pero con forma tendiente a aplanada y con color externo y de pulpa rosa o naranja, así como hojas cordadas en la base y el ápice (MGRA, ROD). Un tercer grupo incluye guayabos con frutos pequeños y aplanados y hojas redondeadas (PAPA, LPAL, LAD, LPAN). Finalmente, se ubican árboles con frutos pequeños y colores externo y de mesocarpio claros, así como hojas oblongas y pecíolos rojos (MRI, LAL, LPAR, OCAL, CHA, ZAP). El análisis de conglomerados, si bien ratificó los agrupamientos de árboles obtenidos con el ACP también sugiere que, más que los tamaños del fruto, fueron los colores del fruto y del mesocarpio y la forma de las hojas las variables más discriminantes del germoplasma.

En el análisis AFLP produjo polimorfismos cercanos al 90% con valores de diversidad genética promedio del 0.35 %. El análisis de conglomerados de datos AFLP formó dos grupos principales de árboles, uno incluyó guayabas de diez huertos y el otro, de nueve, aunque aparentemente los huertos LPRI y MRO son genéticamente diferentes al resto de huertas. El análisis Bayesiano ratificó la división de los huertos como se demostró en el análisis de conglomerados, con excepción de uno (LAD). Los árboles del grupo II del análisis de conglomerados son genéticamente parecidos y sus niveles de coancestrías son altos. Además, los resultados sugieren un huerto de origen de esos 10 huertos, el de Mesa Grande, con más de 40 años de edad. El otro grupo incluye árboles de huertos genéticamente más heterogéneos y que, de acuerdo con los valores de coancestrías, sugieren dos huertos de origen de esos huertos, uno es el huerto de Ojo Caliente y el otro, el huerto más antiguo del que se tiene noticia en la región (Malpaso) y aparente origen de la mayoría de árboles de la toda la región productora de guayaba de Calvillo.

Múltiples trabajos se han desarrollado donde se analiza la diversidad y las relaciones genéticas entre accesiones de guayabo en México y otros países,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizando diferentes estrategias de marcadores moleculares, dominantes y/o codominantes (Padilla-Ramírez *et al.*, 2002; Martínez-De Lara *et al.*, 2004; Chandra y Mishra, 2007; Hernández-Delgado *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010). Sin embargo, pocos son los trabajos que enfatizan el análisis de guayabas a nivel de poblaciones o de su estructura genética de poblaciones (Martínez-De Lara *et al.*, 2004; Domínguez-Álvarez *et al.*, 2005), en virtud de que en la mayoría de los casos se estudian accesiones de bancos de germoplasma o poblaciones colectadas recientemente en las regiones agroecológicas de interés, asumiendo la homogeneidad dentro de huertos en el caso de poblaciones con origen comercial o entre accesiones, en los bancos de germoplasma. La situación de los recursos genéticos de la guayaba en la región Calvillo-Cañones de México es un tanto excepcional en virtud de que a partir de las primeras introducciones de plantas a la región, hace más de 100 años, la propagación posterior se ha permitido y promovido sin registros o manejo de progenitores (González-Gaona *et al.*, 2002). Ello ha derivado en la notable heterogeneidad genética de los árboles de la mayoría de los huertos de la región (Martínez-De Lara *et al.*, 2004), lo que en este trabajo se ratificó con el análisis genético AFLP y los resultados del AMOVA que, en esencia, indican que la mayor proporción de variabilidad genética de los árboles ocurre dentro de los huertos, más que entre huertos. Por ejemplo, los niveles de polimorfismo son similares a los reportados por Martínez-De Lara *et al.* (2004) en árboles de cuatro huertas de guayabo en Calvillo, pero mayor a los reportados por Padilla-Ramírez *et al.* (2002) en árboles seleccionados por alta productividad de fruto y tipo de fruto. Los resultados indican que el material genético establecido en cada huerta tiene orígenes diferentes o bien, que son originarios de la recombinación entre progenitores genéticamente distintos. Es común que en la región la propagación de árboles para nuevas plantaciones o la renovación de éstas sea asexual (hijuelos de raíz, acodos aéreos) (González-Gaona *et al.*, 2002) pero también es práctica común aprovechar las plantas originadas de semilla que se producen al azar en los mismos huertos productores (Laksminarayana y Moreno, 1978; Martínez-De Lara *et al.*, 2004).

La diversidad fenotípica y genética dentro de una huerta de guayabo tiene varias implicaciones importantes.

La mayor diversidad genética podrá favorecer la mayor capacidad de los árboles para ‘amortiguar’ los efectos de los diferentes factores adversos, tanto bióticos (plagas, enfermedades) como abióticos (sequía, heladas, baja disponibilidad de nutrimentos en el suelo), que constantemente inciden en la producción de guayaba en la región Calvillo-Cañones (González-Gaona *et al.*, 2002). Se considera que la mayor diversidad genética en características adaptativas ventajosas para la especie son una condición necesaria para la supervivencia y la evolución de una especie (Koski, 2000).

La diversidad genética en las huertas de guayabo podría constituirse como un mecanismo de conservación de la biodiversidad, si aunado a las huertas de guayabo se intercalaran en bloques o fajas cultivos anuales de interés para los agricultores de la región, tales como maíz (*Zea mays* L.) o frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). A medida que se incrementa la diversidad de especies o genotipos en los huertos se mantiene la diversidad y abundancia de especies benéficas tales como los insectos polinizadores (abejas, *Apis mellifera*) (Kevan *et al.*, 1997; Allen-Wardell *et al.*, 1998; Vergara, 2002). También, los huertos de manzano (*Malus domestica*) exhiben mayor diversidad genética que los campos cultivados con especies anuales como el chile (*Capsicum annuum* L.), dado que la diversidad se relaciona con el nivel de disturbio ambiental; cuando éste es frecuente y alto, las especies no tienen suficiente tiempo para establecerse apropiadamente en su nicho del ecosistema (Kruger, 2000). Kruger (2000) sugiere el conocimiento y mantenimiento de la diversidad en huertos de especies frutales, debido a que con ello los agricultores pueden planear sus prácticas de manejo para optimizar sus rendimientos, con base a los beneficios que ofrece la mayor diversidad.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Otra implicación positiva sugiere que la detección, conservación y aprovechamiento de germoplasma resultante de polinización abierta (por ejemplo, progenies de medios hermanos) es fuente amplia de oportunidades de detección y selección de genotipos con características fenotípicas y productivas superiores que permitan la derivación directa de nuevo germoplasma con altos niveles de productividad y/o calidad de la producción para su propagación masiva o bien, que se incorporen en programas de cruzamiento para la generación de cruzas y germoplasma segregante donde se podrá realizar selección y mejoramiento genético (Rajan *et al.*, 2007).

Hay una implicación negativa consiste en que probablemente la mayor diversidad morfo-agronómica y genética sea una característica desfavorable al momento de la comercialización de la producción, pues la calidad de la misma disminuye a medida que se incrementa la diversidad de formas de fruto, colores de pulpa, épocas de cosecha y cualidades sensoriales. Lo anterior podrá traducirse en la reducción en los precios de venta y con ello, la reducción en la rentabilidad del cultivo en la región; esto debido a que, para fines de mercado en México, se prefiere la guayaba con colores de pulpa amarilla o crema, principalmente (Reyes-Muro *et al.*, 2002, Mondragón-Jacobo *et al.*, 2009).

Por lo anterior se proponen tres alternativas para el establecimiento y mantenimiento de huertos guayaberos en la región de Calvillo, Aguascalientes: 1) iniciar la homogenización de las huertas con material genético certificado propagado asexualmente; 2) establecer bloques de árboles con características distintas entre sí, pero homogéneos dentro de bloques en cada huerto, para mantener cierta diversidad en cuanto a tipos de guayaba a producir con la ventaja del manejo similar en cada bloque; o finalmente, 3) mantener la diversidad genética en las huertas actuales y en las próximas a establecerse o a ser renovadas, con la idea de mantener diferentes opciones de producción de acuerdo al uso de cada tipo de guayaba producida (por ejemplo, guayabas con pulpa color rosa o salmón para uso industrial en la fabricación de ates, dulces y jugos y



guayabas blancas, cremas y amarillas para consumo en fresco en el mercado local o nacional), con el consiguiente mantenimiento de los beneficios de la diversidad en la huerta ya mencionados.



## 8. CONCLUSIONES

El análisis de la diversidad morfológica y genética de árboles de guayabo de 21 huertos de Calvillo, Aguascalientes reveló la amplia diversidad genética entre y dentro de huertos como probable resultado del uso constante de plantas con origen sexual. El germoplasma de Calvillo proviene de dos o tres huertos 'madre' con más de 40 años de antigüedad.

## 9. REFERENCIAS.

Allen-Wardell G. P., Bernhardt R., Bitner A., Búrquez S., Buchman J. Cane. (1998) The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biol.* 12: 8-17.

Aranguren Y., Vallecillos C. and Fermin G. 2010a. Variability of Venezuelan Guava Geographic Landraces Employing Phenotypic Markers. *Acta Horticulturae* 849: 87-94.

Aranguren Y., Briceño A. y Fermin G. 2010b. Assessment of the Variability of Venezuelan Guava Landraces by Microsatellites. *Acta Horticulturae* 849: 147-154.

Arias O. 1993. Comercial Micropropagation of Banana. Biotechnology applications for banana and plaitain improvement. INIBAP. Montpellier, France. p. 139-142.

Avilán L., Leal, F., y Bautista D. 1992. Manual de fruticultura. Editorial América, C. A. 2da Edición. Tomo II. Venezuela. p. 807-859.

Bassam B. J., Caetano-Anollés P. M. and Greshoff P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.

Bettencourt E.; Hamkamp T.; Perry M. C. 1992. Directory of germplasm collections. 6.I. Tropical and subtropical fruits and tree nuts: Annona, avocado, banana and plantain, breadfruit, cashew, *Citrus*, date, fig, guava, mango, passionfruit, papaya, pineapple and others. Roma: IBPGR. p. 337.

Bezerra J. E. F.; Silva Junior J. F. da; Lederman I. E. 1997. Bancos activos de germoplasma de acerola e goiaba. In: Workshop para curadores de Bancos de germoplasma de especies frutíferas, Brasília. Anais Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 72-77.

Bostein D., White R., Skolnick M., and Davis R. W. 1980. Costruction of a genetic linkage map in a man using restriction fragment length polymorphysms. *Amer. J. Human Genet.* 32: 314-331.

Chandra R. y Mishra M. 2007. Biotechnological interventions for improvement of guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 735: 117-125.

Chávez J. L. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica, pp. 72-77. In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. T. L. Franco y Hidalgo, R. (eds.). Boletín técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. p. 89.

De Luna Jiménez A. 2003. La guayaba en Calvillo Aguascalientes y factores que limitan su producción. *In*: J. S. Padilla R., L. Reyes M., E. González G., M. A. Perales de la C. (eds.). Memoria. Primer Simposio Internacional de la Guayaba. Aguascalientes, México. Diciembre del 2003. p. 1984-197.

Dinesh M. R. and IYER C. P. A. 2005. Significant research achievements in guava-improvement and future needs. *In*: Souvenir 1<sup>st</sup> International Guava Symposium. Lucknow, India. p. 7-17.

Domínguez-Álvarez J. L., Legaria-Solano J. P., Nieto Ángel R., Barrientos Priego A. F. y Pineda Pineda J. 2005. Variabilidad genética según RAPD de árboles de guayabo "media china" procedentes de cuatro plantaciones y su respuesta morfológica a baja disponibilidad de nutrimentos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* XI: 329-343.

Du Preez R. J. y C. P. Welgemoed 1990. Variability in fruit characteristics of five guava selections. *Acta Hort.* 275: 351-360.

El Agamy S. Z., El Azzouni A. Badawi M. 1976. Variability in fruit characters among guava seedling in Egypt. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 89: 249-250.

Esparza M, Serwatowski J. K., Morales J. F. 2000. Establecimiento de una metodología adecuada para la extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA) en guayaba (*Psidium guajava* L.) Séptimo Simp. Invest. Des. Tecnológico. Aguascalientes, México. p. 10.

Ferreira F. R. 1999. Recursos genéticos de fruteiras tropicais e subtropicais no Brasil. *In*: WORKSHOP Para curadores de Bancos de germoplasma de especímenes frutíferas, 1997, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología. p. 9-27.

Fernandes-Santos C. A., de Franca-Souza F., Alcantara-Vilarinho A., Gomes-Padua J., Amorim-Rodrigues M. 2008. Relationship between ecogeographic sampling and phenotypic diversity of Brazilian *Psidium* germplasm based on categorical descriptors. 2<sup>nd</sup> International Symposium of guava and other Myrtaceae. Mérida-Aguascalientes, México. p. 24-25.

Frankel O.H., Brown A. H. D., & Burdon J. J. 1995. The conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press, UK.

Franco T. L. e Hidalgo R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. p. 89.

Gálvez-López, D. *et al.* 2007. Diversidad isoenzimática de mangos criollos de Chiapas, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, Vol. 13, Núm. 1, enero-junio, pp. 71-76. Universidad Autónoma Chapingo, México.

García de León F. J. 2001. Los marcadores genéticos en el conocimiento y el manejo de recursos bióticos. *BIOTAM* 12: 57-80.

Giancinti-Battistuzzi M. A. 2005. Tendencias mundiales: Impacto en la producción y consumo de fruta y hortalizas. In: E. Sánchez Ch., J. M. Soto P., R. M. Yañez M., M. M. Mancera L. y A. Nuñez B. (eds). Memoria de Conferencias Magistrales. XI Congreso Nacional de la Sociedad Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencia Hortícolas. Chihuahua, Chih.

González-Gaona E., Padilla-Ramírez J. S., Reyes-Muro L., Perales-De la Cruz M. A. y Esquivel-Villagrana F. 2002. Guayaba, su cultivo en México. Libro Técnico No. 1. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón. p. 183.

Hernández-Delgado, S., J. S. Padilla-Ramírez, A. Nava- Cedillo, N. Mayek-Pérez. 2007. Morphological and genetic diversity of Mexican guava germplasm. *Plant Genetic Resources* 5: 131-141.

Hidalgo R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales, pp. 2-26. *In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Hidalgo, R. (ed). Boletín técnico, Número 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. p. 89.

Hoyos J. 1994. Frutales en Venezuela (Nativos y exóticos). Sociedad de Ciencias Naturales La Salle, Caracas Venezuela. p. 185-190.

Hutchinson J. 1973. The families of flowering plants. Third Edition. Oxford University Press. Ely House, London W.

Israeli Y., Reuveni O., Lavhav E. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated in vitro techniques. *Scientia Horticulturae* 48: 71-88

Jaramillo S. y Baena M. 2000. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Madrid. p. 92.

Jiménez-Lozano L., Almanza-Pinzón M. I., Muñoz-Flores J. E. 2009. Caracterización morfológica de accesiones silvestres de guayaba. *Acta Agronómica* 58: 69-73.

Kevan P. G., Greco C. F., Belaousoff S. 1997. Log-normality and abundance in diagnosis and measuring of ecosystem health: pesticide stress on pollinators of blueberry heaths. *J. Appl. Ecol.* 34: 1122-1136.

Koornneef M., y Stam P. 2001 Changing paradigms in plant breeding. *Plant Physiology* 125:156-159.

Kollmorgen C. 1977. *Munsell color for plant tissues*. 2a ed. Munsell Color. Baltimore, MD, USA.

Koski V. 2000. A note on genetic diversity in natural populations and cultivated stand of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.: Fuera de Serie No. 1-2000*: 89-95.

Knudsen H. 2000. *Directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe*. Roma: IPGRI. p. 369.

Kruger M. A. 2000. The effects of disturbance on diversity in three production fields; an apple orchard, a peper field, and a garden. <http://people.ucsc.edu/~mkruger/Documents/diversity.htm> (Consulta efectuada el 22 de Julio de 2003).

Laksminarayana S. y Moreno M. A. 1978. Estudio preliminar para determinar la existencia de las variaciones en guayaba mexicana. *Revista Chapingo*. 10:37:47.

Lepitre V., Nansot G., Grangeon R., Pomies V., Rivallan R., Risterucci A. M., Valdés-Infante J., Rodríguez-Medina N. N., Muth J., Boike J., Prüfer D., Becker D., Rohde W., Ritter and Bollotte N., 2010. The Microsatellite (SSR)/AFLP Reference Linkage Map of Guava. *Proceedings of the Second International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. Acta Horticulturae Number 849. January 2010. p. 183-192

Lavi U., Tomer, E., and Gazit S. 1989. Inheritance of agriculturally important traits in mango. *Euphytica* 44: 5-10.

Lobo M. 2004. Recursos genéticos de especies frutales. *Memorias del VII Congreso Venezolano de Fruticultura*. Maracaibo, Venezuela. p. 1-13.

López-Santiago, J. et al. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Rev. Chapingo Ser.Hortic [online]*. 2008, vol.14, n.2, pp. 97-111.

Lozano J.C., Toro J.C., García R. y Tafur R. *Manual sobre el cultivo del guayabo en Colombia*. Cali, Colombia, 2002. p. 278.

Martínez de Lara J., Barrientos Lara M. C., Reyes de Anda A. C., Hernández Delgado S., Padilla Ramírez J. S., y Mayek Pérez N., 2004. Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo Aguascalientes. *Rev.Fitotec. Méx.* 27:243-249.



Mata B., I y A. Rodríguez M. 1990. Cultivo y producción del guayabo. Segunda edición. Ed. Trillas. México, D.F. p. 157.

Maxted N., van Slageren M. W., Rihan J. 1995. Ecogeographic surveys. In: Guarino, L., Ramanatha Rao, V., Reid, R. (Eds.), *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. CAB International, Wallingford. p. 255-286.

Medina C., Lobo, M. 2001. Variabilidad morfológica en el tomate pajarito (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*), precursor del tomate cultivado. *Revista Corpoica* 3(2):39-50.

Mondragón-Jacobo C., Toriz-Ahumada L. M., Guzmán-Maldonado S. H. 2009. Caracterización de selecciones de guayaba para el Bajío de Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México* 35: 315-322.

Morton J. 1987. Guava. *In: Fruits of warm climates*. Miami, FL. p. 356-365.

Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific Amer.* 262: 56-65.

Nakasone H. Y., Brekke J. E. and Cavaletto C. G., 1976. Fruit and evaluation of ten clones of guava (*Psidium guajava* L.). University of Hawaii, Honolulu. Research report 218. p. 16.

Nakasone H. Y. and ITO P. J., 1978. Ka Hua Kula Guajava. *HortScience*. 13:197.

Neal M. C. 1965. *En los jardines de Hawai*. Hawai: Pulse Bishop Museum.

Nuez F. y Carrillo J. M. 2000. Los marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. p. 25-27.

Ortiz R.; López A.; Ponchner S.; Segura A. 1999. *El cultivo del banano*. EUNED. San José, Costa Rica. p. 186.

Osborn J. 2000. A review of radioactive and non radioactive-based techniques used in life science applications. Part I: Blotting techniques. *Innovations Forum Life Science News* 6. Amersham Pharmacia Biotech. New York, USA. p. 1-4.

Padilla-Ramírez J. S., González Gaona E. Esquivel Villagrana F., Mercado Silva E., Hernández Delgado S. y Mayek Pérez N. 2002. Caracterización de germoplasma sobresalientes de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25:393-399.

Padilla-Ramírez, José Saúl et al. 2007. Producción de fruto e índices productivos en árboles de guayabo. *Agric. Téc. Méx*, vol.33, no.2, p.191-196.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Padilla-Ramírez R., J. S., González G., E y Perales de la C., M. A. 2010. Nuevas variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.). Folleto Técnico Núm. 42. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón, Pabellón de Arteaga, Ags. México. p. 28.

Pepeno W. 1974. Manual of Tropical and Subtropical Fruits. Excluding the Banana, Coconut, Pineapple, Citrus fruits, Olive and Fig. Hafner Press. New York, USA. p. 474.

Perales De la Cruz M. A. y Silguero J. F. 1995. Caracterización de colectas de guayaba *Psidium guajava* L. de la región Calvillo-Cañones por forma y componentes del fruto. Agric. Téc. Méx. 21:195-203.

Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. España. p. 326.

Prakash D. P., Narayanaswamy P., Sondur S. N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. J. Hort. Sci. Biotech. 77:287-293.

Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. STRUCTURE. Individual admixture, population assignment, population clustering (k). Genetics, 155: 945-959.

Quijano C. E., Suárez M. M., Duque C. 1999. Constituyentes volátiles de dos variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.): Palmira ICA-1 y Glum Sali. Rev. Colombiana de Química 28: 55-64.

Rai M. K., Asthana P., Jaiswal V. S., Jaiswal U. 2010. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. Trees: Structure and Function 24: 1-12

Rajan S., Yadava L. P., Kumar R., Saxena S. K. 2007. Association and multivariate analysis of seed trait diversity in guava (*Psidium guajava* L.). Indian Journal of Agricultural Science 77: 828-833.

Reyes-Muro L, González-Gaona E, Padilla-Ramírez J. S. 2002. Comercialización, transformación y rentabilidad. In: E González-Gaona, JS Padilla-Ramírez, L Reyes-Muro, MA Perales-De la Cruz, F Esquivel-Villagrana. Guayaba, su cultivo en México. Libro Técnico No. 1. Campo Experimental Pabellón-INIFAp. Pabellón de Arteaga, México. p. 145-170.

Ribeiro R., Picarelli F., Antunes I. J., Magali L., Igue T. 1998. Guava yield in Monte Alegre do Sul, State of Sao Paulo, Brazil: II. Final results. Bragantia, Campinas 57: 117-126.

Rodríguez N. N., Valdés J., Rodríguez J. A., Velásquez J. B., Rivero D., Martínez F., González G., Sourd D. G., González L., Cañizares J. 2010. Genetic resources

and breeding of guava (*Psidium guajava* L.) in Cuba. *Biotecnología Aplicada* 27: 238-241.

Remington D. L., Whetten R. W., Lui, B. H. and O'Malley D. M. 1998. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete coverage in *Pinus taeda*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1279-1292.

Ritter E., Herran A., Valdés-Infante J., Rodríguez-Medina N. N., Briceño A., Fermin G., Sanchez-Teyer F., Connor-Sanchez A. O., Muth J., Boike J., Prüfer D., Santos C. A., Nunes dos Santos I. C., Rodrigues M. A., Risterucci A. M., Billotte N., Becker D., and Rohde W. 2010a. Comparative Linkage Mapping in Three Guava Mapping Populations and Construction of an Integrated Reference Map in Guava. *Acta Horticulturae* 849: 175-182.

Ritter E., Rodríguez-Medina N. N., Velásquez B., Rivero D., Rodríguez J. A., Martínez F., and Valdés-Infante F. 2010b. QTL (Quantitative Trait Loci) Analysis in Guava. *Acta Horticulturae* 849: 193-202.

Rodríguez-Medina N. N., Fermin G. A., Valdés-Infante J., Velásquez V., Rivero D., Martínez F., Rodríguez J. and Rohde W. 2010. Illustrated Descriptors for Guava. (*Psidium guajava*). *Acta Horticulturae* 849: 103-110

Rojas W. 2003. Análisis multivariado en estudios de variabilidad genética. In: T. L. Franco y R. Hidalgo (eds). Análisis estadísticos de los datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. p. 85-86.

Sánchez-Teyer L. F., Barraza-Morales A., Quiroz-Moreno A., Ortíz-García K., Becerril-Chi K., Keb-LLanes M. and O'Connor-Sánchez A. 2010. Genetic Diversity of Mexican Guava Germoplasm Evaluated Using AFLP and SSR Markers. *Acta Horticulturae* 849: 255-260.

Sánchez Urdaneta A. B., et al. 2009. Efecto del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de acodos aéreos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar. *Revista UDO Agrícola* 9 (1): 113-120.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA. 2011. Cierre de la producción agrícola por estado. Tomado de: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351), (fecha de consulta junio de 2011).

Shigeura G. T., y Bullock R. M. 1983. Guayaba (*Psidium guajava* L.) en Hawaii Historia y Producción. Investigación extensión de la serie 035. HITAHR, CTAHR de la Universidad de Hawaii.

Southern E. M. 1975. Detección of especific secuencias among DNA fragments separated by gel electroforesis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tapia D. y Legaria P. 2007. Variabilidad Genética en Cultivares de Guayabo (*Psidium guajava* L.) Revista Fitotecnia Mexicana, año/vol. 30, número 004. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México p. 391-401.

Tatineni V., Cantell R. G., and Davis D. D. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci.* 1996:186-92.

Tong F., Medina, Esparza D. (1991) Variabilidad en poblaciones de guayaba (*Psidium guajava* L.) del municipio Mara del estado de Zulia. Rev. Agron. (LUZ) 8: 15-27.

UPOV (1987) Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. Guava (*Psidium guajava* L.). Geneva, Switzerland. p. 29.

Valdés-Infante J., Rodríguez-Medina N. N., Velásquez B., Rivero D., Martínez F., Espinosa G., Risteruci A. M., Billotte N., Becker D., and Rohde W. 2010a. Simple Sequence Repeats (SSRs) for Diversity Characterization of Guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 849: 155-162.

Valdés-Infante J., Rodríguez-Medina N. N., Velásquez V., Rivero D., Martínez F., Risterucci A. M., Bollotte N., Becker D., Ritter E and Rohde W. 2010b. Comparison of the Polymorphism Level, Discriminating Capacity and Informativeness of Morpho-Agronomic Traits and Molecular Markers in Guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 849: 121-132.

Vasco, N. L., J. S. Padilla, J. Toro. 2003. Composición nutrimental de la guayaba y sus semillas. Primer Simposio Internacional de la guayaba. p. 116-123

Vergara C. H. 2002. Diversity and abundance of wild bees in a mixed fruit orchard in Central México. In: Kevan P and Imperatriz-Fonseca VL (eds.). *Pollinating Bees: The conservation link between agricultural and nature.* Ministry of Environment. Brasilia. p. 189-176.

Vilelala-Morales E. A. y Candiera A. C. 1996. Principios genéticos para recursos genéticos. En Puignau, J. P. (ed.). *Curso sobre conservación de germoplasma vegetal.* Brasilia, Brasil. 19-30 de septiembre de 1994. Montevideo: Diálogo XLV-IIICA-Procisur. p. 35-48.

Vos P. Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. y Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Reserch.* 1995. vol. 23, p. 4407-4414.

Welsh J. and McClelland M. 1990. Finger printing Genomes Using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., and Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.

Yusof S. 1989. Physico-chemical characteristics of some guava varieties in Malaysia. *Acta Hort.* 269: 301-306.

Zee F. 1997. Guava. In: The Brooks and Olmo. Register of fruit & nut varieties. Third Edition. ASHS Press. p. 302-304.



## Glosario

*loci* = plural de *locus*, lugar donde se encuentran situados uno o varios genes.

Buffer = solución amortiguadora.

EcoRI = enzima de restricción de *Escherichia coli* que corta el ADN dentro de cada una de las cadenas de forma palíndrome (5'...GAATTC...3').

MseI = enzima derivada de *Micrococcus species* que corta el ADN dentro de cada cadena una de las cadenas de forma palíndrome (5'...TTAA...3').

Taq ADN polimerasa = enzima que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que polimeriza desoxibonucleótidos con una reducida o nula actividad de exonucleasa 3'-5' o 5'-3'.

RNAse = enzima ribonucleasa que actúa degradando el ARN.

T<sub>4</sub> DNA ligasa = enzima del bacteriófago T<sub>4</sub> que liga fragmentos de ADN.

5'-3' = extremos del ADN dentro de una cadena, indicando la posición del carbono de la desoxirribosa.

Fenotipo = Atributos observables de un organismo.