UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio de Diversidad Genética e Identificación Racial de Ecotipos de Aguacate (*Persea americana* Mill.) Donadores de Semilla para Portainjertos en el Departamento de Antioquia.

Gloria Patricia Cañas Gutiérrez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias,
Doctorado en Ciencias Agrarias
Medellín, Colombia
2018

Estudio de diversidad genética e identificación racial de ecotipos de aguacate (*Persea americana* Mill.) donadores de semilla para portainjertos en el Departamento de Antioquia.

Gloria Patricia Cañas Gutiérrez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D. Clara Inés Saldamando Benjumea

Codirector:

Ph.D. Rafael Eduardo Arango Isaza

Línea de Investigación:

Ecología y evolución

Grupos de Investigación:

Fitosanidad y Control Biológico

Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Doctorado en Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2018

Agradecimientos.

Quiero expresar mis agradecimientos a personas y entidades que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo del presente trabajo.

Como primera medida quiero agradecer a la Doctora Clara Inés Saldamando Benjumea, por su apoyo, paciencia y aliento constante durante el largo e interrumpido tiempo en que se desarrolló este trabajo.

A mi Codirector Rafael Arango, por su apoyo y enseñanzas desde el comienzo de mi vida profesional.

A mi madre Ethel Gutiérrez y mi tía Graciela Gutiérrez, por su cariño y comprensión por los momentos que deje de compartir con ellas cuando más me necesitaban. A mi hermana Lucero Cañas, por su paciencia, apoyo y consejo.

A mis compañeros del grupo de Biotecnología vegetal por su acompañamiento y animo en la primera etapa de este trabajo y los compañeros del grupo de Fitosanidad y Control Biológico por su apoyo y animo en la finalización de este trabajo.

Al doctor Iñaki Hormaza, a la doctora Librada Alcaraz y a la Técnica Yolanda Verdum; por su amabilidad, buena disposición y colaboración durante el desarrollo de mi pasantía en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora UMA-CSIC.

Al Doctor Alejandro Navas y demás compañeros del Laboratorio de Marcadores Moleculares del C.I. La Selva, Corpoica por haberme facilitado sus instalaciones y equipos de laboratorio para el desarrollo de parte de este trabajo; además de facilitarme las accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate.

A las Entidades financiadoras Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colciencias, Sistema General de Regalías y Universidad Nacional de Colombia.

Y por último y no menos importante a la Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB, por ser la institución que me ha permitido desarrollarme profesionalmente y donde he adquirido toda mi experiencia como investigadora.

.

Resumen.

La mejor alternativa para el éxito de un cultivo comercial de aguacate es la injertación de variedades comerciales de aceptación en el mercado, que sean seleccionadas del mismo huerto, zona o región, sobre patrones locales o criollos, ya que de esta manera se garantiza una alta adaptabilidad al pertenecer a un mismo ecosistema. Sin embargo hay que tener en cuenta la existencia de compatibilidad entre el portainjerto y la copa para que esta unión se exitosa. Uno de los aspectos más importantes para formar una unión funcional entre la copa y el portainjerto, es que ambos estén lo suficientemente relacionados taxonómicamente, es decir, genéticamente. Con el fin de identificar aguacates criollos con potencial para uso como portainjertos de acuerdo a su raza botánica y similitud genética con variedades de aguacate de interés comercial para la región, se realizó en primera medida un estudio de diversidad genética en aguacates criollos de zonas productoras del departamento de Antioquia y de algunos departamentos de Colombia, mediante su caracterización con marcadores moleculares microsatélites estandarizados para el cultivo de aguacate. Luego los aguacates criollos fueron comparados con cultivares de diversos orígenes del mundo, variedades comerciales y obsoletas y patrones de injertación conservados en condiciones *ex situ,* de la Colección de Aguacate del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora UMA-CSIC y la Colección Colombiana de Aguacate. Adicionalmente los aguacates criollos de Antioquia fueron caracterizados morfológicamente a través del uso de descriptores del árbol, las ramas y las hojas, estas características fueron correlacionadas con su caracterización molecular y con variables del paisaje como la altitud y la topografía. Finalmente se realizó la secuenciación de tres genes nucleares (endo-1-4-D-glucanasa (Celulasa), Chalcona sintasa (*CHS*) y serina-treonina-quinasa (*STK*) en los aguacates criollos de Antioquia, lo que permitió compararlos con secuencias de estos mismos genes en cultivares silvestres de diferentes países de América y variedades comerciales de raza botánica identificada, mediante análisis de redes haplotipicas, análisis de asignación bayesiana con STRUCTURE y filogenias con árboles de Máxima verosimilitud y bayesianos. En general se demostró que los aguacates criollos provenientes del

departamento de Antioquia se agrupan entre ellos dado su gran similitud genética y se separan de variedades comerciales y cultivares originarios de otros países; posiblemente por ser producto de múltiples hibridaciones entre las diferentes razas hortícolas y su estructuración genética está muy relacionada a las condiciones climáticas y ecológicas de las zonas donde se encuentran adaptadas. Adicionalmente los aguacates criollos analizados en este estudio presentaron mayor similitud genética a las razas Mexicana y Guatemalteca.

Palabras clave: Aguacate, portainjertos, diversidad genética, caracterización molecular, recursos genéticos.

Abstract.

The best alternative for the success of the crop is grafting with commercial varieties of acceptance in the market, which are selected from the same orchard, area or region, on local grafts; since in this way a high adaptability is guaranteed by belonging to the same ecosystem; however, it is necessary to take into account the existence of compatibility between the rootstock and the crown so that this union is successful.

One of the most important aspects to form a functional union between the cup and the rootstock, is that both are sufficiently related taxonomically, that is, genetically. In order to identify Criollo avocados with potential for use as rootstocks according to their botanical race and genetic similarity with avocado varieties of commercial interest for the region, a study of genetic diversity was carried out in Criollo avocados from producing areas of the region department of Antioquia and some departments of Colombia through its characterization with standardized microsatellite molecular markers for avocado cultivation; then the Criollo avocados were compared with cultivars from different origins of the world, commercial and obsolete varieties and patterns of grafting preserved in *ex situ* conditions, from the Avocado Collection of the La Subtropical and Mediterranean Hortofruticultura Institute UMA-CSIC and the Colombian Collection of Avocado.

Additionally, the Antioquia Criollos avocados were morphologically characterized through the use of descriptors of the tree, branches and leaves; these characteristics were correlated with its molecular characterization and with landscape variables such as altitude and topography.

Finally, three nuclear genes were sequenced (endo-1-4-D-glucanase (Cellulase), Chalcone synthase (CHS) and serine-threonine kinase (STK) in the Antioquia cultivars), which allowed to compare them with sequences of these same genes in wild cultivars of different countries of America and commercial varieties of identified botanical race, by analysis of haplotype networks, analysis of Bayesian assignment with STRUCTURE and phylogenies with trees of Maximum likelihood and Bayesians.

In general, it was demonstrated that the Criollo cultivars from the department of Antioquia are grouped together due to their great genetic similarity and they are separated from commercial varieties and cultivars originating from other countries; possibly because it is the product of multiple hybridizations between the different horticultural races and its

genetic structuring is very related to the climatic and ecological conditions of the areas where they are adapted. Additionally, the Criollo ecotypes analyzed in this study showed greater genetic similarity to the Mexican and Guatemalan races

Keywords: Avocado, rootstock, genetic diversity, molecular characterization, genetic resources.

Contenido.

Pág.

Resumen. VII

Lista de figuras. 15

Lista de tablas. 17

Introducción. 21

Marco teórico. 26

Objetivos. 80

Capítulo I. 83

Caracterización molecular y variabilidad genética de aguacates criollos candidatos a portainjertos, provenientes de diferentes zonas productoras de Antioquia y Colombia, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites. 83

1.1. Resumen. 84
1.2. Introducción. 85
1.3. Objetivos. 88
1.4. Materiales y métodos. 89
1.4.2. Análisis con marcadores SSR. 93
1.4.3. Análisis de datos. 95
1.5. Resultados. 98
1.5.1. Resultados obtenidos para cultivares de aguacate colectados en el departamento de Antioquia durante los años 2009 a 2011. 98
1.5.1.1. Polimorfismo SSR y diversidad genética. 98
1.5.1.2. Análisis de varianza molecular y relaciones genéticas. 100
1.5.1.3. Asignación poblacional. 102
1.5.2. Resultados obtenidos para aguacates criollos colectados en el departamento de Antioquia durante los años 2014 a 2015 y aguacates criollos de otros departamentos de Colombia. 104
1.5.2.1. Polimorfismo y diversidad genética. 104
1.5.2.2. Equilibrio Hardy Weinberg (EHW). 107
1.5.2.3. Desequilibrio de ligamiento. 109
1.5.2.4. Análisis de varianza molecular. 110
1.5.2.5. Relaciones de similitud genética entre las diferentes poblaciones. 112
1.5.2.6. Asignación poblacional. 115
1.6. Discusión. 119

1.7. Conclusiones. 125
1.8. Bibliografía. 127

Capítulo II. 131

Comparación genética del aguacate criollo colombiano con genotipos de aguacate en condiciones *ex situ* de diversos orígenes del mundo..... 131
2.1. Resumen. 132
2.2. Introducción. 133
2.3. Objetivos. 135
2.4. Materiales y Métodos. 136
2.4.2. Análisis con marcadores SSR. 136
2.4.3. Análisis de datos para aguacates criollos de Antioquia y accesiones de la Colección de La Mayora. 139
2.4.4. Análisis de similitud genética entre aguacates criollos de Antioquia y otros departamentos de Colombia y accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate. 141
2.5. Resultados. 142
2.5.1. Polimorfismo y diversidad genética. 142
2.5.2. Asignación poblacional. 147
2.5.4. Análisis de similitud genética entre aguacates criollos de Antioquia y otros departamentos de Colombia y accesiones pertenecientes de la Colección Colombiana de Aguacate. 151
2.6. Discusión. 155
2.7. Conclusiones. 161
2.8. Bibliografía. 162

Capítulo III. 165

Caracterización morfológica y molecular de aguacates criollos de aguacate del departamento de Antioquia candidatos a portainjertos. 165
3.1. Resumen. 166
3.2. Introducción. 167
3.3. Objetivos. 172
3.4. Materiales y métodos. 173
3.4.1. Material vegetal. 173
3.4.2.1. Descriptores del árbol. 176
3.4.2.2. Descriptores de las ramas: 177
3.4.2.3. Descriptores de Hoja. 178
3.4.2.4. Ambiental. 180
3.4.2.5. Paisaje. 181
3.4.3. Caracterización molecular. 181
3.4.4. Análisis de datos. 181
3.5. Resultados. 183
3.5.2. Análisis de componentes principales (PCA) para caracterización morfológica y variables del paisaje. 188
3.6. Discusión. 198

3.7. Conclusiones. 202

3.8. Bibliografía. 203

Capitulo IV. 209

Búsqueda del origen y diversidad genética de aguacates criollos del departamento de Antioquia candidatos a portainjertos, mediante la secuenciación de genes nucleares. 209
4.1. Resumen. 210
4.2. Introducción. 211
4.3. Objetivos. 215
4.4. Materiales y métodos. 216
4.4.1. Material vegetal y extracción de ADN. 216
4.4.2. Amplificación de ADN y secuenciación de genes nucleares. 216
4.4.3. Edición de las secuencias obtenidas. 217
4.4.4. Análisis de secuencias. 219

4.5. Resultados. 222
4.5.1. ADNs y secuencias de genes nucleares obtenidas. 222
4.5.2. Determinación de genotipos homocigotos y heterocigotos. 223
4.5.3. Polimorfismo y diversidad nucleotídica. 230
4.5.4. Haplotipos. 232
4.5.5. Análisis de agrupamiento bayesiano. 240
4.5.6. Filogenias con árboles de máxima verosimilitud y bayesianos. 242
4.6. Discusión. 246
4.7. Conclusiones. 251
4.8. Bibliografia. 252

5. Recomendaciones. 259

Anexos. 261

Lista de figuras.

Figura 1- 1. Agrupamiento de los 90 cultivares de aguacate colectado en los años 2009 a 2011 en el departamento de Antioquia. Dendograma basado en análisis Neighbour - Joining, usando matriz de similaridad generada por la distancia de Dice. 101
Figura 1 5. Resultado del análisis de asignación poblacional mediante el software STRUCTURE para aguacates criollos de aguacate procedentes de 12 departamentos de Colombia.....116

Figura 2-1. Dendograma UPGMA producido con distancias genéticas de Fst pareados de poblaciones de aguacates de Antioquia y accesiones de la Colección de Germoplasma de IHSM La Mayora en España. Número de K subpoblaciones obtenidas con STRUCTURE después del test de Evanno en cultivares de Antioquia y del IHSM La Mayora.....145
Figura 2- 2. Dendograma Neighbour Joining e índice de Dice por individuos 146

Figura 3- 1. Descriptores forma del árbol.....176
Figura 3- 2. Descriptores de las ramas.....177
Figura 3- 3. Descriptores distribución de las ramas. 177
Figura 3- 4. Descriptores ángulo inserción ramas.....178
Figura 3- 5. Descriptores forma hoja. 178
Figura 3- 6. Descriptores forma base hoja.....179
Figura 3- 7. Descriptores ángulo inserción peciolo foliar.....179
Figura 3- 8. Descriptores margen hojas.....179
Figura 3- 9. Descriptores forma ápice hoja. 180
Figura 3- 10. Descriptores divergencia venas primarias con respecto a vena principal. 180
Figura 3- 11. A. Muestra de cultivares representativos del Oriente antioqueño subregión Páramo. 184
Figura 3- 12. Análisis de componentes principales de los datos morfológicos tomados en 90 árboles criollos y sus elevaciones.....189
Figura 3- 13. Análisis de clúster con distancias Euclidianas de los datos morfológicos tomados en 90 árboles criollos y sus elevaciones. 190
Figura 3- 14. Análisis de componentes principales de los datos morfológicos y moleculares tomados en 90 árboles criollos y sus elevaciones. 192
Figura 3- 15. Análisis de clúster con el algoritmo de Ward de los datos morfológicos tomados en 90 aguacates criollos y sus elevaciones.....193
Figura 3- 16. Análisis de componentes principales de los datos morfológicos tomados en 90 aguacates criollos.....194
Figura 3- 17. Análisis de clúster con el algoritmo de Ward de los datos morfológicos tomados en 90 aguacates criollos. 195

Figura 3- 18. Correlación de Pearson entre la heterocigosidad esperada y el promedio topográfico de cada municipio muestreado del departamento de Antioquia. 196
Figura 3- 19. Correlación de Pearson entre la heterocigosidad esperada y el promedio de la elevación de cada municipio muestreado del departamento de Antioquia. 197

Figura 4- 1. Ejemplos de visualización de heterocigotos en cromatogramas.La figura A corresponde al locus STK del cultivar 446F-MARI y la figura B al locus STK del cultivar 176-RIO. 224
Figura 4- 2. Resultado del análisis de agrupamiento bayesiano con el software STRUCTURE para las secuencias concatenadas de los tres loci nucleares: Celulasa, CHS, STK. 241
Figura 4- 3. Árbol ML basado en la distancia T92 construido a partir de secuencias concatenadas de los genes nucleares Celulasa, CHS y STK, en cultivares de aguacate criollos de Antioquia, cultivares silvestres de México, Ecuador, República Dominicana y cultivares. Los valores Bootstrap se encuentran en negro. 244
Figura 4- 4. Árbol Bayesiano basado en la distancia de evolución General time reversal construido a partir de secuencias concatenadas de los genes nucleares Celulasa, CHS y STK, en aguacates criollos de Antioquia, cultivares silvestres de México, Ecuador. Los valores de probabilidad bayesiana se encuentran en negro. 245

Lista de tablas.

Pág.

Tabla 1. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), *P* es el número de poblaciones muestreadas, N_i es el tamaño de cada muestra y $N = \sum N_i$ es el número total de individuos. *gl*: grados de libertad, *SSD*: desviación de la suma de cuadrados, *MSD*: media de la desviación de los cuadrados, *E(MSD)*: media esperada de la desviación de los cuadrados. 53

Tabla 1- 1. Aguacates criollos de aguacate colectados en tres subregiones de Antioquia durante los años 2009 a 2011. 90
Tabla 1- 2. Aguacates criollos de aguacate colectados en seis subregiones de Antioquia durante los años 2014 y 2015. 91
Tabla 1- 3. Aguacates criollos provenientes de diferentes departamentos del país pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate. 92
Tabla 1- 4. Marcadores SSRs seleccionados para la caracterización molecular de aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2009 y 2011. 94
Tabla 1- 5. Marcadores microsatélites seleccionados para la caracterización molecular aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2014 y 2015 y aguacates criollos de varios departamentos de Colombia. 95
Tabla 1- 6. Parámetros de diversidad genética para poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011. 99
Tabla 1- 12. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de Antioquia. 107
Tabla 1- 13. Test para evaluar el EHW por cada locus en las poblaciones de Antioquia. 108
Tabla 1- 14. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de Colombia. 108
Tabla 1- 15. Test para evaluar el EHW por cada locus en las poblaciones de Colombia. 109
Tabla 1- 16. Comparaciones de marcadores ligados de acuerdo a la corrección de Bonferroni. 110
Tabla 1- 17. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo de Antioquia a nivel de localidades (municipios). 111
Tabla 1- 18. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo de Antioquia a nivel de subregiones. 111
Tabla 1- 19. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo a nivel de departamentos de Colombia. 112
Tabla 1- 20. Test de Evano obtenido para la identificación de los K clusters en los que se subdividen las poblaciones de aguacate muestreadas en 12 departamentos de Colombia. 117
Tabla 1- 21. Probabilidad de inclusión de los individuos de aguacate incorporados en diferentes K cluster, determinados por el test de Evanno. 117
Tabla 1- 22. Distribución de aguacates criollos de aguacate de los 12 departamentos de Colombia en las diferentes k poblaciones. 118

Tabla 2- 1. Listado de las 67 accesiones pertenecientes a la Colección de Germoplasma de Aguacate de la Estación Experimental La Mayora en Málaga España. 137
Tabla 2- 2. Variedades obsoletas y comerciales pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate. 138
Tabla 2- 3. Parámetros de diversidad genética para poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia y cultivares de España, USA, México, Israel y Guatemala. 143
Tabla 2- 4. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia y cultivares de España, USA, México, Israel, Guatemala y Chile. 144
Tabla 2- 5. Subpoblaciones K inferidas a través de STRUCTURE y test de Evanno para cultivares del departamento de Antioquia y accesiones de la Colección de Germoplasma de La Mayora, España. 148
Tabla 2- 6. Análisis de cuello de botella realizado en cultivares del departamento de Antioquia. Sing = Sing test. SD = standard deviation test. W = Wilcoxon test. 1t = one tail. 2t = two tail. Prob= probability. IAM = Infinite allele model. SMM = Step mutation model. TPM = Two phase model. 150

Tabla 3 1. Diferencias entre las razas de aguacate (*Persea americana* Mill.). (Barrientos y López – López, 2000). 170
Tabla 3 2. Listado de aguacates criollos del Oriente antioqueño subregión paramo, caracterizados morfológica y molecularmente con su respectivo código, altitud y topografía 173
Tabla 3-3. Listado de aguacates criollos del Oriente antioqueño subregión Altiplano, caracterizados morfológica y molecularmente con su respectivo código, altitud y topografía 174
Tabla 3 - 4. Listado de aguacates criollos del Suroeste antioqueño, caracterizados morfológica y molecularmente con su respectivo código, altitud y topografía. 175
Tabla 3-5. Análisis descriptivo de caracteres continuos correspondientes a los 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia. 183

Tabla 4- 1. Secuencias de cebadores diseñados para la amplificación de los genes nucleares Celulasa, Chalcona Sintasa (CHS) y Serina –Treonina-kinasa (STK). 217
Tabla 4- 2. Accesiones del GenBank correspondientes a cultivares de aguacate de México, Ecuador, Costa Rica, República Dominicana y Variedades comerciales utilizadas en este estudio y su asignación de raza de acuerdo a Chen et al (2009). 220

Tabla 4- 3. (a). Aguacates criollos del departamento de Antioquia analizados para el gen Celulasa. 225
Tabla 4- 4. Descripción de las posiciones de heterocigotos para el locus STK. 228
Tabla 4- 5. Descripción de las posiciones de heterocigotos para el locus *CHS*. 229
Tabla 4- 6. Descripción de las posiciones de heterocigotos para el locus Celulasa. 230
Tabla 4- 7. Resumen de estadísticos de diversidad genética obtenidos para los locus Celulasa, *CHS* y *STK* en aguacates criollos de Antioquia y cultivares de diversos orígenes y cultivares comerciales de aguacate. 231
Tabla 4- 8. Lista de haplotipos generados para el gen Celulasa en 107 cultivares de aguacate. 235
Tabla 4- 9. Lista de haplotipos generados para el gen *CHS* en 115 cultivares de aguacate. 236
Tabla 4- 10. Lista de haplotipos generados para el gen STK en 113 cultivares de aguacate. 238
Tabla 4- 11. Test de Evano realizado para aguacates criollos de Antioquia, silvestres diferentes orígenes y variedades comerciales, con las secuencias concatenadas de los tres loci nucleares: Celulasa, *CHS*, *STK,* para determinar el número de K grupos. LnP = función de verosimilitud, Var = varianza; L´k = L. 242

Lista de abreviaturas.

AFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados
AMOVA	Análisis de varianza molecular
°C	Temperatura en grados centígrados
df	Grados de libertad
F	Índice de fijación
g	Gramo
H	Haplotipos
ha	Hectárea
Ho	Heterocigosidad observada
He	Heterocigosidad esperada
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
t	Tonelada
UV	Ultravioleta
U	Unidades
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
%	Porcentaje

Introducción.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una fruta tropical con creciente aceptación en los consumidores del mundo gracias a su contenido nutricional, a las diferentes opciones para su consumo en fresco y procesado y su uso en la industria cosmética (PECTIA, 2016). Esta especie, pertenece a un cultivo compuesto por árboles tropicales y sub tropicales de la familia Lauraceae y del clado de los Magnolidos (Chanderbali et al. 2008). En términos de volumen, producción y mercado, el aguacate representa la cuarta fruta tropical más importante en el mundo (http://conectarural.org/sitio/cadena/aguacate) y su producción a nivel mundial ha mostrado tendencia al aumento en los últimos años. Según datos de la Organización de la Naciones Unidad para la alimentación y la Agricultura (2016), para el año 2013 alcanzó una producción de 4,7 millones de toneladas producidas y 516 mil hectáreas cosechadas, equivalente a un rendimiento de 9,1 t/ha; siendo México el principal país productor de aguacate con 1.467 toneladas que representan el 31% de participación en el mercado mundial seguido de República Dominicana con el 8% y Colombia con el 6% para el año 2013 (FAO, 2016). En cuanto a los principales países consumidores e importadores de aguacate, según datos del año 2013 se encuentran Estados Unidos con 571 mil toneladas correspondientes a 1.141 mil dólares, seguido por Países Bajos con 143 mil toneladas por valor de 326 mil dólares y Francia con 99 mil toneladas correspondientes a 230 mil dólares (FAO, 2016).

En Colombia, el aguacate se produce en más de 15 departamentos. Sin embargo, según cifras reportadas por las Evaluaciones Agropecuarias del MADR (2016), la producción nacional se concentra en los departamentos Tolima con 20 % de la producción, Antioquia con el 16 % y Caldas con un 13 %. En los últimos años tanto la producción como el área cosechada han mostrado tendencia al aumento, llegando a valores de 309 mil toneladas producidas en el año 2015 y 36 mil hectáreas cosechadas en el mismo año, equivalente a un rendimiento promedio a nivel nacional de 8,4 t/ha (EVA, 2015).

Específicamente, el aguacate Hass hace parte de los siete productos priorizados por el Ministerio de Comercio, Industria y Comercio a través del Programa de Transformación Productiva (PTP), para mejorar la productividad y competitividad del sector hortofrutícola colombiano gracias a ventajas como su producción durante todo el año y las oportunidades existentes en los mercados de Estados Unidos, Europa y Asia (PTP, 2013). Es así como

desde el año 2012 se ha presentado un alto dinamismo en las exportaciones de aguacate, tanto en su valor como en el peso neto exportado. En el año 2017 el valor de las exportaciones se incrementó en un 56,51% mientras que el peso neto en kilogramos de los aguacates vendidos en el exterior fue de 51,1% (Analdex, 2017). Los principales destinos de las exportaciones de aguacate colombiano fueron los Países bajos, el Reino Unido, España y Bélgica. Estos cuatro países representan un 91,47% de las ventas externas, colocando a la Unión Europea como destino principal de las exportaciones del aguacate colombiano (Analdex, 2017). En noviembre de 2017, se envió el primer cargamento de 34 toneladas de aguacate Hass colombiano a los Estados Unidos, lo que se convierte en el primer paso para explotar la gran oportunidad que tiene la agroindustria del aguacate en Colombia (Portafolio, 2017).

Por su diversidad en suelos, climas y conocimiento adquirido en el cultivo, el departamento de Antioquia se ha convertido en un nicho para el mercado de exportación de aguacate; en especial de el cultivar Hass. Pero a pesar de las grandes ventajas que presenta el cultivo del aguacate en Antioquia y del aparente crecimiento en área, producción y exportación, se desconocen aspectos claves de su sistema productivo como la identidad genética del material vegetal que se siembra, su sanidad, compatibilidad copa patrón entre otros; lo que ha llevado a que los productores tengan pérdidas significativas. De acuerdo a lo anterior, es necesario y prioritario el desarrollo de material vegetal de aguacate, genéticamente confiable y fitosanitariamente sano; que garantice huertos uniformes y buena producción.

La mejor alternativa para el éxito de un cultivo comercial de aguacate es la injertación de variedades comerciales de aceptación en el mercado, que sean seleccionadas del mismo huerto, zona o región, sobre portainjertos locales, ya que de esta manera se garantiza una alta adaptabilidad al pertenecer a un mismo ecosistema. Otro factor de suma importancia a tener en cuenta es la existencia de compatibilidad, definida como una relación genética (taxonómica) lo suficientemente cercana entre el portainjerto y la copa para que se forme una unión del injerto exitosa; suponiendo que los demás factores implícitos como técnica de injertación, temperatura entre otros son satisfactorios (Cornell University, 1999). Un aspecto importante a tener en cuenta con relación a la compatibilidad que puede existir entre portainjerto y copa en el cultivo del aguacate (*P. americana*), es su diferenciación

botánica en tres razas hortícolas: *P. americana* var. drymifolia conocida como raza Mexicana, *P. nubigena* var. guatemalensis conocida como raza Guatemalteca y *P. americana* var. americana conocida como raza Antillana (Storey, Bergh y Zentmyer, 1986). Generalmente, dentro de cada raza los cultivares tienen respuestas similares a las condiciones edáficas y climáticas; sin embargo existen varias diferencias entre las razas en cuanto a sus características morfológicas, fisiológicas y de adaptabilidad a las condiciones ambientales (Bergh, 1995; Bernal et al. 2014).

Aunque la injertación ha sido una parte importante de los cultivos perennes leñosos durante muchos años; es sorprendente el poco conocimiento que se tiene de las especies de plantas que son utilizadas como portainjertos. En los últimos años se ha presentado un incremento en el estudio de la diversidad, filogenia, filogeografía y evolución de especies de plantas domesticadas utilizadas como cultivos comerciales y su documentación; pero las especies utilizadas como portainjertos rara vez son incluidas en estos estudios (Warschefsky et al. 2016). Los portainjertos tienen una larga historia y un rol muy importante en la agricultura, pero aún permanecen muchas incógnitas sobre la diversidad y domesticación de estos; como por ejemplo: ¿Cuántos genotipos y especies son usadas como portainjertos para un cultivo determinado?, las especies utilizadas como portainjertos generalmente están relacionadas a la copa, ¿pero qué tan diferentes o similares son genéticamente a la copa que soportan?, ¿Cuáles son los orígenes geográficos, su distribución actual y frecuencia de uso de estos genotipos?, etc. (Warschefsky et al. 2016).

Dado que la compatibilidad entre la copa y el portainjerto puede ocurrir a través de amplias distancias filogenéticas, los parientes silvestres de los cultivos a injertar recobran alta significancia; de ahí la importancia de mantener colecciones significativas de parientes silvestres que representen un amplio rango de variabilidad genética, morfológica, fenológica y ecológica (Maxted y Kell, 2009). Al igual que en el mejoramiento de especies de plantas cultivables, el mejoramiento de portainjertos debe enfocar sus esfuerzos a la selección de especies silvestres, semidomesticadas y variedades locales que puedan tener características de resistencia a enfermedades, a estrés y que se adapten a ambientes locales Warschefsky et al. 2016).

El cultivo de aguacate no es la excepción en cuanto a la falta de conocimiento que se tiene sobre los portainjertos a utilizar para el establecimiento de un cultivo comercial, ya sea de el cultivar Hass o de cualquier otra variedad de aceptación en el mercado. De ahí la importancia de conocer la diversidad genética existente de árboles de aguacate con potencial como portainjertos en zonas productoras, su identidad genética, identificación racial y similitud genética existente con la copa a injertar; ya que la mayoría del material vegetal de aguacate que ha sido sembrado en el departamento de Antioquia y en la mayoría de zonas productoras del país ha sido propagado en viveros no registrados con portainjertos de origen desconocido, que poseen alta variabilidad genética y son poco aptos para los suelos en los cuales se siembran (Rodríguez et al. 2009); lo cual se ha convertido en una desventaja competitiva frente a otros países productores que ya han logrado propagar material vegetal de excelencia (Mejía, 2012).

La selección de un portainjerto adecuado debe estar en función tanto del genotipo de la copa como del entorno o zona agroclimática en la que se cultivara la planta injertada; de ahí la importancia de la selección como portainjertos de árboles de aguacate denominados comúnmente como “criollos”; su importancia se basa no solamente en su desempeño (desarrollo y productividad) en estos ecosistemas, sino también en que constituyen una fuente importante de variabilidad genética, cuya composición se hace necesario conocer. Como lo manifiesta la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y Agricultura de la FAO: los recursos genéticos constituyen la materia prima de que disponen las comunidades locales y los investigadores para aumentar la producción de alimentos y mejorar la calidad de estos.

Actualmente, no se cuenta con estudios previos suficientes sobre la diversidad genética y origen de aguacates criollos ubicados en diferentes zonas productoras de Colombia y específicamente del departamento de Antioquia; lo cual justifica el desarrollo de la presente investigación. El conocimiento de la diversidad genética del germoplasma de aguacate criollo colombiano, su identidad racial y similitud genética con variedades de aguacate de interés comercial permitirá determinar su potencial genético para la posterior formulación y ejecución de planes orientados a su conservación y mejoramiento y posteriores programas de certificación de material vegetal. En este sentido, el propósito fundamental de esta tesis fue realizar la primera caracterización molecular del aguacate

criollo colombiano, con énfasis en árboles de aguacates criollos ubicados en zonas productoras de aguacate del departamento de Antioquia y a la vez la caracterización de variedades comerciales, clones y aguacates de diversos orígenes para su posterior comparación con los aguacates colombianos teniendo en cuenta los siguientes interrogantes:

¿Qué tanta diversidad genética existe en las poblaciones de aguacates criollos ubicados en las principales zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia y que tan estructuradas genéticamente se encuentran estas poblaciones?

¿Existe similitud genética entre los aguacates criollos colombianos y aguacates de interés comercial como el Hass o clones de aguacate con características deseables para portainjertos, de forma que se puedan seleccionar aguacates criollos con potencial para su uso como portainjertos en el establecimiento de cultivos comerciales de aguacate en el departamento de Antioquia?

Dado que el aguacate ha surgido de un proceso de diferenciación genética en tres razas botánicas (Antillana, Guatemalteca y Mexicana) las cuales presentan caracteres morfológicos y de adaptabilidad a diferentes pisos térmicos, ¿es posible identificar la raza botánica a la cual pertenecen los aguacates criollos antioqueños mediante la correlación de caracteres moleculares, morfológicos y de paisaje?

¿Es posible determinar el origen del aguacate criollo colombiano mediante el uso de diversos marcadores moleculares y la comparación de estos con cultivares de aguacate de diferentes orígenes geográficos?

Marco teórico.

Clasificación botánica del aguacate.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un miembro de la antigua y numerosa Familia vegetal de las Lauráceas, la cual comprende poco más de 50 Géneros entre los que se encuentra *Persea* (Sánchez –Pérez, 1999). La familia Lauraceae comprende alrededor de 3500 especies y es una de las más primitivas de las dicotiledóneas. Estas en su mayoría son tropicales y subtropicales incluyendo el aguacate. Otros miembros sobresalientes de esta familia son el laurel, la canela y el alcanfor (Bergh y Ellstrand, 1986; Bernal y Díaz, 2005).

El género *Persea* contiene alrededor de 150 especies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales, especialmente en Asia, Islas Canarias y América, donde existen 80 especies (Bernal y Díaz, 2005). Este género a su vez se divide en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1996). La principal forma de distinción entre ellos es la presencia de pubescencia de la cara interior de los sépalos; *Persea* tiene ambas caras pubescentes mientras en E*riodaphne* la cara interna es sin pubescencia con la excepción de algunas especies (Barrientos – Priego y López –López, 1998). Sin embargo, Campos-Rojas (2007) en un análisis filogenético del genero *Persea*, basado en 40 caracteres morfológicos propuso que *Eriodaphne* y *Persea* pueden ser considerados como géneros independientes.

Persea contiene unas pocas especies estrechamente relacionadas entre sí, incluyendo a *P. americana*, el aguacate comercial. Al contrario *Eriodaphne* es bastante numeroso, variable y claramente diferenciado; contiene además algunas especies que tienen una resistencia total a la mayor enfermedad del aguacate, la pudrición de la raíz causada por el Oomicete *Phytophthora cinnamomi* (Bergh y Ellstrand, 1986; Bergh, 1992). Desafortunadamente ambos subgéneros han mostrado ser incompatibles y los intentos realizados de hibridación o injertación de *P.americana* sobre especies de *Eriodaphne* han fracasado (Bergh y Ellstrand, 1986; Bergh, 1992).

Se conocen otras especies de *Persea* como aguacatillos en diversas regiones, algunas de las cuales pueden ser usados como patrones para el aguacate, por su resistencia a

enfermedades y a otros factores adversos; entre ellas están: *Persea cinenerascens*, *Persea longipes*, *Persea chamissonis*, *Persea flocossa*, *Persea schiedeana*. En la zona andina de Colombia se encuentran las siguientes especies de *Persea*: *Persea aff rigens* C.K. Allen*, Persea* sp. Nov, *Persea subcordata* (R & P) Nees, *Persea mutisii* Kunth, *Persea ferruginea* Kunthl, *Persea caerulea* Mez (Bernal y Díaz, 2005).

Origen y dispersión.

Muchos autores coinciden en que el origen del aguacate y sus variedades tuvo lugar en el área de Mesoamérica comprendida por las partes altas del centro y este de México y partes altas de Guatemala de acuerdo con Williams, 1977 reportado por Barrientos – Priego y López –López, (1998). Sin embargo otros autores, han propuesto diversos centros de origen. Por ejemplo Popenoe (1935) reportado por Galindo-Tovar et al. (2008) propuso que el centro de origen del aguacate se debía buscar en el área que va de México al norte de Sudamérica; más tarde, Kopp (1966) y Storey et al. (1986) reportados por Galindo-Tovar et al. (2008) propusieron, con base en la gran diversidad actual y la presencia de probables aguacates silvestres, al área de Chiapas (México)- Guatemala – Honduras como centro de origen y posteriormente Bergh (1992) reportado por Galindo-Tovar et al. (2008), propuso el área centro sur de México y Guatemala. Las anteriores evidencias son circunstanciales y se fundamentan principalmente en la distribución geográfica actual de la especie, por lo que ha sido difícil esclarecer exactamente donde y cuando pudo haberse originado esta especie (Galindo-Tovar et al. 2008). Corona – Jacome et al. (2016) mediante el uso de marcadores genéticos microsatélites examinó la diversidad y relación genética del aguacate en cuatro zonas de su dispersión natural: Zaragoza, N.L., Aquila, Ver., Chochololá, Yuc, en México, así como en La Antigua Guatemala. Los resultados obtenidos han contribuido a esclarecer los procesos de dispersión del aguacate ayudados por los grandes mamíferos que migraron durante el paleoceno, debido a las glaciaciones. Según Barlow (2002), reportado por Corona – Jacome et al. (2016) la dispersión del aguacate no se podría describir sin incluir la colaboración de los grandes mamíferos, como los gonfoterios y los perezosos terrestres gigantes, que transportaron sus semillas por grandes distancias. Tapia et al. (2013), reportado por Corona – Jacome et al. (2016) sugieren que la migración de gonfoterios de América del Norte hacia América del Sur, por la costa del Pacífico y su dispersión a través del eje neovolcánico hacia la zona central de México. Esto explica la migración del aguacate desde su centro de origen en la actual

Sierra Nevada (Galindo y Arzate, 2010a) hacia Mesoamérica, donde fue encontrado por el hombre a su llegada a esta área. Estos datos y la cercana relación entre las localidades de Aquila (Veracruz) y La Antigua (Guatemala) sugieren como los aguacates provenientes del área de la Sierra Nevada fueron transportados por los grandes mamíferos en su migración de Norteamérica a Suramérica por el oeste de México. Al llegar a la zona centro ocurrió una radiación, algunos mamíferos migraron hacía el sur llevando estos aguacates hasta Guatemala y otros lo llevaron hacia el oeste de México, llegando al valle de Tehuacán y Sierra de Zongolica. De esta forma aguacates del mismo origen evolucionaron de forma diferente y posteriormente con la aparición del hombre, su domesticación dio origen a los tipos mexicano y guatemalteco. En otros periodos estos aguacates fueron llevados por el hombre a las Tierras Bajas Mayas, donde las diferencias edafoclimáticas y la domesticación dieron origen a otro tipo de aguacate que se separó de los aguacates Mexicano y Guatemalteco y dio origen al aguacate Antillano (Galindo y Arzate, 2010b). La relación del aguacate de la zona de las Tierras Bajas Mayas y el de Zaragoza (Nuevo León) se explica por un origen común, probablemente debido a la dispersión que ocurrió a la llegada del hombre y su adaptación a un clima similar.

Para Sánchez – Pérez (1999) el aguacate se dispersó desde su centro de origen hacia Norteamérica por México hasta el Sudeste de los Estados Unidos; hacia las Antillas, todo Centroamérica y gran parte de Sudamérica: Colombia, Venezuela, Las Guayanas, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. En el periodo colonial, esta especie fue llevada a las Antillas, Brasil y al sur de Europa entre los siglos XVI y XVII; a Hawái, La florida y California fue introducida en el siglo XIX; en Suráfrica, Argentina e Israel se iniciaron cultivos comerciales en la primera mitad del siglo XX (Bernal y Díaz, 2005). La dispersión tan amplia a través de las áreas de desarrollo de civilizaciones antiguas, se explica por la alta estima que los indígenas tenían por ese fruto carnoso, nutritivo y de sabor único (Sánchez –Pérez, 1999). Las múltiples hibridaciones ocurridas en diferentes ambientes ecológicos de México y Centroamérica dieron origen al aguacate comestible que se consume hoy en día, de este modo, en las regiones americanas en donde el aguacate se cultiva desde tiempos precolombinos, la producción proviene de fuentes distintas de árboles nativos o criollos y cultivares selectos reproducidos asexualmente, en los cuales el sabor y los valores nutritivos varían según el tipo ecológico. Actualmente las variedades y portainjertos que son la base de la producción en las principales áreas cultivadas en el mundo son producto

de los trabajos de exploración, colecta, conservación y evaluación realizados en el centro de origen y dispersión de la especie y de trabajos de mejoramiento genético realizados en California, Estados Unidos, Israel y Sudáfrica por citar algunos de ellos (Mijares- Oviedo y López – López, 1998).

En la actualidad el aguacate se produce en los cinco continentes, en países tropicales y subtropicales, aunque los mayores cultivos se encuentran en América, destacándose México como el primer productor mundial, seguido de Chile, República Dominicana, Estados Unidos (California y La Florida), Colombia, Perú, Brasil y Guatemala entre otros (FAO, 2012, reportado por Corpoica, 2014). En el ámbito mundial, los países importadores en su orden son: Estados Unidos, Francia, Países Bajos, Japón, Reino Unido, Alemania, Canadá, España y El Salvador (Corpoica, 2014).

Para el caso de Colombia, de acuerdo con la raza de origen, el aguacate puede crecer desde el nivel del mar hasta los 2.500 m.s.n.m, en zonas de cordillera. Durante el periodo comprendido entre los años 2012 a 2016, la producción de aguacate en Colombia ha aumentado paulatinamente; las toneladas producidas pasaron de 255.195,25 en el 2012 a 335.882,15 en 2016 y el área cultivada saltó de 27.555,48 ha a 50.982,64 ha en el mismo periodo, representando un incremento de 31,62% y 48,62%, respectivamente (Castiblanco, 2017). Según Corpoica (2014) en información suministrada por Mejía (2011), en Colombia, las variedades de aguacate se distribuyen de la siguiente manera: 49% del área total sembrada, corresponde a aguacates criollos, el 26% corresponde a el cultivar Hass y el 25% restante a aguacates tipo Papelillo y otros como Lorena, Santana, Choquette, Booth 8, Semil 40, Edranol y Trinidad. Dentro de los aguacates criollos, los departamentos de Bolívar y Cesar aportan el 59%, para el Hass el 75% está sembrado en los departamentos de Antioquia y Tolima y para los papelillos el 65% está representado por el departamento del Tolima y la región del eje cafetero. Para el año 2016, el departamento de Antioquia se situó en el primer lugar en orden de importancia en cuanto a área cosechada, producción y rendimiento de aguacate en Colombia, presentando un área sembrada de 5.780 hectáreas, con un porcentaje de participación a nivel nacional del 14.10% y una producción de 67.031 toneladas con un porcentaje de participación a nivel nacional del 19,96% (Castiblanco, 2017).

Razas hortícolas.

No se puede asegurar que las antiguas civilizaciones o grupos étnicos que participaron en el proceso de domesticación del aguacate, hayan contribuido de alguna manera a la diferenciación de *P. americana* en subespecies, pero es evidente que se dieron tipos divergentes que se desarrollaron en zonas geográficamente aisladas que finalmente dieron lugar a tipos botánicos distintos, con diferencias además en adaptación climática (Storey et al., 1986; Bergh, 1992 reportados por Sánchez - Pérez, 1999).

Estos tipos botánicos diferentes son conocidos ampliamente a nivel mundial como razas ecológicas o razas hortícolas y estas son: *P. americana* var. drymifolia conocida como raza Mexicana, *P. nubigena* var. guatemalensis conocida como raza Guatemalteca y *P. americana* var. americana conocida como raza Antillana (Storey, Bergh y Zentmyer, 1986); sin embargo, Ben-Ya'acov et al. 1995 indico que en Costa Rica existe un tipo endémico del país que se conoce como "aguacate de Monte" que se trata de una variante de la especie *P. americana* pero que es muy primitivo, y se sugiere que se le considere como una variedad botánica aparte y se propone como raza Costarricense.

La conclusión taxonómica de la existencia de tres razas botánicas fue bien fortalecida en las décadas de los años 80 y 90 mediante el análisis de marcadores genéticos como isoenzimas, huella genética y RFLPs (Gold-ring et al. 1985; Torres and Bergh, 1980; Lavi et al. 1991; Furnier et al. 1990 reportados por Mhameed et al. 1997. Por otra parte Bergh (1995) reportado por Barrientos – Priego y López –López, (1998) indicó que las tres razas de aguacate son genéticamente equidistantes. Dicha afirmación fue corroborada mediante la técnica RAPD (Amplificación al azar de ADN genómico) por Bufler y Fiedler (1996) reportado por Barrientos – Priego y López –López, (1998). Existe evidencia genética que soporta la teoría de que las tres razas son variantes de una misma especie, ya que todas presentan el mismo número de cromosomas somáticos 2n=24 (Storey, Bergh y Zentmyer, 1986). La hibridación entre ellas ocurre con facilidad y sus híbridos obtienen ventajas de adaptación climática, así como características agronómicas mejoradas (Bergh, 1992 reportado por Sánchez - Pérez, 1999).

Las razas Mexicana y Guatemalteca se originaron y domesticaron en las tierras altas de México y Guatemala respectivamente (Storey, Bergh y Zentmyer, 1986; Berg, 1992 reportado por Sánchez - Pérez, 1999) mientras la raza Antillana probablemente tuvo su origen en la costa del Pacifico de Centroamérica, desde Guatemala hasta Costa Rica (Storey, Bergh y Zentmyer, 1986). Cada una de las razas presenta determinadas características; por ejemplo la mexicana y guatemalteca se caracterizan por tolerar temperaturas muy bajas, incluyendo heladas y por adaptarse a suelos muy bien drenados y con nivel freático profundo. La raza Antillana se adapta a zonas tropicales y tierras bajas y climas cálidos y secos, son resistentes a suelos salinos y tolerantes a dos enfermedades como son la roya y la antracnosis (Bernal y Díaz, 2005). Adicionalmente, estos grupos ecológicos también se diferencian en su época de floración, época de recolección, contenido de aceite en la pulpa y tipo de corteza; sin embargo cuando se está en presencia de híbridos naturales, entre grupos ecológicos diferentes, resulta difícil su ubicación (Bergh y Ellstrand, 1986 reportado por Mhameed, 1997; Lima et al. 1988 reportado por Gonzales et al., 2002).

Raza Mexicana.

Esta raza se caracteriza por su adaptabilidad a climas muy fríos, soportando temperaturas de hasta 2,2°C, teniendo como temperaturas optimas de 5 a 17 °C y alturas superiores a 1.700 m.s.n.m. En cuanto a sus características morfológicas presenta hojas más pequeñas que las otras razas, alargadas y con glándulas que contienen aceites esenciales que al presionarlas desprende olor a anís. Sus flores son pubescentes, frutos pequeños entre 80 a 250 g con cascara delgada y superficie lisa, sus tonalidades son verde claro, pero algunas variedades presentan coloraciones rojas, moradas o casi negras. En la figura 1a, podemos observar un fruto característico de esta raza. La pulpa es de muy baja cantidad de fibra, con un sabor muy característico a nuez. Algunas de las variedades de aguacate pertenecientes a esta raza son: Puebla, Duke, Gottfried, zutano, Bacon y Topa-Topa (Bernal y Díaz, 2005).

Raza Guatemalteca.

Se adapta a condiciones subtropicales, con temperaturas óptimas de 4 a 19°C y alturas entre los 1.000 y 2.000 m.s.n.m.; en cuanto a sus características morfológicas presenta hojas sin olor a anís, de mayor tamaño que las de la raza Mexicana y de color verde más

oscuro. Los frutos son de forma esférica, ovalada o piriforme; su corteza es gruesa, de consistencia correosa, dura hasta casi leñosa y quebradiza. Su color es verde opaco, hasta morado oscuro cuando está maduro, los frutos pueden ser medianos y grandes, la pulpa es algo fibrosa; en la figura 1b se pueden observar las características del fruto. La calidad de la fruta y su contenido de grasa del 20% superan a la raza Antillana y sus frutos no se caen tan fácilmente del árbol como en las otras razas. Algunas de las variedades de aguacate pertenecientes a esta raza son: Hass, Reed, Edranol, Itzamna, Linda, Nabal, Pinkerton y Mayapan (Bernal y Díaz, 2005).

Raza Antillana.

Se adapta a temperaturas entre 18 y 26°C. Los árboles de esta raza no toleran el frío y mueren cuando la temperatura fluctúa entre los 2,2 y 4°C; en el trópico se adaptan a alturas por debajo de los 1.000 m.s.n.m. Una de las principales características morfológicas de esta raza es el gran tamaño de sus frutos que pueden estar entre 250 a 2.500 g de peso, con formas ovaladas, redondas o piriformes; son de corteza brillante tersa o correosa, flexible, delgada, no granular; sus colores pueden ser verde, verde amarillento, verde brillante o amarillo rojizo. Poseen pulpa muy baja en grasa y alta en azúcar, en la figura 1c se puede observar un fruto característico de esta raza. Las hojas de estas variedades no son aromáticas. Como variedades pertenecientes a esta raza se encuentran: Lorena, Peterson, Simmonds, Trapp y Pollock (Bernal y Díaz, 2005).

Raza Costarricense.

Se adapta a condiciones subtropicales de Costa Rica y no se conocen caracteres de interés hasta ahora. Observaciones hechas a nivel de campo en Costa Rica, indican que la semilla es redonda como la raza Guatemalteca, la cascara como la raza Antillana y las hojas son medianas a pequeñas similares a la raza Mexicana pero sin olor a anís (Barrientos – Priego y López, 2007).En la figura 1d se puede observar un fruto perteneciente a esta raza.

Figura 1. Frutos de aguacate de las diferentes razas de *Persea americana* Mill.

Figura 1 a. Fruto característico de la raza Mexicana

Figura 1 b. Fruto característico de la raza Guatemalteca

Figura 1 c. Fruto característico de la raza Antillana

Figura 1 d. Fruto característico de la raza Costarricense

Fuente: Salvador Ochoa Asencio

Razas híbridas.

Debido a que el aguacate presenta alta alogamia (polinización cruzada) y adicionalmente las tres razas poseen un genoma muy parecido (2n=24), la hibridación entre ellas ocurre con facilidad ya sea en forma natural o artificial; además sus híbridos obtienen ventajas de adaptación climática, así como características agronómicas mejoradas (Bergh, 1992 reportado por Sánchez - Pérez, 1999; Bernal y Díaz, 2005). Se cuenta con la presencia de cultivares híbridos de la raza Mexicana por Guatemalteca, estos híbridos de aguacate combinan características como la resistencia al frío aportada por los mexicanos con el tamaño de los guatemaltecos; como resultado, se obtienen frutos de tamaño intermedio y la época de maduración también tiende a ser intermedia. Algunas de las variedades de aguacate hibridas de estas razas son: Fuerte, Ettinger, Colin V-33 (Bernal y Díaz, 2005). También existen híbridos de la raza Guatemalteca con Antillana; estos combinan las características de los guatemaltecos como resistencia al frío, con el tamaño de los antillanos; como resultado de la combinación se obtienen frutos de tamaño intermedio entre el de sus padres, la época de maduración también tiende a ser intermedia. Algunas de las variedades de aguacate hibridas de estas razas son: Booth 8, Choquette, Colinred, Collinson, Gripiña, Semil 44, Trinidad, Hall, Winslowson, Santana (Bernal y Díaz, 2005).

Diversidad genética.

A través de miles de años se ha dado un proceso que ha generado una gran diversidad genética en el aguacate (Ben Ya'acov, 1992). Decenas de miles de árboles silvestres provenientes de semilla existen actualmente bajo condiciones ecológicas muy variadas. La selección tanto natural como la del hombre durante miles de años, ha producido tipos adaptados a esas regiones (Ben Ya'acov, 1992; Gama y Gómez, 1992 reportado por Sánchez - Pérez, 1999). Por ser el aguacate una especie de polinización abierta contiene una gran variabilidad genética con posibilidades casi ilimitadas para su aprovechamiento (Bergh, 1992; Zentmyer y Schieber, 1992 reportados por Sánchez - Pérez, 1999).

En la mayoría de zonas productivas de varios países, en los que se incluye Colombia, existe una distribución de poblaciones de aguacate heterogénea o de gran diversidad en tamaño, forma y color de frutos; esto debido a que su explotación se ha realizado como cultivo asociado y propagado por semilla (Avilán et al. 1980 reportado por Soto et al. 2007)

lo que ha dado origen a una serie de árboles nativos o criollos y cultivares selectos reproducidos asexualmente, en los cuales el sabor y los valores nutritivos varían según el tipo ecológico (Mijares y López, 1998).

Propagación del aguacate.

La propagación por injerto es el método más apropiado para reproducir las variedades seleccionadas de cultivo comercial, ya que los árboles injertados son uniformes en cuanto a la calidad, forma y tamaño de la fruta (Anacafe, 2004). Los aguacates no injertados suelen tardar mucho tiempo en dar sus frutos; sin embargo y en el caso de los aguacates injertados, a los dos años es posible obtener una gran carga de aguacates. Al ser un medio indispensable para propagar la planta de aguacate; el injerto resulta ser prácticamente el único a través del cual, se puede adquirir las variedades de aguacates que se quieran plantar, ya que cuando son plantadas y después de un mes, las semillas tienden a perder su vitalidad y suelen tardar entre 10-15 años para que el árbol se desarrolle completamente y de sus frutos. Comúnmente, la injertación de cultivares comerciales de aguacate se realiza sobre portainjertos francos (originados por semilla), por lo tanto presentan una alta heterocigosis que resulta en huertos heterogéneos en cuanto a comportamiento y productividad; por tal motivo, reviste vital importancia la elección de un buen portainjerto, ya que de él puede depender el éxito o fracaso de una plantación (Barrientos–Priego et al., 2000). El injerto es la unión de dos porciones de tejido vegetal viviente para que se desarrolle como una sola planta. Predecir el resultado de un injerto es muy complicado, de modo general se puede decir que el éxito del injerto va íntimamente ligado a la afinidad botánica de los materiales que se injertan.

Compatibilidad portainjerto – copa.

No existe una definición precisa para la compatibilidad del injerto; pero la realidad es la creación de una planta, cuyas raíces tienen que crecer y desarrollarse con la savia que le sintetizan los órganos verdes de la otra planta, que a la vez crece y se desarrolla con la savia que le suministra una raíz que no es la suya. A esa capacidad de unión de dos plantas para desarrollarse de modo satisfactorio desde el punto de vista de la producción como una sola planta compuesta, se le llama compatibilidad (Camacho – Ferre y Fernández – Rodríguez, 2000 reportado por Bernal et al. 2014). Es difícil definir entre la compatibilidad e incompatibilidad de un injerto; desde especies que se unen con facilidad

hasta otras que son incapaces de unirse, hay una gama intermedia de posibilidades, que aun uniendo en un principio, muestran síntomas de falta de afinidad, bien en la zona del injerto o en sus hábitos decrecimiento (Camacho – Ferre y Fernández – Rodríguez, 2000 reportado por Bernal et al. 2014). Algunos de los síntomas que se pueden manifestar en caso de incompatibilidad son los siguientes:

- Porcentaje bajo en el prendimiento del injerto
- Amarillamiento en hojas, a veces defoliación y falta de crecimiento.
- Muerte prematura de la planta injertada
- Diferencias en la tasa de crecimiento entre portainjerto e injerto.
- Formación de un desarrollo excesivo en torno a la unión del injerto.
- Ruptura por la zona de unión del injerto. (Camacho – Ferre y Fernández – Rodríguez, 2000 reportado por Bernal et al. 2014).

Uno de los aspectos más importantes para formar una unión funcional entre la copa y el portainjerto, es que ambos estén lo suficientemente relacionados taxonómicamente, es decir, genéticamente. El grado de relación necesario para la compatibilidad (límites entre la compatibilidad) varía entre los diferentes taxones (especies, géneros, familias) (Cornell University, 1999). Por ejemplo los homoinjertos (autoinjertos), son presumiblemente siempre compatibles; en heteroinjertos (injertos intraespecíficos), el portainjerto y la copa pertenecen a la misma especie botánica y son casi siempre compatibles, los injertos interespecíficos (portainjerto y copa pertenecen a especies del mismo género), son generalmente compatibles; los injertos intrafamiliares rara vez son compatibles y los interfamiliares siempre son incompatibles (Mudge et al., 2009 reportado por Goldschmidt, 2014).

Portainjertos.

Aunque la injertación ha sido un aspecto básico e importante de los cultivos leñosos perennes como muchos frutales durante al menos 2000 años, es sorprendente que se tenga muy poco conocimiento sobre las especies de plantas que se utilizan como portainjertos (Warschefsky et al. 2016).

Los portainjertos tienen una larga historia y un papel muy importante en la agricultura; sin embargo hay muchas preguntas sobre su diversidad y domesticación que aún permanecen sin resolver como las siguientes: ¿Cuántos genotipos y especies se utilizan como portainjertos para un cultivo determinado y que tan estrechamente relacionados están con las especies utilizadas como copa?, ¿Cuáles son los orígenes geográficos, sus distribuciones actuales y la frecuencia de uso de estos genotipos? ¿Qué signos de domesticación hay a nivel morfológico y genético en los portainjertos? (Warschefsky et al. 2016).

Diversidad en los portainjertos.

A pesar del crecimiento en documentación y literatura relacionada con estudios en diversidad y filogeografía de especies de plantas cultivadas y su evolución bajo domesticación incluidas plantas leñosas perennes utilizadas comúnmente como copas; las especies de portainjertos son raramente consideradas (McKey et al.2010 reportado por (Warschefsky et al. 2016). Algunas de las tendencias actuales en cuanto a la diversidad y domesticación de los portainjertos son las siguientes: (i) las especies de portainjertos están estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas a las especies de las copas que ellos soportan (ii) para un solo cultivo, múltiples especies y sus híbridos derivados son utilizados para generar portainjertos, aunque en última instancia son pocos los genotipos de portainjertos que son utilizados para un cultivo dado en muchos de los sistemas agrícolas contemporáneos, (iii) la selección del portainjerto debe ser en función del genotipo de la copa con la que será injertado y con el ambiente en el cual la planta cultivada se desarrollara, (iv) la selección del portainjerto no solo debe incluir características del sistema radicular, también rasgos impartidos a la copa (Warschefsky et al. 2016).

Evolución de especies de portainjertos bajo domesticación.

Se considera que las especies de portainjertos están en domesticación porque son parte de una relación mutualista entre humanos y plantas que mejora las condiciones de ambos, es decir, domesticado y domesticador (Zeder, 2015 reportado por Warschefsky et al. 2016).

Aunque la selección de portainjertos se ha enfocado a características específicas, no existe una descripción formal de un “síndrome de domesticación” para especies de portainjertos. Además hay muy pocos estudios morfológicos o genéticos comparativos entre portainjertos y sus ancestros silvestres como para inferir signos de su domesticación. Muchos portainjertos se han derivado de cruces entre especies perennes y sus silvestres, por lo tanto, presentan características de plantas domesticadas, incluyendo altos niveles de heterocigosidad y una extensa propagación clonal (Zohary. and Spiegel-Roy,1975, Miller and Gross, 2011 reportados por Warschefsky et al. 2016). Sin embargo las especies de portainjertos son diferentes a las especies domesticadas, en que mientras algunas características bajo selección son directamente expresadas en el mismo portainjerto (ejemplo resistencia a patógenos) otros son expresados en el vástago a injertar (Warschefsky et al. 2016).

En general la injertación afecta tres procesos principales de la planta: captación y transporte de agua y nutrientes, producción y transporte de hormonas y movimiento a gran escala de proteínas, ARNs mensajeros, pequeños ARNs; estos procesos tienen implicaciones tanto para el funcionamiento en el subsuelo como en la superficie, pero la interconexión del trabajo de las variables en la interacción entre el portainjerto y la copa (genotipo del portainjerto, genotipo de la copa y ambiente), oculta al individuo contribuciones a la variación fenotípica (Tworkoski and Miller, 2007; Amiri, et al. 2014 reportados por Warschefsky et al. 2016). Ciertamente, los genotipos tanto de portainjerto como de copa juegan un papel importante en estas interacciones y diferentes combinaciones entre portainjerto y copa se saben que varían su efecto fenotípico (Goldschmidt, 2014). Factores adicionales que afectan la interacción del portainjerto y la copa son: la edad de los individuos a injertar, la técnica de injertación empleada, estacionalidad, tiempo desde la injertación, genotipo, interacción ambiente genotipo, interacciones ambientales, morfología de la raíz y arquitectura (Albacete et al. 2015), grado de compatibilidad entre la copa y el portainjerto e interacciones microorganismos – raíz (Warschefsky et al. 2016).

Portainjertos en aguacate.

Los atributos más importantes que deben tener los portainjertos en aguacate son la resistencia a *Phytophthora cinnamomi*, la tolerancia a la salinidad, la adaptabilidad a suelos calcáreos y que sean árboles de porte bajo, con producciones altamente sustentables (Whiley, 1992 reportado por Bernal et al. 2014). El primer programa de selección de portainjertos de aguacate se basó en la productividad y fue iniciado en los años 40 por F.F. Halma. Sin embargo cuando en 1.942 se descubrió que *P. cinnamomi* era un patógeno devastador en las raíces de los aguacates californianos, Zentmyer enfoco la selección de portainjertos, no a la productividad, si no a la búsqueda de la resistencia a la enfermedad (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995 reportados por Bernal et al. 2014).

Uno de los aspectos más estudiados en aguacate es la búsqueda de portainjertos con resistencia o tolerancia a *P.cinnamomi;* aunque se han encontrado especies o subespecies del genero *Persea* tolerantes a este hongo del suelo, estas son incompatibles con el aguacate. El Duke 7 es el cultivar más reconocido internacionalmente como sobresaliente para ser utilizado como portainjerto (Téliz, 2000). Otros portainjertos de raza Mexicana que se destacan por tolerancia a esta enfermedad son: Barr Duke, proveniente de un árbol de semilla de Duke 6, desarrollado en California, D y 9, obtenido mediante irradiación de rayos gama de yemas de Duke con características enanizantes, Duke 6, árbol de semilla obtenido a partir de semillas de Duke, el Thomas recuperado de un escape del cultivar Fuerte, considerado uno de los portainjertos más resistentes a *P.cinnamomi*, pero susceptible a *P. citrícola*. Con respecto a la raza Guatemalteca sobresale Martin Grande, obtenido a través de hibridación de *P. americana* con *P.schideana* y también Velvick obtenido en Australia a partir de árboles de semilla (Newett et al. 2007 reportado por Bernal et al. 2014).

Otros portainjertos con atributos para otras características de interés son por ejemplo el portainjerto VC 51 de la raza Antillana, el cual fue seleccionado por sus buenas perspectivas de tolerancia a sequia (Téliz, 2000), el cultivar Colin V-33, este se ha caracterizado por su baja altura y por ser inductor de esta característica (Téliz, 2000). En cuanto a la tolerancia a suelos calcáreos, se ha encontrado que la raza Guatemalteca es la más susceptible a la clorosis producida por el efecto de suelos calcáreos; estudios realizados en Israel desde la década de los años 60, selecciono como portainjertos

tolerantes o resistentes a este factor los materiales Znfin 67 y Maoz de la raza Antillana (Téliz, 2000). En cuanto al efecto del portainjerto sobre la productividad, la combinación más adecuada es la utilización tanto de portainjerto como de copa de la misma raza o zona climática, ya que de esta manera hay mayor compatibilidad y mayor expresión de las características de la copa, incluyendo aumento de la producción (Téliz, 2000).

Para el caso de Colombia, no se reportan portainjertos para aguacate; sin embargo se han identificado árboles nativos en zonas de alta pluviosidad como es el caso de la Costa Pacífica, Putumayo, Tolima y Sierra Nevada de Santa Marta (Bernal et al. 2014). Ríos – Castaño et al (2005), reportan algunos portainjertos para su uso en Colombia entre los que se destacan los Antillanos: La Torre seleccionado del corregimiento La Torre en Palmira Valle del Cauca; presenta tolerancia a salinidad y alcalinidad y no presenta incompatibilidad con ninguna de las variedades comerciales. Tumaco, recolectado en Tumaco Nariño en el año 1936; se caracteriza por tener un sistema radical amplio que le da una ventaja en suelos de mayor contenido de arcillas, es tolerante a salinidad y alcalinidad y tampoco presenta incompatibilidad con ninguna de las variedades comerciales. Villagorgona proveniente del corregimiento del mismo nombre en el municipio de Candelaria Valle del Cauca; como portainjerto ofrece la ventaja de poseer una semilla grande para el manejo y desarrollo en vivero; al igual que los otros portainjertos presenta tolerancia a la salinidad y alcalinidad y no incompatibilidad con variedades comerciales.

Selección de material vegetal.

Los recursos genéticos del aguacate son una fuente única de genes (caracteres) que pueden utilizarse para el mejoramiento genético de cultivares, injertos e interinjertos (Barrientos-Priego y López, 2007). Además uno de los aspectos fundamentales para el éxito de un cultivo comercial de aguacate es la selección adecuada de las variedades a sembrar, ya que con ello se consigue:

a. Garantizar continuidad en la producción y alargamiento de los periodos de cosecha.
b. Manejar adecuadamente su comercialización al ofrecer suministro más estable para el mercado.

c. Obtener mayores volúmenes de cosecha y por consiguiente mayor rentabilidad, con la correcta selección de variedades.
d. Disminuir el riesgo de los problemas ocasionados por plagas y enfermedades, garantizar mejor desarrollo del cultivo y la mayor calidad de la fruta (Ríos-Castaño, 2003).

La selección de plantas con ciertas características deseadas ha sido siempre uno de los aspectos de mayor relevancia para los mejoradores genéticos (Lander y Botstein, 1989; Moreno -Gonzales, 1993; Nei y Li, 1979 reportados por IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001). Este proceso de selección de plantas con caracteres agronómicos distintos, con los años resultaba en la obtención de una colección de individuos con características superiores, en función de rendimiento, adaptabilidad, resistencia a plagas y contenido nutricional. Sin embargo este proceso de selección clásico se basa en características morfológicas de las plantas o marcadores morfológicos, en donde las particularidades de las plantas esperadas no podían ser cuantificadas. Además, no existía garantía de que las características cualitativas reflejadas por las plantas élites eran una respuesta a una expresión genética (IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001).

En muchos casos, la existencia de plantas con morfología distinta y con un incremento de rendimiento no se debía a su asociación directa con los marcadores sino a una causa indirecta como el aumento de la densidad de plantas en el cultivo o del nivel de fertilización (IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001). Con la disponibilidad de tecnologías más precisas como los marcadores genéticos, se hacen más fácil los trabajos de mejoramiento y selección de cultivos; ya que ellos son entidades heredables que están asociados a caracteres de importancia económica que han sido utilizados en la selección y evaluación de los bancos de germoplasma para diferentes cultivos (Staub et al. 1982; Darvasi y Soller, 1994 reportados por Rodríguez-Medina et al., 2003).

Importancia del uso de marcadores moleculares en plantas.

La selección de plantas con ciertas características deseadas ha sido siempre uno de los aspectos de mayor relevancia para los mejoradores genéticos (Lander y Botstein, 1989; Moreno -Gonzales, 1993; Nei y Li, 1979 reportados por IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001). Este proceso de selección de plantas con caracteres agronómicos distintos, con los años

resultaba en la obtención de una colección de individuos con características superiores, en función de rendimiento, adaptabilidad, resistencia a plagas y contenido nutricional. Sin embargo, este proceso de selección clásico se basa en características morfológicas de las plantas o marcadores morfológicos, en donde las particularidades de las plantas esperadas no podían ser cuantificadas. Además, no existía garantía de que las características cualitativas reflejadas por las plantas élites eran una respuesta a una expresión genética (IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001).

En la actualidad con la disponibilidad de tecnologías más precisas como los marcadores genéticos o moleculares, se ha hecho más fácil la realización de trabajos de mejoramiento y selección de cultivos; ya que ellos son entidades heredables que están asociados a caracteres de importancia económica que han sido utilizados en la selección y evaluación de los bancos de germoplasma para diferentes cultivos (Staub et al., 1982; Darvasi y Soller, 1994 reportados por Rodríguez-Medina et al., 2003).

Algunos de los usos de los marcadores genéticos o moleculares son:
a) Estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos (IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001).
b) Discriminación de variedades, líneas puras e híbridos, lo cual se puede utilizar para proteger los derechos del obtentor vegetal en el registro de variedades protegidas IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001).
c) Permiten determinar las vías de transmisión genética de padres a progenie (Clegg, Kobayashi and Lin, 1999).

Uso de marcadores moleculares en aguacate.

Entre los marcadores genéticos más utilizados para adelantar estudios de caracterización genética y filogenia se encuentran algunas isoenzimas, usadas desde la década de los años 70 (Dudley, 1994 reportados por IDIAF, CEPOC y Ferquido, 2001); también están los marcadores basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como los del tipo Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs), los cuales fueron desarrollados en los años 80 (Stuber, 1994) y más recientemente los de tipo ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Arus y Moreno-Gonzales, 1993), Marcadores

Microsatélites (Schnell et al., 2003), DNA fingerprint (DFP) (Lavi et al. 1991), Secuencias simples de ADN repetidas (SSR) (Lavi et al. 1994) y los de polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Vos et al. 1995).

Para el caso específico del aguacate se han desarrollado estudios en varios de los países productores cuyo objetivo ha sido conocer su origen mediante la caracterización molecular de árboles nativos y colecciones existentes en diferentes estaciones experimentales y zonas productoras. Bergh y Ellstrand (1987) reportados por Barrientos y López, (2007) hicieron una clasificación muy acertada de las razas de aguacate, agrupando a la raza Mexicana como la variedad botánica drymifolia (*Persea americana* Mill. var. drymifolia), la raza Guatemalteca como var. guatemalensis (*Persea americana* Mill. var. guatemalensis) y la raza Antillana como var. Americana (*Persea americana* Mill. var. americana). Por otra parte Bergh (1992) indicó que las tres razas de aguacate son genéticamente equidistantes.

En un estudio de taxonomía numérica de 67 características en cultivares de aguacate, se encontró una mayor relación filogenética entre los aguacates de la raza Antillana y Guatemalteca, que entre Antillanos y Mexicanos (Rhoddes et al. 1971); de igual manera García e Ichikawa (1979) estudiando diagramas de dispersión de 15 características morfológicas encontraron esta misma relación, al igual que con isoenzimas (García y Tsunewaki, 1977). Por otra parte Scora et al. (1975) analizaron alcanos de las hojas de aguacate y encontraron que la raza Guatemalteca y Mexicana se separan bien de la raza Antillana. En forma similar, se ha encontrado que la técnica de electroforesis de isoenzimas que la raza Antillana es más distante filogenéticamente que la raza Guatemalteca y la Mexicana (Bergh et al. 1989). Sin embargo Bufler y Ben-Ya'acov (1992), analizaron la variación en la repetición de longitud y sitios de restricción de ADN ribosomal en hojas de las tres razas de aguacate, encontrando que existe una ligera mayor relación filogenética entre la raza Guatemalteca y Antillana, aunque las tres razas son prácticamente equidistantes entre sí de acuerdo a análisis mediante RAPD en ADN (Bufler y Fiedler, 1996; reportados por Barrientos y López (2007).

En 1991 Lavi y colaboradores usaron sondas minisatélites para la identificación de cultivares de aguacate. La relación genética entre razas fue determinada por el patrón de bandas de mezclas de ADN que representaban las razas. La raza Mexicana y Antillana resultaron estar menos relacionadas al ser comparadas con la Mexicana y Guatemalteca

y Guatemalteca y Antillana las cuales resultaron ser las más cercanas. En 1994 el mismo autor generó marcadores SSR, basados en la construcción de una librería genómica de ADN a partir de aguacate del cultivar Hass, los cuales resultaron ser heredados en un modelo Mendeliano.

Marcadores como SSR, RAPD y DFP fueron útiles en la construcción de un mapa genético de aguacate, el cual fue inicialmente realizado como base para el desarrollo de un mapa genético más detallado y para la detección de la relación existente entre marcadores y caracteres cuantitativos (Sharon et al. 1997). Basados en este mapa Schnell et al. (2003) estimaron la diversidad genética por medio de marcadores microsatélites dentro de una gran colección de aguacate mantenida en la USDA y NGR en Miami Florida y un sub grupo de la colección mantenida en la SCFS por la Universidad de California; el objetivo de este estudio fue encontrar poblaciones de interés dentro de la raza Antillana, de la cual se conoce presenta genes de resistencia a pudriciones de la raíz causadas por *Phytophthora* spp, encontrándose una mayor diversidad genética en las razas Mexicana y Guatemalteca, mientras que la Antillana presentó menor diversidad; lo que demuestra según los autores la necesidad de colectar más germoplasma de esta raza para ampliar la diversidad genética y enfatizar en la identificación de individuos que confieren resistencia a *Phytophthora* spp. Basados en la información disponible existente Viruel, Gross y Barceló-Muñoz (2007) desarrollaron un mapa genético parcial más completo que el reportado por Sharon et al., (1997) que incluye además de los SSRs ya publicados, otros de nuevo desarrollo, así como marcadores AFLP.

Otro ejemplo de marcadores moleculares en aguacate fue el uso de RAPD para análisis cuantitativo de autocruzamiento y producción en huertos del cultivar Hass ubicados en el sur de California. En el mismo estudio este tipo de marcadores fueron utilizados para analizar fuentes potenciales de polen. Análisis de regresión lineal de datos obtenidos en campo indicaron que la variedad Fuerte fue la principal fuente de polen para árboles madre de Hass, independientemente de la región climática, además la rata de autocruzamiento fue fuertemente dependiente de la distancia de la potencial fuente polen. Se presentó un débil relación entre autocruzamiento y producción, lo que indica que esta se debe a otras causas (Kobayyashi et al. 2000).

En Cuba, Rodríguez y colaboradores (2003) compararon los niveles de polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad de caracteres morfoagronómicos y marcadores AFLP, ISTR, SSR e isoenzimas, empleando 17 genotipos de la colección de germoplasma del IIFT ubicado en la ciudad de la Habana. Los tres marcadores de ADN utilizados, además de ser altamente reproducibles discriminaron de forma efectiva todos los genotipos; sin embargo los patrones isoenzimáticos desarrollados en el estudio también demostraron una alta capacidad para la discriminación de accesiones; por lo cual pueden también ser de utilidad para la identificación de cultivares en aguacate.
Los marcadores microsatélites representan otros marcadores moleculares usados ampliamente en estudios genéticos del aguacate. Schnell y colaboradores (2003) investigaron la variación genética entre 224 accesiones conservadas en el NGR (National Germoplasm Repository) en Miami Florida y un grupo de 34 clones ubicados en el SCFS (University of California South Coast Field Station) localizado en Irvine California usando 14 loci microsatélites. Aunque se obtuvo la presencia de varios alelos únicos, no se encontró un marcado específico para raza; sin embargo se observó concordancia entre las razas hortícolas y los grupos formados a partir de los datos moleculares observados. La raza Guatemalteca y Mexicana formaron dos grupos diferentes al igual que la raza Antillana.

Otro ejemplo de uso de marcadores microsatélites en aguacate es el estudio realizado por Kwame Acheampong et al. (2008), el cual consistió en conocer el origen, raza y relación genética de 172 cultivares de aguacate de Ghana procedentes de diferentes fincas mediante el uso de 12 marcadores microsatélites. En este estudio se encontró que los cultivares de Ghana están genéticamente más cercanos a la raza Antillana pero distinguiéndose de la raza Mexicana y Guatemalteca, lo que propone que posiblemente las otras razas no pudieron sobrevivir debido a las condiciones ambientales de este país.

Alcaraz y Hormaza (2007) caracterizaron molecularmente 75 accesiones de aguacate pertenecientes a la colección de germoplasma del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora, ubicada en Málaga España y la cual posee accesiones de diferentes países, mediante el uso de 16 microsatélites previamente reportados para aguacate por Sharon et al. (1997) y Ashworth et al., (2004). Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el grupo de marcadores utilizados fueron altamente informativos.

En México, Cuiris – Pérez y colaboradores (2009) también utilizaron este tipo de marcadores para determinar la diversidad genética entre 77 accesiones de la raza Mexicana pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). En este estudio se determinó la utilidad de los marcadores microsatélites en la determinación de diversidad genética en aguacate; y en el 2011 Galindo-Tovar y colaboradores utilizaron también marcadores microsatélites para analizar las relaciones genéticas de 44 árboles de *P. americana* de 7 localidades de la zona Centro del estado de Veracruz, encontrándose baja diferenciación genética entre las localidades y agrupaciones definidas por características de altitud, clima y suelo.

Más recientemente Boza et al. (2018) utilizaron 55 marcadores microsatélites para caracterizar la estructura poblacional, diversidad genética y mezcla interracial de 354 árboles de aguacate (*P. americana*) y otras especies del genero *Persea* como *P. nubigena*, *P. krugii* y *P. schiedeana* de la Estación Experimental de Horticultura Subtropical USDA-ARS en Miami Florida y algunos colectados en México; encontrándose una mayor fuente de variación a nivel de individuos que de poblaciones y una estructura poblacional dada por las tres razas botánicas, *P. schiedeana* y mezclas interraciales complejas.

La utilización de AFLP en estudios de diversidad genética de aguacate ha logrado diferenciar accesiones de bancos de germoplasma de acuerdo con sus tres grupos o razas de origen. La eficacia y facilidad de utilización de estos marcadores en aguacate fue demostrado por Chao et al. (2003) quienes analizaron las relaciones genéticas entre 37 accesiones de aguacates de California y 42 de México; en este estudio los AFLP permitieron identificar individualmente todas las muestras, adicionalmente el estudio de las accesiones de California indico que existen otras divisiones dentro de los aguacates mexicanos y antillanos.

Adicional a estas investigaciones no existían estudios sobre la diversidad genética dentro de razas. Sin embargo, Gutiérrez-Diez et al. (2009) demostraron la utilidad de AFLP para estimar la diversidad genética inter varietal de la raza Mexicana de *P. americana* cuando los datos moleculares se combinan con datos morfológicos, al estudiar el aguacate nativo en el estado de Nuevo León en México, el cual es centro de origen de *Persea americana*

Mill. spp. drymifolia . En este estudio se evaluó la diversidad genética de 42 árboles de aguacate nativo, en donde se generaron AFLP que permitieron diferenciar cinco variedades en el análisis de agrupamiento; el no agrupamiento de variedades denominadas con el mismo nombre local permitió detectar diferencias genéticas dentro de variedades de la raza Mexicana. Cuando los datos moleculares se analizaron en forma conjunta con los datos morfológicos, se logró diferenciar once variedades, y se repitió el esquema de no agrupamiento de variedades con el mismo nombre local.

A nivel de Colombia se tiene conocimiento de un estudio sobre la diversidad genética de la Colección Colombiana de Aguacate mantenida por Agrosavia en el Municipio de Palmira Valle, con un total de 60 accesiones de las cuales fueron analizadas 56 de ellas utilizando marcadores moleculares AFLP. El objetivo de este trabajo fue conocer la diversidad y nivel de redundancia genética presentes en dicha colección. A través de la construcción de un dendograma mediante un análisis de conglomerados sobre la matriz de similaridad de Nei-Li, usando cuatro combinaciones de cebadores, se encontró un 1.8% de redundancia genética, es decir, dos accesiones como un posible duplicado genético en las 56 accesiones analizadas. Con un nivel de similaridad del 95% se observó que todas las accesiones eran diferentes a excepción de dos de ellas. En cuanto a la diversidad genética se encontró un patrón de distribución continua sin una clara diferenciación entre razas botánicas, pero con la presencia de híbridos interraciales en medio. Mediante un análisis de correspondencia múltiple (ACM) se observó el agrupamiento de la mayoría de los aguacates Antillanos con un 72% de similaridad. Del total de las accesiones, 12 son originarias de Colombia, 10 de estas son Antillanas y 8 de ellas formaron el grupo compacto de las Antillanas. Dentro de las accesiones colombianas sobresalió la denominada Tumaco la cual presento el genotipo más polimórfico, además de un morfotipo único (Ocampo, 2006).

ADN para análisis de filogenia y similitud genética en plantas.

Los datos moleculares y particularmente el análisis de secuencias de ADN, han tenido un profundo impacto en el campo de la sistemática de plantas. La aplicación de datos de secuencias de ADN para resolver problemas de filogenética se ha convertido en algo rutinario. La mayoría de datos usados en estudios de filogenia molecular de plantas se

deriva de ADN de cloroplasto (cpADN) y ADN ribosomal nuclear (rADN) (Small et al. 2004). Otras alternativas al ADN de cloroplasto y ribosomal son el ADN mitocondrial (mtADN) y otras secuencias de ADN nuclear (nADN) diferentes al ribosomal; sin embargo, debido a su lenta tasa de evolución de sus secuencias y a su ritmo acelerado de evolución estructural el ADN mitocondrial ha sido ignorado de los estudios de filogenética de plantas como potencial fuente de datos (Palmer, 1992; Palmer et al. 2000).

La fuente de datos más ampliamente usada en el análisis filogenético molecular de plantas ha sido del ADN de cloroplasto. El genoma del cloroplasto es una molécula circular encontrada en múltiples copias por cloroplasto y contiene regiones codificante como no codificantes. La presencia de múltiples copias del genoma del cloroplasto por cloroplasto, acompañado de la presencia de múltiples cloroplastos por célula, significa que el cpADN es relativamente de alta copia dentro de un preparado normal de ADN. Esta propiedad es una ventaja significante, ya que el número alto de copias facilita el análisis de sitios de restricción así como la amplificación por PCR de regiones específicas del cpADN (Small et al. 2004).

El ADN de cloroplasto es generalmente caracterizado como estructuralmente estable, haploide, no-recombinante y generalmente de herencia uniparental; todas estas características facilitan su uso en estudios de sistemática. Sin embargo, estas características revelan solo la mitad del parentesco en plantas hibridas o de origen poliploide. Además, un análisis de cpADN de plantas hibridas o poliploides puede identificar incorrectamente como pertenecientes a un clado de uno de los dos padres sin revelar la historia hibrida. Si la hibridación es seguida por introgresión y subsecuente fijación de cpADN foráneo entonces la filogenia puede ser resuelta con precisión con la historia maternal; sin embargo, el ADN de cloroplasto falla para identificar el conflicto filogenético derivado de una descendencia hibrida (Small et al., 2004).

Otra de las herramientas ampliamente adoptadas en la sistemática de plantas es el ADN ribosomal nuclear (rADN). En plantas terrestres los genes del RNA ribosomal están organizados en dos grupos de arreglos en tándem. El primero está compuesto de genes de la región 5S rRNA y arreglos en tándem de espacios intergénicos en uno o más loci cromosómico. El segundo grupo incluye las regiones 18S- 5.8S- 26S del ADN ribosomal

cistrón en arreglos de tándem en uno o más loci cromosómico. Ambos grupos de rADN han sido utilizados en estudios de sistemática, aunque los arreglos 18S- 5.8S- 26S han sido usado más frecuentemente que la 5S (Johnson, 2004). Los genes ribosomales existen en arreglos en "tándem" de genes compuestos de cientos de miles de copias por arreglo; este alto número de copias facilita su evaluación por estrategias basadas en PCR o sitios de restricción (Arnheim, 1983; Baldwin et al. 1995; Cronn et al. 1996; Wendel et al. 1995; Zimmer et al. 1980). Sin embargo, la naturaleza altamente repetitiva del rADN le confiere propiedades que afectan su potencial utilidad en estudios filogenéticos (Álvarez and Wendel, 2003; Bailey et al. 2003). Estas dificultades potenciales se derivan específicamente de la estructura y dinámica evolutiva del rADN, la presencia de múltiples copias por arreglo y múltiples arreglos por genoma y la presencia, ausencia o fuerza variable de la evolución concertada. Esta evolución concertada tiende a homogenizar las secuencias dentro y algunas veces entre los arreglos de rADN. En la ausencia de una evolución concertada completa se pueden surgir variantes en la secuencia y permanecer dentro y entre arreglos produciendo múltiples distancias relacionadas con tipos de rADN dentro de individuos (Buckler et al. 1997; Bailey et al. 2003; Cronn et al. 1996); de hecho hay pseudogenes de rADN que pueden ser constituyentes regulares de muchos genomas, representando secuencias distantes filogenéticamente que pueden ser preferencialmente amplificadas a partir de loci funcionales de rADN (Bukcler et al. 1997; Chase et al. 2003; Hartmann et al. 2001). En conclusión, la suma de estas observaciones indica que secuencias de rADN obtenidas por secuenciación directa de productos de PCR pueden fallar al revelar la complejidad del contenido del rADN nuclear y de hecho puede revelar secuencias paralogas en el rADN en taxas diferentes o accesiones (Small et al. 2004).

La secuenciación del ADN nuclear es otra alternativa para analizar el grado de similitud genética al interior una especie. Esta clase de genes presentan ciertas ventajas respecto a los marcadores de cloroplasto, para el análisis filogenético como la elevada tasa relativa de evolución en su secuencia si se compara con genes de cloroplasto y mitocondrial. Varios estudios han revelado que las tasas de sustitución sinónimas de los genes nucleares son hasta cinco veces mayores que en los genes de cloroplasto y 20 veces mayores que los genes de mitocondria (Wolfe et al. 1987; Gaut, 1998). Esta ventaja se hace particularmente aguda a bajos niveles taxonómicos o entre linajes creados por eventos de rápida divergencia (Small et al. 1998; Cronn et al. 2002; Malcomber, 2002). Adicional a las rápidas tasas de evolución, los genes nucleares ofrecen otra característica

importante y son los múltiples loci no ligados que pueden ser usados para inferencias filogenéticas independientes. La confirmación de hipótesis filogenéticas basadas en datos independientes aumenta un árbol filogenético dado. Además, la incongruencia entre datos ha sido de uso para inferir fenómenos evolucionarios como hibridación, introgresión o clasificación de linajes (Wendel and Doyle, 1998).

Una última propiedad deseable de los genes nucleares es su herencia Mendeliana explícitamente biparental, a diferencia del genoma de cloroplasto el cual es usualmente de herencia uniparental; datos obtenidos de ADN de cloroplasto pueden decir solo la mitad de la historia en casos de hibridación, por lo tanto los genes nucleares son candidatos ideales para la identificación de donantes parentales de híbridos o poliploides sospechosos (Wendel, 1989; Rauscher et al., 2002; Álvarez and Wendel, 2003).

Una clase de genes nucleares muy importantes en el estudio de adaptación y evolución de las plantas son los genes que intervienen en la vía biosintética de los flavonoides. Esta vía da origen a compuestos fenólicos conocidos como flavonoides, los cuales tienen muchas funciones en plantas (Clegg et al. 1997); algunas de ellas son: protección contra la luz UV (Clegg and Epperson, 1988), defensa de la planta contra patógenos e insectos (Dixon et al. 1983; Lamb et al. 1989), transporte de auxinas (Jacobs and Rubery, 1988), inducción de nodulación (Long, 1989) y funcionamiento del polen (Taylor and Jorgensen, 1992). El estudio de la evolución de estos genes es esencial para el entendimiento de los procesos que determinan la evolución adaptativa (Clegg et al. 1997).

Uno de los genes regulatorios de la vía biosintética de los flavonoides es el que codifica para la enzima Chalcona sintasa (*CHS*); se cree que comparte un origen común con las sintasas de ácidos grasos del metabolismo primario (Verwoert et al. 1992). La reacción catalizada por *CHS* utiliza substratos de las vías del metabolismo primario fenilpropanoide y malomil CoA. (Stafford, 1991). Un ejemplo del uso del gen *CHS* en estudios de genética molecular de poblaciones es el realizado en *Ipomoea purpurea,* en donde genes *ChsA* fueron secuenciados a partir de 18 líneas de provenientes de una amplia colección geográfica en México y el sureste de los Estados Unidos. No se detectó diversidad nucleotídica en la mayoría de líneas provenientes de los estados de Georgia y Carolina del norte. Los materiales de origen mexicano presentaron altos niveles de diversidad

nucleotídica, con lo que se pudieron diferenciar 11 haplotipos (Clegg et al., 1997). En aguacate, Chen et al. (2009) secuenciaron el gen *CHS* junto con otros genes nucleares en cultivares de la colección de germoplasma de aguacate del Centro de Extensión e Investigación de la Costa Sur de la Universidad de California; esta colección presenta accesiones de aguacates nativos de estados del sur y centro de México, Costa Rica, Ecuador y República Dominicana. En este estudio el gen *CHS* fue el que logro aportar el mayor número de haplotipos y sitios segregantes o polimórficos de nucleótidos, lo cual significa que puede ser un buen candidato para analizar diferencias genéticas de los aguacates del departamento de Antioquia con relación a sus orígenes.

Otro gen perteneciente a la familia de genes que intervienen en la vía biosintética de los flavonoides y que ha sido clonado y caracterizado en varias especies de plantas es el gen Flavanona -3-Hidrolasa (*F3H*), cuya función es convertir la flavonona (*2S*) a dihidroflavonoles (*2R*, *3R*), el cual es un intermediario directo en la biosíntesis de antocianidinas y flavonoles (Forkmann and Dangelmayr 1980; Britsch et al. 1992, reportados por Chen et al. 2008).

Chen y colaboradores (2008), estudiaron la diversidad nucleotídica y el desequilibrio de ligamiento en cultivares nativos de aguacate procedentes de México, Costa Rica, Ecuador y República Dominicana mediante la secuenciación de los genes *CHS*, *F3H* y también los genes Celulasa (endo-1,4-D-Glucanasa) el cual es un gen relacionado con la maduración de los frutos (Tucker et al. 1987) y Serina-Treonona-Quinasa (*STK*) el cual está relacionado con resistencia a enfermedades en plantas (DiGaspero y Cipriani, 2003). Posteriormente en el 2009, Chen y colaboradores utilizaron nuevamente la secuenciación de estos cuatro genes con el fin de inferir la historia genética de 21 cultivares nativos de aguacate, usando un modelo basado en el programa STRUCTURE y el polimorfismo de nucleótidos y la comparación de las secuencias con 33 cultivares de aguacate de origen conocido, observando una diferenciación genética de 3 grupos geográficos en los cultivares nativos, los cuales correspondieron a las razas botánicas clásicas definidas para aguacate. De acuerdo a lo anterior mencionado los genes *CHS, F3H*, *STK* y Celulasa pueden ser buenos candidatos para analizar diferencias genéticas de los aguacates del departamento de Antioquia con relación a sus orígenes.

Análisis de diferenciación genética.

Cuando los marcadores moleculares utilizados en un estudio son dominantes como es el caso de los AFLP, no se pueden realizar análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo si es posible realizar análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar si las poblaciones de una especie están genéticamente diferenciadas, dado que este último, no exige el cumplimiento de los supuestos del equilibrio de Hardy-Weinberg, ni equilibrio de ligamiento para realizar un análisis de diferenciación genética de poblaciones, como lo requieren los estadísticos *F* de Wright (Excoffier *et al.* 1992).

Este análisis de AMOVA también puede ser empleado en marcadores codominantes como lo son los microsatélites e igualmente con secuencias de ADN (Excoffier et al. 1992). Para realizar el análisis mencionado, se puede utilizar una matriz de datos binarios (0, 1) en caso de que el marcador sea dominante, una matriz de datos multinomial como es el caso de los microsatélites, donde todos los genotipos pueden ser identificados (AA, Aa, aa) y en el caso de la secuencia, se utilizan secuencias alineadas de la especie que se desea analizar. El procedimiento utilizado para el análisis de diferenciación genética fue el siguiente:

El AMOVA es un método estadístico que tiene como base un análisis de varianza (Tabla 1) y permite la partición de la variación genética entre poblaciones y regiones, además de la estimación del estadístico *F* y/o sus análogos, éste análisis permite el uso de datos de muchos tipos de marcadores y ofrece un prueba estadística con permutaciones al azar (Peakall y Smouse 2006). El AMOVA, fue inicialmente desarrollado para estimar la diversidad genética de poblaciones usando un análisis de varianza en poblaciones con frecuencias moleculares haplotípicas de organismos haploides, sin embargo este mismo modelo también puede ser usado para organismos diploides (Michalakis y Excoffier 1996). Los estadísticos *F* estiman la distribución de la diversidad genética entre, dentro y total de una población muestreada, en este trabajo se usó el estadístico Φ_{ST} análogo al F_{ST}, debido a que puede ser usado para datos haploides y binarios de organismos diploides, mientras que por el contrario el F_{ST} fue desarrollado por Wright para el análisis de datos codominantes (Peakall y Smouse 2006).

Tabla 1. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), *P* es el número de poblaciones muestreadas, N_i es el tamaño de cada muestra y $N = \sum N_i$ es el número total de individuos. *gl*: grados de libertad, *SSD*: desviación de la suma de cuadrados, *MSD*: media de la desviación de los cuadrados, *E(MSD)*: media esperada de la desviación de los cuadrados.

Fuente de Variación	***gl***	***SSD***	***MSD***	***E(MSD)***
Entre poblaciones	*P* - 1	*SSD(AP)*	*SSD(AP)/*(P - 1)	$\sigma^2_w + n' \sigma^2_a$
Entre genes dentro de poblaciones	*2N - P*	*SSD(WP)*	*SSD(WP)/(2N – P)*	σ^2_w
Total	*2N* - 1	*SSD(T)*		

En el caso del Φ_{ST} cada haplotipo *i* es tratado como un vector de un estado alelico a_i, de dimensión igual al número de loci considerados (*m*), entonces $a_i = [a_{i1}, a_{i2}, a_{i3} \ldots a_{im}]'$. Φ_{ST} es obtenido como el cociente de la varianza estimada debido a diferencias entre las poblaciones (σ^2_a) sobre la varianza total estimada ($\sigma^2 = \sigma^2_a + \sigma^2_w$) (Michalakis y Excoffier 1996, Peakall y Smouse 2006):

$$\phi_{ST} = \frac{\hat{\sigma}^2_a}{\hat{\sigma}^2}$$

El Φ_{ST}, en términos de las desviaciones de la suma de cuadrados (SSD_S) se define de la siguiente forma (Michalakis y Excoffier 1996):

$$\hat{\phi}_{ST} = \frac{(2N-P\ SSD(T)-(2N-1)SSD(WP)}{(2N-P)SSD(T)-(2N-1-b)SSD(WP)}$$

Donde *b* es igual a *n'(P – 1)*, y *n'* es igual a:

$$n' = \frac{1}{P-1}\left(2N - \sum_{i=1}^{P}\frac{(2N_i)^2}{2N}\right)$$

La desviación de la suma de cuadrados (SSD) es la función de los vectores haplotípicos:

$$SSD(T) = \frac{1}{2N}\sum_{2N}^{i=1}\sum_{i}^{j=1}\delta_{ij}^2$$

$$SSD(WP) = \sum_{P}^{r=1}\frac{1}{2N_r}\sum_{2N_r}^{i=1}\sum_{i}^{j=1}\delta_{ij}^2$$

Donde *N* es el tamaño de la muestra que se está analizando y δ_{ij}^2 es una distancia Euclidiana ajustada entre los haplotipos *i* y *j* definidos como:

$$\delta_{ij}^2 = (a_i - a_j)'W(a_i - a_j)$$

Siendo W una matriz de *m x m* que permite que se observen las interacciones entre loci. Si los loci se asumen como independientes y se les da igual peso, W es la matriz de identidad I, donde:

$$\delta_{ij}^2 = \sum_{k=1}^{m}(a_{ik} - a_{jk})^2$$

Bajo este supuesto de independencia entre locus, la desviación de la suma de cuadrados puede dividirse en componentes de locus simples (*m*):

$$\hat{\phi}_{ST} = \frac{(2N-P)\sum_{i=1}^{m} SSD(T)_i-(2N-1)\sum_{i=1}^{m} SSD(WP)_i}{(2N-P)\sum_{i=1}^{m} SSD(T)_i-(2N-1-b)\sum_{i=1}^{m} SSD(WP)_i}$$

Que es igual a:

$$= \frac{\sum_{k=1}^{m} \hat{\sigma}_{ai}^2}{\sum_{k=1}^{m} \sigma_i^2}$$

El AMOVA considera entonces a cada locus como independiente dado que W = I (Michalakis y Excoffier, 1996).

Para realizar el AMOVA cuando se tienen datos haploides de organismos diploides se deben generar haplotipos simulados con los que se calculan las frecuencias para construir una matriz de distancias euclidianas (Michalakis y Excoffier 1996). El AMOVA prueba la significancia de la diferenciación de las poblaciones por permutaciones al azar, si los loci que componen los haplotipos son estadísticamente independientes, las permutaciones de los haplotipos simulados a lo largo de las poblaciones generan un procedimiento conservador en el sentido que los niveles de significancia pueden ser sobrestimados porque la distribución empírica nula puede ser más platicúrtica que la verdadera distribución nula (Michalakis y Excoffier 1996).

Adicionalmente, el AMOVA determina el número de migrantes (*Nm*) con la siguiente fórmula, siguiendo el enfoque de los estadísticos *F* de Wright:

$$Nm = \frac{(\frac{1}{F_{ST}})-1}{4}$$

Adicionalmente, la distancia genética de Nei (*DNei*) fue una de las más utilizadas en este trabajo, para cada uno de los marcadores empleados, particularmente los AFLP y los microsatélites, esto fue con el propósito de observar si las poblaciones de aguacate presentaban agrupaciones relacionadas con poblaciones cercanas a nivel geográfico o a nivel genético o ambas. La distancia de Nei asume un modelo infinito de mutación en isoalelos, en los cuales la tasa de mutación neutral se genera por la evolución de alelos completamente nuevos en las poblaciones de estudio (Nei 1973, 1975). Esta tasa de mutación es constante y existe un equilibrio entre la mutación y la deriva genética de las poblaciones, donde el tamaño efectivo (Ne) permanece constante. Esta distancia genética

no asume equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei 1973, 1975), por esta razón fue usada para el análisis de los datos de este estudio. La distancia de Nei se define como (Nei 1979):

$$DNei = _ln\,(I)$$

Donde *I* es la identidad genética que se define como:

$$I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

Donde:

$$J_{XY} = \sum p_{ix} p_{iy}$$

$$J_X = \sum p_{ix^2}$$

$$J_Y = \sum p_{ij^2}$$

p_{ix} y p_{iy} son las frecuencias del alelo *i* en las poblaciones *x* y *y*. Para múltiples loci J_{XY}, J_X y J_Y son calculados sumando todos los loci y alelos y dividiendo por el número de loci (Peakall y Smouse, 2006).

Las distancias de Nei finalmente fueron agrupadas en diversos dendrogramas con el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method) (Sneath y Sokal, 1973). Este algoritmo se basa en el uso de distancias promedio entre OTUS (unidades taxonómicas de estudio, en este caso biotipos) para generar una matriz de distancias genéticas respecto a las poblaciones de aguacate donde se realizaron las colecciones, sea en el departamento de Antioquia, bancos de germoplasma o diferentes departamentos de Colombia. La topología de cada dendrograma, refleja las similitudes genéticas entre los OTUS analizados (Hartl y Clark, 1997). La estimación de la distancia de Nei y los dendrogramas se llevó a cabo principalmente con el programa GenAlex.

Test de asignación: STRUCTURE.

Uno de los métodos más utilizados para realizar estudios de la genética de las poblaciones de una especie radica en la utilización del programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) puesto que consiste en el uso de una probabilidad Bayesiana posterior (Pp) para asignar un individuo de una población en una subpoblación (K) dado el genotipo que lo compone. Esta probabilidad de asignación consiste en una probabilidad condicional ya que el individuo es asignado a la población dependiendo de su genotipo (Pc). No obstante, el programa también tiene en cuenta una probabilidad anterior o a priori que por defecto la asigna (Pa) o el investigador la genera; por ello el programa emplea una probabilidad de esta forma: Pp = Pa*Pc/Pt, donde Pt es la probabilidad total. La probabilidad posterior Pp se describe en términos de verosimilitudes, las cuales generalmente se presentan en la forma de logaritmos naturales (Ln) para simplificar sus valores. Cuando el programa STRUCTURE llega a la máxima verosimilitud, llega a la mejor probabilidad Bayesiana (posterior) y por lo tanto asigna los individuos a una sub población (K) determinada; un ejemplo se puede observar en la figura 2, donde se muestra el resultado de un análisis de agrupamiento bayesiano realizado mediante el software STRUCTURE en poblaciones de *Tecia solanivora* de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Nariño y Norte de Santander, representadas en dos grupos o clusters con un valor K=2 reportados por Villanueva (2014).

Una forma de escoger la mejor probabilidad Bayesiana posterior y número de subpoblaciones estimadas es a través del test de Evanno (Evanno et al. 2005), el cual hace unas comparaciones de los logaritmos naturales y las varianzas de las estimaciones Bayesianas de probabilidades con un criterio Aikaike para así lograr identificar el mejor valor de K (Figura 3).

Figura 2. Número de subpoblaciones identificadas (K) por STRUCTURE con su método de asignación. Cada color producido corresponde a una subpoblación de *T. solanivora* (Villanueva, 2014).

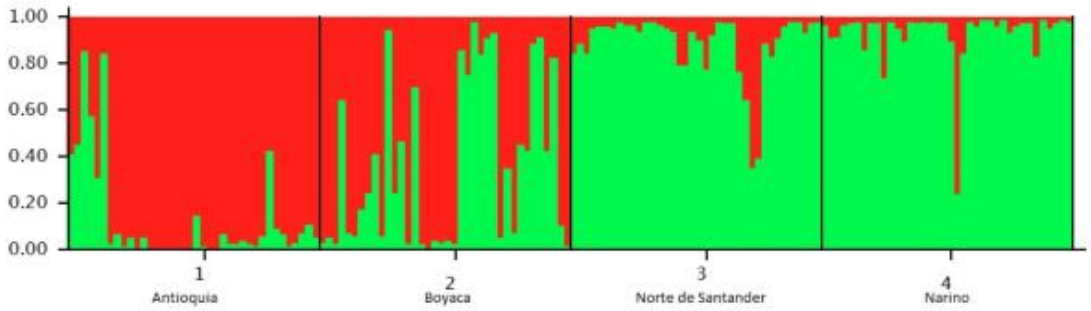
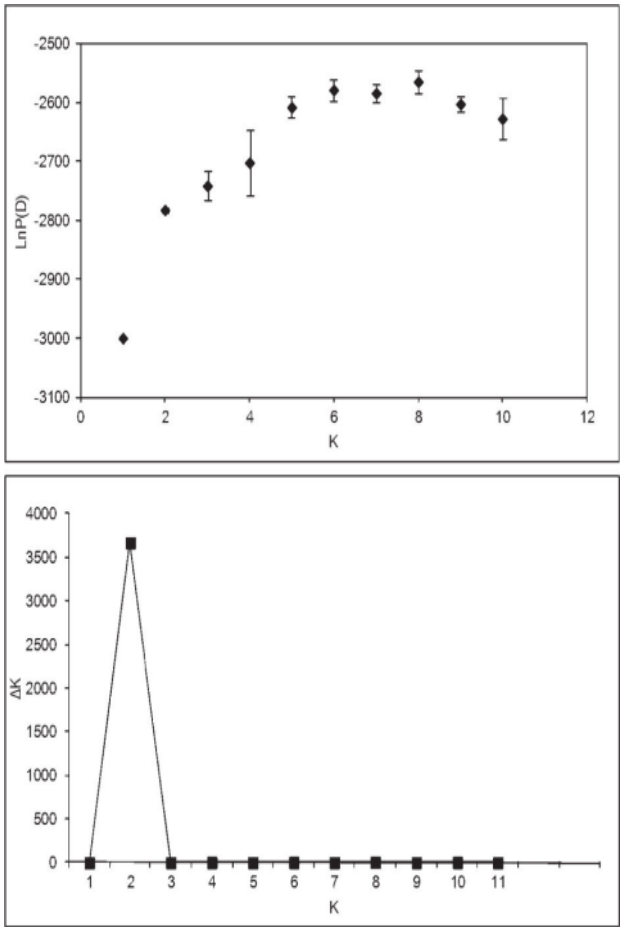


Figura 3. Realización del test de Evanno y escogencia del mejor valor K de subpoblaciones de una población natural.



Filogeografía.

La filogeografía se define como la disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (Avise et al. 1987; Avise, 2000 reportados por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). Este análisis conjunto de aspectos filogenéticos, de genética de poblaciones y de biogeografía en poblaciones naturales, ha tenido repercusiones importantes en las áreas de biología evolutiva, ecología y conservación. Dado que en filogeografía se analizan genealogías genéticas para determinar el impacto de los eventos históricos en la composición y estructura genética de poblaciones actuales, ha logrado revolucionar la interpretación conjunta de patrones y procesos de la ecología, la biogeografía y la genética de poblaciones. A pesar de que la filogeografía se ha utilizado comúnmente como una herramienta para esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie, las aproximaciones filogeográficas también pueden ser útiles para inferir procesos demográficos históricos como flujo génico, tamaño efectivo poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella y también para determinar fronteras entre especies e identificar unidades de conservación (Avise et al. 1987; Avise, 2000, 2008; Freeland, 2005; Vázquez–Domínguez, 2002, 2007).

Actualmente, los estudios filogeográficos en especial en mamíferos se basan principalmente en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), dado que presenta una alta tasa de mutación, no recombina y su herencia es casi exclusivamente materna (Lanteri & Confalonieri, 2003 reportado por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). Las variantes (secuencias) de ADNmt, conocidas como haplotipos, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, los cuales pueden conectarse de un modo filogenéticamente inteligible en un filograma o mejor llamado, árbol de genes (Avise, 2000, 2008 reportado por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). En los árboles de la filogeografía, dicho filograma se superponía con la distribución geográfica de las poblaciones de estudio, lo que permitía hacer una descripción de la reconstrucción filogeográfica (Avise, 2000 reportado por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). Desde entonces se han desarrollado múltiples formas de análisis gráficos, los cuales incorporan los filogramas, el modelo evolutivo de coalescencia y valores estadísticos de probabilidad (Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009).

Coalescencia.

La coalescencia es un proceso estocástico que describe la forma en que los eventos genéticos poblacionales determinan la forma de la genealogía de las secuencias de genes muestreados, y se basa en la hipótesis de que todos los individuos de una población natural coalescen en un ancestro común. En esencia, es un modelo retrospectivo que traza todos los alelos de un gen dentro de una muestra poblacional hacia un ancestro común más reciente (Hudson, 1990, 1998; Nordborg, 2000 reportados por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). La teoría de coalescencia ha tenido la virtud de permitir la unión conceptual y analítica de la genética de poblaciones y la filogenia, haciendo que el foco de estudio de ambas áreas sea precisamente el árbol de genes (Nielsen & Beaumont, 2009 reportado por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). Sin embargo, el uso exclusivo del ADNmt en algunos casos puede ser arriesgado, ya que implica un único locus, el cual puede estar ligado a selección, o puede que no sea posible identificar su dispersión entre poblaciones como consecuencia de diferencias etológicas o ecológicas entre hembras y machos o entre especies (Avise, 2008; Vázquez–Domínguez et al. 2009); todo ello puede implicar limitaciones en el momento de hacer la reconstrucción de historias poblacionales (Avise, 2000). Por ello, cada vez con más frecuencia se aplica el uso combinado y comparativo de genealogías obtenidas de datos de ADNmt y ADN nuclear (ADNn). El uso de genes nucleares conlleva a su vez problemas, por ejemplo aquellos inherentes a la recombinación, así como el hecho de que cada locus (que en algunas especies suelen ser más de dos), muestre historias evolutivas independientes (Zhang et al. 2005 reportado por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). Para enfrentar este problema existen dos aproximaciones de análisis: 1) hacer reconstrucciones y comparaciones de más de un gen, con lo cual, en caso de existir congruencia en las historias filogeográficas tratadas, se incrementa la probabilidad de que la historia filogeográfica que se obtiene sea de la especie y no del gen (Avise, 2000); y 2) realizar comparaciones filogeográficas entre más de una especie co–distribuida, con lo cual se evalúa si existen patrones filogeográficos concordantes (Avise, 2000, 2008; Arbogast & Kenagy, 2001; Zink, 2002; Vázquez–Domínguez et al. 2009).

En términos analíticos, la filogeografía se concibe en general en dos áreas que difieren básicamente en la forma de análisis (Hey & Machado, 2003 reportado por Domínguez–

Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). La primera se basa fundamentalmente en una idea gráfico–descriptiva, donde las ramificaciones de un árbol se analizan bajo una (o varias) hipótesis de la historia biogeográfica de los organismos, y que se sustenta en métodos de reconstrucción filogenética de árboles de genes; o bien, en la construcción de redes de haplotipos, las cuales se basan en la reconstrucción de árboles multibifurcados arreglados a manera de redes de haplotipos bajo métodos filogenéticos o métodos de coalescencia. En ambos casos las interpretaciones de eventos y procesos asociados a la distribución de los organismos se realiza después de que se tienen los árboles o redes resultantes (Nielsen & Beaumont, 2009; Templeton, 2009 reportados por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). La segunda área descansa en fundamentos estadísticos y matemáticos de demografía y estructura poblacional, basados en teoría de coalescencia, fenómenos estocásticos y estadística computacional, donde los modelos de análisis incluyen hipótesis que se ponen a prueba, utilizando métodos basados en verosimilitud, particularmente de Inferencia Bayesiana (Knowles & Maddison, 2002; Nielsen & Beaumont, 2009 reportados por Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009). Ambas aproximaciones se utilizan cada vez con más frecuencia de forma combinada y complementaria, con las ventajas y desventajas propias de cada una (Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009).

Bibliografía.

Aguilar, R. (2006). Aguacate Hass. Diversificación y rentabilidad. Despertar Lechero. Cooperativa Colanta. Edición No. 27. 100 – 112.

Ajmone-Marsan, P. Valentini, A. Cassandro, M. (1997). AFLP marker for DNA fingerprinting in cattle. Animal Genetics. 28: 418–426.

Albacete, A. et al. (2015). Unravelling rootstock scion interactions to improve food security. J. Exp. Bot. 66, 2211–2226.

Alcaraz, M. L. Hormaza, J. I. (2007). Molecular Characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. Hereditas. 144: 244-25.

Álvarez, I. Wendel, J.F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics Evolution. 29: 417-434.

Anacafe (2004). Asociación Nacional del café. Cultivo de aguacate. Programa de diversificación de ingresos de la empresa cafetalera. Guatemala. 25 p.

Analdex. (2017). Dirección de Asuntos Económicos. Mercado del aguacate-Diciembre 2017. Bogotá Colombia. http://www.analdex.org/2018/03/02/mercado-del-aguacate/

Arbogast, B. S. & Kenagy, G. J., (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. Journal of Biogeography, 28: 819–825.

Arnheim, N. (1983). Concerted evolution of multigene families. In Evolution of genes and proteins. (Eds Nei, M., Koehn, R.K)(Sinauer: Sunderland, MA) 38-61.

Arus, P. Moreno-González, J. (1993). Marker-assisted selection. In Plant Breeding: Principles and Prospects. Hayward, M.D., N. O Bosemark and I. Romagosa (Eds), Chapman and Hall, London. 16 – 29.

Ashworth, V. E. T. M. Kobayashi, M. C., De La Cruz, M. (2004). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. Scientia Horticulture. 101: 255-267.

Avilán, L. E. Escalante, F. Leal, M. (1980). Áreas potenciales para el desarrollo de diferentes especies frutícolas en el país. El Aguacate, Agronomía Tropical 30: 105-113.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, L. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C., (1987). Intraspecific phylogeography: The mitocondrial DNA bridge between population gen netics and systematics. Annual Review in Ecology and Systematics, 18: 489–522.

Avise, J. C., (2000). Phylogeography. Harvard Univ. Press, Cambridge. – 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography, 36: 3–15.

Bailey, C.D. Carr, T.G. Harris, S.A. Hughes, C.E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNApolymorphism, paralogy, and pseudogenes. Molecular Phylogenetics Evolution. 29: 435-455.

Baldwin, B.G. Sanderson, M.J. Porter, J.M. Wojciechowski, M.F. Campbell, C.S. Donoghue, M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden. 82. 247-277.

Bareño, F. (2014). Estado actual y perspectivas de la cadena del aguacate en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Febrero del 2014. En línea. (Consulta 2 de febrero de 2015)

Barlow C. (2002). The ghosts of evolution. Perseus Books Groups. USA.

Barrientos -Priego, A. López - López, L. (1998). Historia y genética del aguacate. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México. [en línea] . (Consulta febrero 20 de 2008)

Barrientos–Priego, A. F.; Muñoz–Pérez, R. B.; Borys, M. W.; Martínez–Damián, MA. T. (2000). Cultivares y portainjertos del aguacate, pp. 35–54. In: El Aguacate y su Manejo Integrado.

Barrientos-Priego, A. López-López, L. (2007). Historia y genética del aguacate. En: Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colin. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del aguacate en el estado de México. Coatepec de Harinas, México. 100-121.

Ben Ya'acov, A. Bufler, G. Barrientos – Priego, A.F. De la Cruz Torres, E. López – López, L. (1992). A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I. general description of the international project and its findings. Proc. 2nd World avocado Congress. Orange, Cal., USA. 535-541

Ben-Ya'acov, A. Solis, M. Peri, E. (1995). Progress of the study of avocado genetic resources. II. The avocado genetic resources in Costa Rica. Program and Book of Abstracts of the World Avocado Congress III. Octubre 22-27, Tel Aviv, Israel. p.109.

Bergh, B.O. (1995). Evolution of crop plants. Longman Scientific and technical, USA and UK.

Bergh, B. (1992). The origin, nature and genetic improvement of the avocado. California Avocado society yearbook 76: 61-75.

Bergh, B. O. Kumamoto, J. Chen, P. (1989). Determining maturity in whole avocados. California Avocado Society Yearbook. 73:173-176.

Bergh, B. Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the avocado. California. Avocado Society Yearbook. 70: 135 – 145

Bernal, J.A. Díaz, C.A. (2005). (Compiladores). Tecnología para el Cultivo del Aguacate. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. Manual Técnico 5. 241 p.

Boza, E.J. Tondo, C.L. Ledesma, N. Campbell, R.J. Bost, J. Schnell, R.J. A. Gutierrez, O.A. (2018). Genetic differentiation, races and interracial admixture in avocado (*Persea americana* Mill.), and *Persea* spp. evaluated using SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 65: 195–1215.

Britsch, I. Ruhnau–Brich, B. Forkmann, G. (1992). Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from Petunia hybrida. Biologycal Chemestry. 267: 5380-5387.

Buckler, E.S. Ippolito, A. Holtsford, T.P. (1997). The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. Genetics. 145. 821-832.

Bufler, G. Ben-Ya'acov, A. (1992). Study of avocado germplasm resources, 1988-1990. II. Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in avocado. Proc. of Second World Avocado Congress II: 545-550.

Bufler, G. Fiedler, J. (1996). Avocado Genetic Resources: Final Repot. GIARA B-14. July, 1996. 50 p

Camacho – Ferre, F. y Fernández – Rodríguez, E.J. (2000). El cultivo de apirena injertada bajo invernadero en el literal mediterráneo español. Caja Rural de Almeria. 312p.

Campos-Rojas, E. Terrazas, T. López-Mata, L. (2007). *Persea* (avocados) phylogenetic analysis base on morphological characters: hypotesis of species relationships. Genetic Resour Crop Evolution. 54: 249-258.

Centro de Investigaciones en Biotecnología y el Programa Nacional de Manejo Postcosecha y Transformación de Alimentos (IDIAF), Centro de Estudios Postcosecha de la Universidad Nacional de Chile (CEPOC) y Fertilizantes Químicos Dominicanos (Ferquido). (2001). Métodos no destructivos y marcadores moleculares para la determinación de fechas apropiadas de cosecha de cinco variedades de aguacate (*Persea americana* Mill). En línea] sf.http://www.fontagro.org/Projects/01_24_Aguacate/pp_IST_01_24.pdf. (Consulta: 4 de febrero de 2008)

Cornell University (1999). Requirements for successful Grafting & Budding. En línea. https://courses.cit.cornell.edu/hort494/mg/specific.grafting/ReqmtFrm.html. (Consulta: 29 de septiembre de 2018).

Corpoica. 2014. Manual Técnico, Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Cultivo de Aguacate. Gobernación de Antioquia. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural.

Chao, C.T. Barrientos-Priego, A.F. Reyes-Alemán, J.C. Devanand, P.S. (2003). Relaciones genéticas entre accesiones de aguacate de California y de México, caracterizadas por marcadores AFLP. In: Proc. V World Avocado Congress. Research Conference. Granada-Málaga, España. 19-24 de octubre. 1: 208-209.

Chase, M.W. Knapp, S. Cox, A.V. Clarkson, J.J. Butsko, Y. Joseph, J. Savolainen, V. Parokonny, A.S. (2003). Molecular systematics GISH and the origin of hybrid taxa in Nicotiana (*Solanaceae*). Annals of Botany. 92. 107-127.

Chen, H. Morrell, PL. Ashworth, VE. De la Cruz, M. Clegg, M.T. (2009). Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. Journal of Heredity. 100: 56-65.

Chen, H., Morrell, PL., De la Cruz, M.,Clegg, MT. 2008. Nucleotide Diversity and Linkage Disequilibrium in Wild Avocado (*Persea americana* Mill.).Journal of Heredity. 99:382-389.

Chennar R, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.C. Higgins y J.D. Thompson. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Research. 31, 3497-3500.

Clegg, M. T. & Epperson, B. K. (1988) in The Plant Evolutionary Biology, eds. Gottlieb, L. & Jain, S. K. (Chapman–Hall, London). 255–273.

Clegg, M. T. Kobayashi, M. Lin, J. Z. (1999). The use molecular markers in the management and improvement of avocado (*Persea americana* Mill.) Revista Chapingo Serie Horticultura. 5: 227-231.

Clegg, M.T. Cummings, M. P. Durbin, M.L. (1997). The evolution of plant nuclear genes. Proceedings of the National Academic of Sciences of the Unites States of America. 94: 7791 -779.

Corona-Jácome, E.C. Galindo-Tovar, M.E. Lee-Espinosa, H.E. Landero-Torres, I. (2016). Diversidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill.) en cuatro zonas de su área de dispersión natural. Agroproductividad. 9: 80 -85.

Cronn, R.C. Zhao, X. Paterson, A.H., Wendel, J.F. (1996). Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. Journal of Molecular Evolution. 42. 685-705.

Cronn, R.C. Small, R.L. Haselkorn, T. Wendel, J.F. (2002) Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: *Malvaceae*) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. American Journal of Botany 89: 707-725.

Cuiris – Pérez, H. Guillén-Andrade, H. Pedraza-Santos, M.E. López-Medina, J. Vidales-Fernández, I. (2009). Genetic variability within mexican race avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm collections determined by ISSRs. Revista chapingo Serie Horticultura. 15: 169-175.

Danzmann G. Gharbi K. (2001). Gene mapping in fishes: a means to an end. Genética 111: 3-23.

Davarsi, A. Soller, M. (1994). Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. Theorical and Applied. Genetics. 89: 351-357.

Dereeper, A. V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J. F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J. M. Claverie, y Gascuel, O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Research. 2008 Jul 1; 36 (Web Server Issue):W465-9.Epub 2008 Apr 19. (PubMed)

Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 26: 297-302.

Di Gaspero, G. Cipriani, G. (2003). Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pro-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. Molecular Genetics Genomics. 269: 612-623.

Dixon, R.A. Dey, P.M. and Lamb, C.J. 1983. Phytoalexins: Enzymology and Molecular Biology. Advances in Enzymology 55, 1-136.

Domínguez–Domínguez, O. & Vázquez–Domínguez, E., (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. Animal Biodiversity and Conservation, 32.1: 59–70.

Dudley, J.W. (1994). Analysis of molecular marker data. Proceed of the joint plant breeding symposia series, American Society for Horticultural Science/Crop Science Society of America. pp. 3-7.

Durán, R. Sahagún, J. (1992). La interacción genético-ambiental en la genotecnia vegetal. Revista Chapingo 79-80: 13-16.

Eliezer E. Goldschmidt, E.E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. Frontiers in plant science. 4, 1-9.

Evanno, G. Regnaut, S. Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of Individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611–2620

Excoffier, L. Smouse, P. E. Quatro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics. 131: 479-471.

FAO, (2009). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. [en línea] http://www.rlc.fao.org/prior/desrural/alianza.htm. (Consulta Abril 16 de 2011).

FAOSTAT, (2012). Producción mundial de aguacate. (http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/*/S) (Consulta 3 de junio de 2014).

Freeland, J. R., (2005). Molecular ecology. John Wiley & Sons, England.

Forkmann, G. Dangelmayr, B. (1980). Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of Dianthus caryophyllus. Biochemical Genetics. 18: 519-527.

Freeland, J. (2005). Molecular Ecology. Ed. Jonh Wiley & Sons. West Sussex. Engly.

Furnier, G.H. Cummings, M.P. Clegg, M.T. (1990). Evolution of the avocados as reveled by DNA-restriction site variation. Journal heredity. 81: 183-188.

Galindo-Tovar, M. E. Ogata- Aguilar, N. Arzate - Fernández, A. M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. Genetic Resources and Crop Evolution. 55: 441-150.

Galindo, M.E. Arzate, A.M. (2010a). Consideraciones sobre el origen y primeras dispersiones del aguacate (*Persea americana* Mill., Lauraceae). Cuadernos de Biodiversidad 33: 11-15.

Galindo, M.E. Arzate, A.M. (2010b). West Indian avocado: Where did it originate? Phyton. Revista Internacional de Botánica Experimental 79: 203-207.

Galindo-Tovar, M. E. Milagro-Pérez, P. A. Alejandre-Rosas, J. A. Leyva-Ovalle, O. R. Landero-Torres, I. Lee-Espinosa, H. Murguía-González, J. (2011). Relaciones genéticas

del aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios del centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 13: 339-346.

Gama, C. L., A. Gómez P. (1992). An ethnoecological approach for the study of *Persea*: A case study in the Maya area. Proc. Of Second World Avocado Congress 1992. 11 – 17.

García, A. K. Tsunewaki. (1977). Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae). II. Electrophoretical studies on peroxidase isozymes. Japan Journal of Genetics 52: 379-386.

Garcia, A. Ichikawa, S. (1979). Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae).

III. Comparative morphological study on 61 avocado strains. Japan Journal of Breeding 29: 66-76.

Gaut, B.S. (1998). Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. Evolutionary Biology. 30: 93-120.

Gold-ring, A. Zamir, D. Degani, C. (1985). Duplicated phosphoglucose isomerase genes in avocado. Theorical Applied Genetics. 71: 491-494

Gomez R. (2014). Aguacate: Su momento en Colombia y el mundo. (http://agronegocios.uniandes.edu.co/index.php/tematicas/alimentos/121-aguacate-su-momento-en-colombia-y-el-mundo) (Consulta de junio de 2014)

González, C. Román, M.I. Xiques, X. Dueñas, J. Jiménez, R., Rodríguez, N. (2002). Caracterización isoenzimatica de cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.). Revista Biología. 16: 49 – 55.

Gonzales-Andrés, F. (2001). Caracterización morfológica. En González -Andrés F, Pita Villamil JM (Eds) Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid, España. 199-217.

Guindon, S. Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". Systematic Biology. 52: 696-704.

Gutiérrez-Diez, A. Martínez de la Cerda, J. García-Zambrano, E.A. Iracheta-Donjuan, L. Ocampo-Morales, J.D. Cerda-Hurtado, I. (2009). Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 32: 9-18.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.

Hammer, O. D. Harper, A. T. Ryan, P. D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4 (1): 9 p.

Hartl, D.L. Clark, A.G. (1997). Principles of Population Genetics, 3rd. Ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Hartmann, S. Nason, J.D. Bhattacharya, D. (2001). Extensive ribosomal DNA genic variation in the columnar cactus Lophocereus. Journal of Molecular Evolution. 53. 124-134.

Hedrick, P. W. (2004). Genetics of Populations. Jones and Barlett Publishers. Sudbury Massachusets.

Hey, J. & Machado, C. A., (2003). The study of structured populations–new hope for a difficult and divided science. Nature Reviews Genetics, 4: 53–543.

Hudson, R. R., (1990). Gene genealogies and the coalescent process. In: Oxford surveys in evolutionary biology: 1–44 (D. Futuyma & J. Antonovics, Eds.). Oxford Univ. Press, Oxford.

Hudson, R. R., (1998). Island models and the coalescent process. Molecular Ecology, 7: 413–418.

Huff, D. R.; Peakall, R. Y P. E. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *Theoreticaand Applied Genetics*. 86: 927-934.

IPGRI, (1995). Descriptors for Avocado (*Persea* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 58p.

Jacobs, M. Rubery, P.H. (1988). Naturally occurring auxin transport regulators, Science 241, 346-349.

Johnson, D. E. (1998). Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Traducido por Pérez Castellanos H. International Thomson Editores. México. 566 p.

Johnson, L.A.S. (2004). Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. Australian. Systematic. Botanic. 17: 145-170

Knowles, L. L. & Maddison, W. P., (2002). Statistical phylogeography. Molecular Ecology, 11: 2623–2635.

Kobayashi, M. Jing-Zhong, L. Davis, J. Francis, L. Clegg, M.T. (2000). Quantitative analysis of avocado outcrossing and yield in California using RAPD markers. Scientia Horticulturae. 86: 135-149

Kopp, L. E. (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). Memoirs of the New York Botanical Garden. 14: 1-120.

Kumar, S. Dudley, J. Nei, M. Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics. 9: 299-306.

Kwame - Acheampong, A. Akromah, R. Ofori, F.A. Takrama, J. F. Saada, D. Bitton, I. Lavi, U. (2008). Genetic characterization of Ghanaian avocados using microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 133: 801-809.

La Republica. (2014). EE.UU. estudia plan de trabajo para importar uchuva y aguacate Hass. (http://www.larepublica.co/eeuu-estudia-plan-de-trabajo-para-importar-uchuva-y-aguacate-hass_112016). Publicado on line el 21 de Abril de 2014. (Consulta 3 de junio de 2014).

Lamb, C.J. Lawton, M.A. Dron, M. Dixon, R.A. (198) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell 56: 215-224.

Lander, E.S. Bostein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps Genetics 121:185-199.

Lanteri, A. & Confalonieri, V., (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: Una prespectiva latinoamericana de la biogeografía: 185–194 (J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.). CONABIO, México.

Larkin, M. A, Blackshields, G. Brown, N. P. Chenna, R. Mcgettigan, P. A. Mcwilliam, H. Valentin, F. Wallace, I. M. Wilm, A. Lopez, R. Thompson, J. D. Gibson, T. J. Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23: 2947-2948.

Lavi, U. Akkaya, M. Bhagwat, A. Lahav, E. Creagan, P. (1994). Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* Mill.). Euphytica. 80: 171-177

Lavi, U. Hillel, J. Vainstein, A. Lahal, E. Sharon, D. (1991). Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of avocado. Journal of the American Society for Horticultural. Science. 116: 1078-1081.

Lima, H. Rivera, T. Cabrera, A.M. Rodríguez, O.L. (1988). Clasificación de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en grupos ecológicos. Revista Científica Técnico Agrícola. Cítricos y otros frutales. 11: 47-53.

Liu, Z.J. Cordes, J.F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238: 1-37.

Long, S. (1989). *Rhizobium legumc* nodulation Lif'c together in the underground. Cell 56: 203–214.

Malcomber, S.T. (2002). Phylogeny of Gaertnera Lamb. (Rubiaceae) based on multiple DNA markers: evidence of a rapid radiation in a widespread, morphologically diverse genus. Evolution. 56: 42-57

Medina, C. García, I. Caro, M. Aristizabal, F. (2007). Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones de Hevea brasiliensis. Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 36: 70-80.

Mejía H, A.E. (2011). Consejo nacional del aguacate. Informe de Gestión Secretaria Técnica, abril a junio del 2011.

Mejía H, A.E. (2012). Estado del Arte- Cadena del Aguacate. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Dirección de Cadenas productivas. 5 de marzo del 2012.

Meudt, H. M. Clarke, A. C. (2007). "Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances". Trends in Plant Science. 12: 106–17

McKey, D. et al. (2010).The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. New Phytol. 186, 318–332.

Mhameed, S. Sharon, D. Kaufman, D. Lahav, E. Hillel, J. Degani, C. Lavi, U. (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. Theorical and Applied Genetic. 94, 279–286.

Mijares, P. López, L. (1998). Variedades de aguacate y su producción en México. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C., México.

Moreno-González, J. (1993). Efficiency of Generations for Estimating Marker-Associated QTL Effects by Multiple Regression Genetics 135:223-231.

Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., and Goldschmidt, E. E. (2009). A history of grafting. Hortic. Rev. 35, 437–493.

Mueller, U. G. Wolfenbarger, L.L. (1999). "AFLP genotyping and fingerprinting". Trends in Ecology and Evolution. (Amst.) 14: 389–394

Murray, M. G. Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Reserch. 8: 4321-4325.

Nei, M. Kummar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press.

Nei, M. Li, W. (1979). Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76: 5269-5273.

Nielsen, R. & Beaumont, M. A., (2009). Statistical inferences in phylogeography. Molecular Ecology, 18: 1034–1047.

Nordborg, M., (2000). Coalescent theory. In: Handbook of statistical genetics: 1–37 (D. J. Balding, M. J. Bishop & C. Cannings, Eds). John Wiley & Sons, London.

Núñez-colín, C.A. Barrientos- Priego, A.F. (2006). Estimación de la variabilidad interna de muestras poblacionales, mediante análisis de componentes principales. Interciencia. 31 (11)

Ocampo, C. H. (2006). Diversidad genética de la colección colombiana de aguacate (*Persea americana* Mill). [en línea] sf. http://www.ciat.cgiar.org/training/pdf/061129_diversidad_genetica_aguacate_ocampo.pdf (consulta 6 de febrero de 2008)

Orrego, G. (2006). Experiencias Exitosas. Compañía Mapaná, S.A. Finca Buenavista. I Encuentro de la Cadena Productiva de Aguacate. Rionegro, Recinto Quirama. Presentación digital.

Palmer, J.D. (1992). Mitocondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. In: Molecular systematic of plants. (Eds Solis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J) (Chapman and Hall: New York). 36-49.

Palmer, J.D. Adams, K.L. Cho, Y. Parkinson, C.L. Qiu, Y-L. Song, K. (2000). Dynamic evolution of plant mitocondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutations rates. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 97: 6960-6966.

Peakall, R. Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295.

Portafolio. (2017). Economía. Estados Unidos ha duplicado consumo de aguacate Hass colombiano. Bogotá Colombia. http://www.portafolio.co/economia/exportaciones-de-aguacate-hass-potencian-agroindustria-colombiana-511347.

Portalfrutícola (2013). Colombia, un “paraíso” para la palta. (http://www.portalfruticola.com/2013/05/15/colombia-un-paraiso-para-la-palta/?pais=colombia) Publicado on line el 15 de Mayo de 2013. (Consulta 3 de junio de 2014).

Popenoe, W. (1935). Origin of the cultivated races of avocados. Calif. Avocado Ass. 1935 Yearb. 19: 184- 194.

Presidencia de la Republica y DNP. (2005). Documento Visión Colombia 2019 II Centenario. Resumen ejecutivo. [en línea] . s.f. http:// www.dnp.gov.co/PortalWeb/Portals/0/.../2019/.../resumen_ejecutivo.pdf

Pritchard, J.K. Stephens, M. Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155:945–959.

Proexport. 2013. Colombia could become one of the largest avocado producers. (http://www.proexport.com.co/fr/print/14748). Publicado on line el 15 de Agosto de 2013. (Consulta 3 de junio de 2014).

Programa de Transformación Productiva. (2013). FIDUCOLDEX. Plan de Negocios de aguacate. Bogotá Colombia. https://www.ptp.com.co/documentos/PLAN%20DE%20NEGOCIO%20AGUACATE%2013 1211.pdf

Posada, D. (2008). jModeltest: Phylogenetic model averaring. Molecular Biology and Evolution. 25: 1253 – 1256.

Rauscher, J.T. Doyle, J.J. Brown, A.H.D. (2002). Internal transcribed spacer repeat specific primers and the analysis of hybridization in the Glycine tomentella (Leguminosae) polyploidy complex. Molecular Ecology. 11: 2691-2702.

Rhoddes, A. M. Malo, S. E Campbell, C. W. Carmer, S. G. (1971). A numerical taxonomic study of the avocado (*Persea americana* Mill.). Journal of the American Society for Horticultural Science 96: 391-395.

Ríos-Castaño, D. (2003). Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia. En: Actas V Congreso Mundial del Aguacate 2003. 143-147.

Rivera-Jiménez, H.J. Suárez-Padron, I. E Palacio-Mejía, J.D. (2009). Análisis de la diversidad genética de caña flecha *Gynerium sagittatum* Aubl. Usando la técnica AFLP. Agricultura Técnica en México. 35: 78-84.

Rodríguez-Medina, N.N. Rohde, W. González - Arencibia, C. Ramírez –Pérez, I.M. Fuentes-Lorenzo, J.L. Román- Gutiérrez, M.A. Xiques-Martín, X., Becker, D., Velásquez-Palenzuela, J.B. (2003). Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. Actas V congreso mundial del aguacate 2003. 47-53.

Rodríguez, M. Jaramillo, J.G. Orozco J. (2009). Colecta de Aguacates criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su

competitividad. Memorias III congreso latinoamericano de Aguacate. Noviembre 11, 12 y 13 de 2009.

Sánchez - Pérez, J. L. (1999). Recursos genéticos del aguacate (*Persea Americana* Mill.) y especies afines en México. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 7-18.

Schnell, R.J. Brown, J.S. Olano, C.T. Power, E.J. Krol, C.A. (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticulture Science 128: 881-889.

Scora, R. W. Bergh, B. O. Hopfinger, J. A. (1975). Leaf alkanes in *Persea* and related taxa. Biochemical Systematic and Ecology 3: 215-218.

Sharon, D. Cregan, P.B. Mhameed, S. Kusharska, M. Hillel, J. Lahav, E. Lavi, U. (1997). An integrated genetic linkage map of avocado. Theoretical and Applied Genetics. 95: 911 -921.

Small, R.L. Ryburn, J.A. Cronn, R.C. Seelanan, T. Wendel, J.F. (1998). The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. American Journal of Botany. 85: 1301-1315.

Sneath, P. Sokal, R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman. 573p

Soto, E. Avilán, I. Pérez, M. Rodríguez, M. Ruiz, J. (2007). Evaluación de aguacates criollos de aguacate (*Persea* spp) en la colección del INIA-CENIAP en Venezuela. En: Memorias VI congreso Mundial de Aguacate, Viña del Mar Chile, 2007

Stafford, H.A. (1991). Flavonoid evolution: an enzymic approach. Journal of Plant Physiology. 96: 680-685.

Staub, J.E. Kuhns, J. May, B. Grun, P. (1982). Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. Journal of the American Society for Horticulture Science 107: 405-408.

Storey, W. B. Bergh, B. Zentmyer, G. A. (1986). The Origin, indigenous range and dissemination of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook. 70: 127-143.

Stuber, C.W. (1994). Success in the use of molecular markers for yield enhancement in com. Proc. 49th Annual Corn and Sorghum Industry Res. Conf., American Seed Trade Assoc. 49:232-238.

Taah, K. J. Alderson, P. G. Power, J.B. (2003). Molecular approaches for the characterization of Ghanaian avocado pear (*Persea americana* Mill.) germplasm. En: Actas V Congreso Mundial del Aguacate 2003. 69-72.

Takami, Y. Koshio, C. Ishii, M. Fujii, H. Hidaka, T. Shimizu, I. (2004). Genetic diversity and structure of urban populations of Pieris butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. Molecular Ecology. 13: 245–258.

Tamura, K. Dudley, J. Nei, M. Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Tapia, R. Guzmán, F.A. Polaco, O. (2013). Los gonfoterios (Proboscidea, Gomphotheriidae) de Colima, México. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana 65: 591-607.

Taylor LP, Jorgensen R. (1992). Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. Journal of Heredity. 83: 11-17.

Templeton A. R., (2009). Statistical hypothesis testing in intraspecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. Molecular Ecology, 18: 319–331.

Torres, A. M. Bergh, B. O. (1980). Fruit and leaf isoenzymes as genetic markers in avocado Journal of the American Society for Horticulture Science. 116: 1078-1081.

Tucker, M. L. Durbin M.L. Clegg, M.T. Lewis L.N. (1987). Avocado Cellulase: nucleotide sequence of a putative full-length cDNA clone and evidence for a small gene family. Plant Molecular Biology. 9: 197-203.

Velásquez, J.A. (2006). Identificación del aguacate como un rubro importante de grandes oportunidades comerciales, según los acuerdos de integración, los nuevos tratados comerciales y el comercio mundial globalizado. Secretaría de Productividad y Competitividad. Gobernación de Antioquia. Disponible Archivo digital pdf.

Vázquez–Domínguez, E., (2002). Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. In: Protected areas and the regional planning imperative in North America: 369–378 (G. Nelson, J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky & C. Vásquez, Eds.). Univ. of Calgary Press, Canada.

Verwoert, I.I. Verbree, E.C. van der Linden, K.H. Nijkamp, H.J. Stuitje, A.R. (1992). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Escherichia coli fabD gene, carrier protein transacylase. Journal of Bacteriology. 174: 2851 - 2857.

Villanueva, D.F. (2014). Estructura poblacional y estructuración genética de la polilla guatemalteca (Tecia solanivora) (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia: Evaluación de su poder invasivo. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Viruel, M.A. Gross, E. Barcelo-Muñoz, A. (2007). Desarrollo de un mapa genético con marcadores SSRs y AFLPs en aguacate. En: Memorias VI congreso Mundial de Aguacate, Viña del Mar Chile, 2007

Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. Van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A., Pot, J. Peleman, J. Kuiper., M. Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407-4414.

Wendel, J.F. (1989). New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. Proceedings of the National Academic of Sciences of the Unites States of America. 86: 4132 – 4136.

Wendel, J.F. Schnabel, A. Seelanan, T. (1995). Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proceedings of the National Academy of Sciences. 92. 280-284.

Wendel, J.F., Doyle, J.J. (1998). Phylogenetics incongruence: window into genome history and molecular evolution. In Molecular systematic of plants II. DNA sequencing. (Eds D Soltis, J Doyle) (Kluwer academic Publishing)

Warschefsky, E. J., Klein, L. L., Frank, M. H., Chitwood, D. H., Londo, J. P., von Wettberg, E. J., & Miller, A. J. (2016). Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. Trends in Plant Science, 21(5), 418–437.

Williams, L.O. (1977). The botany of the avocado and its relatives. Proc. 1st International Tropical fruit Short Course, The avocado. University of Florida, Gainesville, Florida. USA. 9 – 15.

Wolfe, K.H. Li, W-H. Sharp, P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84: 9054-9058.

Wright, S. (1961). The genetical structure of populations. Annals in Eugenetics. 1: 323-334.

Yan, G. Romero-Severson, J. Walton, M. Chadee, D. D. Severson, D. W. (1999). Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Molecular Ecology. 8: 951–963.

Zhang, A. B., Kubota, K., Takami, Y., Kim, J. L., Kim, J. K. & Sota, T., (2005). Species status and phylogeography of two closely related Coptolabrus species (Coleoptera: Carabidae) in South Korea inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. Molecular Ecology, 14: 3823–3841.

Zeder, M.A. (2015). Core questions in domestication research. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 3191–3198.

Zentmyer, G. A., E. Schieber. (1992). *Persea* and *Phytophthora* in Latin America. Proc. Of Second World Avocado Congress 1992. 61 – 66.

Zimmer, E.A. Martin, S.L. Beverly, S.M. Kan, W. Wilson, A.C. (1980). Rapid duplication and loss of genes coding for the α chains of hemoglobin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 77. 2158-2162.

Zink, R. M., (2002). Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. Integrative and Comparative Biology, 42: 953–959.

Objetivos.

Objetivo general.

Identificar el potencial como portainjertos de aguacates criollos provenientes de diferentes zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia, mediante el estudio de su diversidad y similitud genética; como un primer paso para la obtención de material vegetal de siembra certificado en Colombia.

Capítulo I. Caracterización molecular y variabilidad genética de aguacates criollos de aguacate candidatos a portainjertos, provenientes de diferentes zonas productoras de Antioquia y Colombia, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

Objetivos.

1.1. Estimar la diversidad genetica existente en aguacates criollos procedentes de diferentes zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia a través del uso de marcadores moleculares codominantes microsatélites.

1.2. Determinar si existe estructura poblacional entre las poblaciones de aguacates criollos colombianos.

Capítulo II. Comparación genética de cultivares de aguacate criollo colombiano con genotipos de aguacate en condiciones *ex situ* de diversos orígenes del mundo.

Objetivos.

2.1. Estimar el nivel de similitud genética e identificación racial entre aguacates criollos en condiciones *in situ* de zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia con cultivares de aguacate de diversos orígenes a nivel mundial conservados en condiciones *ex situ* mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

2.2. Determinar si existe estructuración genética entre los aguacates criollos colombianos y cultivares de aguacate de diversos orígenes del mundo.

Capítulo III. Caracterización morfológica y molecular de aguacates criollos de aguacate del departamento de Antioquia candidatos a portainjertos.

Objetivos.

3.1. Estimar la diversidad fenotípica existente en aguacates criollos procedentes de diferentes zonas productoras del departamento de Antioquia mediante el uso de descriptores morfológicos del árbol, rama y hoja.

3.2. Establecer si existe correlación entre la variabilidad genética, medida en términos de heterocigosidad y caracteres morfológicos de árbol rama y hoja en los aguacates criollos del departamento de Antioquia.

3.3. Determinar si existe correlación entre la variabilidad genética, medida en términos de heterocigosidad y caracteres del paisaje como la topografía y altitud del sitio de ubicación de los aguacates criollos del departamento de Antioquia.

Capítulo IV. Búsqueda del origen y diversidad genética de aguacates criollos de aguacate del departamento de Antioquia candidatos a portainjertos, mediante la secuenciación de genes nucleares.

Objetivos.

4.1. Estimar el número de subpoblaciones existentes de los aguacates criollos procedentes del departamento de Antioquia, y los cultivares de aguacate de diferentes variedades y orígenes reportados en el GenBank mediante un análisis bayesiano, basado en las secuencias nucléotidicas de los genes nucleares: Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D- Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*).

4.2. Establecer las relaciones ancestro-descendientes entre aguacates criollos del departamento de Antioquia y cultivares de aguacate de diferentes variedades y orígenes reportados en el GenBank, mediante la realización de filogenias de máxima verosimilitud y Bayesianas de secuencias de los genes nucleares Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D- Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*).

4.3. Evaluar la similitud genética existente entre aguacates criollos del departamento de Antioquia y cultivares de aguacate de diferentes variedades y orígenes reportados en el GenBank, a través de la identificación de haplotipos generados para cada uno de los genes

nucleares evaluados (Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D- Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*)).

Capítulo I.

Caracterización molecular y variabilidad genética de aguacates criollos candidatos a portainjertos, provenientes de diferentes zonas productoras de Antioquia y Colombia, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

1.1. Resumen.

Con el fin de conocer los recursos genéticos de aguacate existentes en el departamento de Antioquia y en Colombia, su diversidad y estructura genética y su potencial de uso como portainjertos para las variedades de aguacate sembradas en su misma zona o región, se realizó la caracterización molecular de aguacates criollos ubicados en diferentes subregiones productoras de aguacate del departamento de Antioquia y también de aguacates criollos ubicados en los departamentos de Bolívar, Cauca, Caldas, Cesar, Huila, Magdalena, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca. La caracterización de los cultivares se realizó mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites, diseñados para *Persea americana* Mill. por Sharon et al. (1997) y Ashworth et al. (2004). Los cultivares caracterizados fueron colectados y analizados en diferentes periodos de tiempo. Mediante el análisis de parámetros de diversidad genética, se determinó que los aguacates criollos de la subregión del Oriente Antioqueño presentan mayor diversidad genética con relación a otras subregiones del departamento convirtiéndoles en una promisoria fuente de genes para la selección de portainjertos y futuros programas de mejoramiento genético. A través del test AMOVA, sus resultados establecieron que las poblaciones de aguacates criollos tanto del departamento de Antioquia (F_{ST}=0.05439, p<0.0001 y F_{ST}=0.084, P<0.01) y departamentos de Colombia (F_{ST}=0.068 (P<0.01) fueron significativos, indicando que existe diferenciación genética entre sus poblaciones, pero en un porcentaje muy bajo, entre el 5 y 8%; pero la mayor diferenciación genética se presentó dentro de las poblaciones entre el 31 y 37%. Un análisis de asignación poblacional mediante el software STRUCTURE, logró determinar la estructura genética de los aguacates criollos de aguacate para Antioquia (K=3) y para 12 departamentos de Colombia (K=8); sin embargo no fue posible la asignación de los cultivares a cada grupo, por la baja probabilidad de asignación que presentaron los cultivares debido a su carácter híbrido.

1.2. Introducción.

Actualmente el aguacate (*Persea americana* Mill) se produce en casi todos los países de clima cálido y templado, aunque la mayor parte de sus cultivos se encuentran en los países latinoamericanos, esto debido a que esta especie es originaria de América. La distribución natural de este cultivo es desde México hasta Chile, pasando por Centroamérica, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Bernal y Díaz, 2005; Gutiérrez-Díez et al. 2009). Múltiples hibridaciones ocurridas en diferentes ambientes ecológicos de México y Centroamérica dieron origen al aguacate comestible que se consume hoy en día, en las regiones americanas en donde este se cultiva desde tiempos precolombinos. La producción proviene de fuentes distintas de árboles nativos o criollos y cultivares selectos reproducidos asexualmente, en los cuales el sabor y los valores nutritivos varían según el tipo ecológico (Mijares y López-López, 1998). No se puede asegurar que las antiguas civilizaciones o grupos étnicos que participaron en el proceso de domesticación del aguacate, hayan contribuido de alguna manera a la diferenciación de *P. americana* en subespecies, pero es evidente que se dieron tipos divergentes que se desarrollaron en zonas geográficamente aisladas que finalmente dieron lugar a variedades botánicas distintas con diferencias marcadas en la adaptación climática (Storey et al. 1986; Bergh, 1992). Estas variedades son conocidas ampliamente a nivel mundial como razas ecológicas o razas hortícolas del aguacate y son: *P. americana* var. drymifolia conocida como raza Mexicana, *P. nubigena* var. guatemalensis conocida como raza Guatemalteca y *P. americana* var. Americana conocida como raza Antillana (Storey et al. 1986; Campos-Rojas et al. 2007).

En Colombia, se producen aguacates desde el nivel del mar, hasta los 2.200 m de altura, principalmente para el mercado local, pero con gran potencial exportador, tanto como fruta fresca, como procesada puesto que las características de las variedades cultivadas y las condiciones agroclimáticas de las regiones productoras son ideales para este cultivo (Ríos-Castaño, 2003). En el departamento de Antioquia, el aguacate se ha identificado como un cultivo de grandes oportunidades comerciales ya que cuenta con adaptación a diversidad en suelos y climas, que sumada a la experiencia demostrada en el cultivo, le proporciona ventajas, competitivas y comparativas frente a otras regiones productivas del país. Sin embargo, y pese a estas grandes ventajas el cultivo de aguacate en Antioquia, y en general

en Colombia, presenta varios problemas entre los que se cuenta, la falta de certificación en cuanto a su identidad genética (Ríos-Castaño, 2003).

Uno de los aspectos fundamentales para el éxito de un cultivo comercial de aguacate, radica en la selección adecuada de las variedades a sembrar, dado que con ello se consigue, entre otras ventajas, garantizar la continuidad en la producción, alargamiento de los periodos de cosecha, mayores volúmenes de producción, disminución en el riesgo de problemas ocasionados por plagas y enfermedades, mejor desarrollo del cultivo y mayor calidad de la fruta (Ríos-Castaño, 2003). La mejor alternativa para el éxito de un cultivo comercial es la injertación de variedades comerciales de aceptación en el mercado, que sean seleccionadas del mismo huerto, zona o región, sobre patrones locales o criollos; ya que de esta manera se garantiza una alta adaptabilidad al pertenecer a un mismo ecosistema. La importancia de los materiales criollos se basa no solamente en su desempeño (desarrollo y productividad) en estos ecosistemas, sino también en que constituyen una fuente importante de variabilidad genética, cuya composición se hace necesaria conocer mediante su caracterización molecular.

Los marcadores moleculares se han convertido en una de las principales herramientas para la caracterización molecular y mejoramiento genético en plantas, ya que permiten identificar, clasificar y analizar la variabilidad genética de un material vegetal, de forma que se pueda aprovechar la diversidad existente en los genomas de las plantas (Gutiérrez-Díez et al., 2009). Según Gutiérrez-Díez et al. (2009), la generación de marcadores moleculares en este cultivo ha sido lenta con respecto a otras especies vegetales; sin embargo se han desarrollado estudios en varios de los países productores cuyo objetivo ha sido conocer su origen mediante la caracterización molecular de árboles nativos y colecciones existentes en diferentes estaciones experimentales y zonas productoras.

Un ejemplo de estos marcadores moleculares son los microsatélites, también conocidos como marcadores SSR (Secuencias Simples Repetidas). Los microsatélites son fragmentos de ADN que consisten en repeticiones en tándem de 1 a 6 pb. Estos marcadores se localizan en todo el genoma nuclear, mitocondrial y cloroplasto de las especies y representan uno de los mejores marcadores en genética de poblaciones dado que son codominantes y presentan un alto polimorfismo (Freeland, 2005). Varios loci de

microsatélites han sido desarrollados en el aguacate (Sharon et al. 1997; Ashworth et al. 2004; Borrone et al. 2007; Gross-German y Viruel, 2013). Por ejemplo Sharon y colaboradores (1997) y Borrone y colaboradores (2009), usaron este tipo de marcadores para la construcción de mapas de ligamiento en aguacate, Alcaraz and Hormaza (2007) y Schnell y colaboradores (2003) realizaron la caracterización molecular de un banco de germoplasma en aguacate y análisis de su diversidad genética. Otro ejemplo de uso de marcadores microsatélites en aguacate es el estudio realizado por Kwame Acheampong et al. (2008), el cual consistió en conocer el origen, raza y relación genética de 172 cultivares de aguacate de Ghana procedentes de diferentes fincas mediante el uso de 12 marcadores microsatélites. En este estudio se encontró que los cultivares de Ghana están genéticamente más cercanos a la raza Antillana pero distinguiéndose de la raza Mexicana y Guatemalteca, lo que propone que posiblemente las otras razas no pudieron sobrevivir debido a las condiciones ambientales de este país.

Con el presente capítulo se pretende, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites caracterizar aguacates criollos ubicados en diferentes zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia, con el fin de conocer que tanta diversidad genética existe en estas poblaciones y que tan estructuradas genéticamente están; de forma que se pueda conocer los recursos genéticos de aguacate existentes en estas zonas e identificar aguacates criollos con potencial de uso como portainjertos.

1.3. Objetivos.

A. Estimar la diversidad genética existente en aguacates criollos procedentes de diferentes zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia a través del uso de marcadores moleculares codominantes microsatélites.

B. Determinar si existe estructura poblacional entre las poblaciones de aguacates criollos colombianos.

1.4. Materiales y métodos.

1.4.1. Material vegetal y extracción de ADN.

Un primer grupo de muestras de aguacate fueron colectadas en el departamento de Antioquia durante los años 2009 a 2011. Se colectaron hojas jóvenes de 90 cultivares de aguacate denominados “criollos” localizados en tres subregiones del departamento. La selección de los sitios para el muestreo se realizó teniendo en cuenta las zonas donde generalmente los agricultores obtienen las semillas para los portainjertos utilizados para la injertación de las de diferentes variedades comerciales, en especial para el cultivar Hass. Las locaciones incluyeron dos poblaciones de la sub-región paramo del Oriente antioqueño (Sonsón y Abejorral con 2.475 y 2.275 metros de altura sobre el nivel del mar respectivamente, cinco poblaciones de la sub-región altiplano del Oriente antioqueño (El Retiro, Marinilla, Rio negro, La Ceja, y San Vicente, con alturas sobre el nivel del mar entre 2.080 y 2.200) y cuatro poblaciones del Suroeste antioqueño (Caramanta, Santa Bárbara, Valparaíso y Montebello con alturas sobre el nivel del mar entre 1.375 y 2.350), para un total de 11 poblaciones. El número de muestras colectadas en cada región se observa en la Tabla 1-1.

Un segundo grupo de muestras de aguacate fueron colectadas durante los años 2014 y 2015. Se colectaron igualmente hojas jóvenes de 92 aguacates criollos provenientes de seis subregiones de Antioquia y distribuidos así: Oriente = 25, Suroeste = 34, Occidente = 7, Nordeste = 8, Urabá = 15 y Altiplano norte =3. La descripción de estos cultivares se puede observar en la Tabla 1-2. Adicionalmente se tuvieron en cuenta para este capítulo, 105 aguacates criollos correspondientes a accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate, ubicada en el municipio de Palmira Valle del Cauca y la cual se encuentra bajo la custodia de Agrosavia. Estos aguacates criollos fueron provenientes de 12 departamentos de Colombia distribuidos de la siguiente forma: Bolívar = 9, Caldas = 4, Cauca = 4, Cesar = 2, Huila = 4, Magdalena = 12, Nariño = 10, Quindío = 9, Risaralda = 6, Santander = 15, Tolima = 7 y Valle del Cauca = 23 (Tabla 1-3)

Tabla 1- 1. Aguacates criollos de aguacate colectados en tres subregiones de Antioquia durante los años 2009 a 2011.

Codigo ecotipo	Localidad	Subregión	Altitud msnm	Codigo ecotipo	Localidad	Subregión	Altitud msnm
17	Sonsón	Oriente paramo	2237	175	Rionegro	Oriente altiplano	2168
24	Sonsón	Oriente paramo	1907	176	Rionegro	Oriente altiplano	2172
25	Sonsón	Oriente paramo	1892	201	Rionegro	Oriente altiplano	2150
27	Sonsón	Oriente paramo	1915	202	Rionegro	Oriente altiplano	2150
33	Sonsón	Oriente paramo	1833	203	Rionegro	Oriente altiplano	2166
316	Sonsón	Oriente paramo	2205	204	Rionegro	Oriente altiplano	2158
317	Sonsón	Oriente paramo	2207	145	La Ceja	Oriente altiplano	2080
322	Sonsón	Oriente paramo	2200	147	La Ceja	Oriente altiplano	2066
329	Sonsón	Oriente paramo	2152	150	La Ceja	Oriente altiplano	2151
330	Sonsón	Oriente paramo	2146	152	La Ceja	Oriente altiplano	2137
331	Sonsón	Oriente paramo	2136	156	La Ceja	Oriente altiplano	2178
354	Sonsón	Oriente paramo	2340	157	La Ceja	Oriente altiplano	2164
356	Sonsón	Oriente paramo	2341	4	Santa Barbara	Suroeste	894
359	Sonsón	Oriente paramo	2258	5	Santa Barbara	Suroeste	864
360	Sonsón	Oriente paramo	2268	107	Caramanta	Suroeste	2086
362	Sonsón	Oriente paramo	2273	109	Caramanta	Suroeste	2089
374	Sonsón	Oriente paramo	2145	117	Caramanta	Suroeste	1980
388	Abejorral	Oriente paramo	1800	118	Caramanta	Suroeste	1994
390	Abejorral	Oriente paramo	1761	119	Caramanta	Suroeste	1977
399	Abejorral	Oriente paramo	1636	293	Caramanta	Suroeste	2027
400	Abejorral	Oriente paramo	1647	294	Caramanta	Suroeste	2026
404	Abejorral	Oriente paramo	1650	295	Caramanta	Suroeste	2020
411	Abejorral	Oriente paramo	1642	297	Caramanta	Suroeste	2011
412	Abejorral	Oriente paramo	1644	298	Caramanta	Suroeste	2005
413	Abejorral	Oriente paramo	1655	312	Caramanta	Suroeste	2092
417	Abejorral	Oriente paramo	1658	314	Caramanta	Suroeste	2085
1	El Retiro	Oriente altiplano	1975	315	Caramanta	Suroeste	2091
2	El Retiro	Oriente altiplano	1920	99	Valparaiso	Suroeste	1894
179	El Retiro	Oriente altiplano	2199	100	Valparaiso	Suroeste	1906
193	El Retiro	Oriente altiplano	2112	101	Valparaiso	Suroeste	1907
194	El Retiro	Oriente altiplano	2100	256	Montebello	Suroeste	1965
35	San Vicente	Oriente altiplano	2084	257	Montebello	Suroeste	1960
37	San Vicente	Oriente altiplano	2173	258	Montebello	Suroeste	1954
38	San Vicente	Oriente altiplano	2175	259	Montebello	Suroeste	1952
39	San Vicente	Oriente altiplano	2176	263	Montebello	Suroeste	1932
40	San Vicente	Oriente altiplano	2197	264	Montebello	Suroeste	1931
41	San Vicente	Oriente altiplano	2194	265	Montebello	Suroeste	1930
44	Marinilla	Oriente altiplano	2049	266	Montebello	Suroeste	1926
45	Marinilla	Oriente altiplano	2100	273	Montebello	Suroeste	1915
46	Marinilla	Oriente altiplano	2124	276	Montebello	Suroeste	1890
47	Marinilla	Oriente altiplano	2183	279	Montebello	Suroeste	1867
62	Marinilla	Oriente altiplano		280	Montebello	Suroeste	1868
64	Marinilla	Oriente altiplano		21 Hass	Sonsón	Oriente paramo	2181
170	Rionegro	Oriente altiplano	2150	307 Hass	Caramanta	Suroeste	2376
171	Rionegro	Oriente altiplano	2150	428 Hass	Rionegro	Oriente altiplano	2135

Tabla 1- 2. Aguacates criollos de aguacate colectados en seis subregiones de Antioquia durante los años 2014 y 2015.

Codigo ecotipo	Localidad	Subregión	Altitud msnm	Codigo ecotipo	Localidad	Subregión	Altitud msnm
ANSS5	Sonsón	Oriente	2238	*ANJA35*	Jardín	Suroeste	1881
ANSS6	Sonsón	Oriente	2277	*ANJA36*	Jardín	Suroeste	1904
ANSS7	Sonsón	Oriente	2244	*ANJA37*	Jardín	Suroeste	1945
ANSS8	Sonsón	Oriente	1841	*ANJA38*	Jardín	Suroeste	1921
ANSS9	Sonsón	Oriente	1823	*ANJA40*	Jardín	Suroeste	1797
ANSS10	Sonsón	Oriente	1806	*ANJE33*	Jerico	Suroeste	1909
ANSS11	Sonsón	Oriente	1918	*ANJE34*	Jerico	Suroeste	1909
ANSS45	Sonsón	Oriente	2236	*ANRR85*	Urrao	Suroeste	1813
ANSS81	Sonsón	Oriente	1905	*ANRR86*	Urrao	Suroeste	1900
ANAB12	Abejorral	Oriente	847	*ANRR87*	Urrao	Suroeste	1933
ANAB13	Abejorral	Oriente	978	*ANRR88*	Urrao	Suroeste	1921
ANAB22	Abejorral	Oriente	1747	*ANRR89*	Urrao	Suroeste	1979
ANAB23	Abejorral	Oriente	1843	*ANRR89M*	Urrao	Suroeste	1979
ANAB24	Abejorral	Oriente	1909	*ANAR48*	Arboletes	Urabá	89
ANAB42	Abejorral	Oriente	2121	*ANAR49*	Arboletes	Urabá	100
ANAB43	Abejorral	Oriente	2109	*ANAR49M*	Arboletes	Urabá	96
ANAB46	Abejorral	Oriente	876	*ANSJ50*	San Juan	Urabá	230
ANAB98	Abejorral	Oriente	1902	*ANNE55*	Necocli	Urabá	204
ANRN84	Rionegro	Oriente	2144	*ANNE56*	Necocli	Urabá	58
ANRN91	Rionegro	Oriente	2133	*ANTU57*	Turbo	Urabá	35
ANRN92	Rionegro	Oriente	2138	*ANTU57M*	Turbo	Urabá	35
ANRN93	Rionegro	Oriente	2140	*ANAP58*	Apartadó	Urabá	176
ANRN94	Rionegro	Oriente	2131	*ANAP58M*	Apartadó	Urabá	232
ANRN95	Rionegro	Oriente	2136	*ANCA59*	Carepa	Urabá	337
ANRN96	Rionegro	Oriente	2136	*ANCA66*	Carepa	Urabá	335
ANSB14	Santa Barbara	Suroeste	1022	*ANMU63*	Mutata	Urabá	128
ANSB15	Santa Barbara	Suroeste	1022	*ANCH64*	Chigorodo	Urabá	50
ANSB16	Santa Barbara	Suroeste	1022	*ANCH65*	Chigorodo	Urabá	44
ANSB17	Santa Barbara	Suroeste	883	*ANCG53*	Cañas Gordas	Occidente	957
ANSB18	Santa Barbara	Suroeste	922	*ANCG54*	Cañas Gordas	Occidente	957
ANSB19	Santa Barbara	Suroeste	971	*ANDA62*	Dabeiba	Occidente	471
ANSB20	Santa Barbara	Suroeste	927	*ANBU51*	Buriticá	Occidente	1640
ANSB21	Santa Barbara	Suroeste	863	*ANGI52*	Giraldo	Occidente	2040
ANSB47	Santa Barbara	Suroeste	845	*ANUR60*	Uramita	Occidente	786
ANSB72	Santa Barbara	Suroeste	1010	*ANUR61*	Uramita	Occidente	804
ANSB73	Santa Barbara	Suroeste	1017	*ANCI74*	Cisneros	Nordeste	1057
ANCA25	Caramanta	Suroeste	2094	*ANCI75*	Cisneros	Nordeste	1055
ANCA28	Caramanta	Suroeste	1956	*ANSR76*	San Roque	Nordeste	890
ANCA29	Caramanta	Suroeste	1956	*ANSR77*	San Roque	Nordeste	873
ANVA30	Valparaiso	Suroeste	1921	*ANSR78*	San Roque	Nordeste	1074
ANVA32	Valparaiso	Suroeste	1950	*ANCA80*	Caracolí	Nordeste	631
ANVA82	Valparaiso	Suroeste	1954	*ANMA79*	Maceo	Nordeste	652
ANVA83	Valparaiso	Suroeste	1950	*ANMA104*	Maceo	Nordeste	642
ANVE26	Venecia	Suroeste	757	*ANER100*	Entrerios	Altiplano norte	2457
ANVE27	Venecia	Suroeste	755	*ANER101*	Entrerios	Altiplano norte	2493
ANJA31	Jardín	Suroeste	1993	*ANER102*	Entrerios	Altiplano norte	2353

Tabla 1- 3. Aguacates criollos provenientes de diferentes departamentos del país pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate.

Codigo ecotipo	Departamento	Codigo ecotipo	Departamento	Codigo ecotipo	Departamento
BOCA-018	*Bolivar*	*NATU-008*	*Nariño*	*SACA-017*	*Santander*
BOCA-015	*Bolivar*	*NATU-011*	*Nariño*	*SACA-019*	*Santander*
BOCA-021	*Bolivar*	*NARIÑO 1*	*Nariño*	*SALA-030*	*Santander*
BOCA-022	*Bolivar*	*NACHA-002*	*Nariño*	*SARI-021*	*Santander*
BOCB67	*Bolivar*	*NATU-009*	*Nariño*	*SALA-031*	*Santander*
BOCB68	*Bolivar*	*NATU-001*	*Nariño*	*TOCHA-025*	*Tolima*
BOSJ69	*Bolivar*	*NATU-003*	*Nariño*	*TOMA-003*	*Tolima*
BOJN70	*Bolivar*	*NACHA-003*	*Nariño*	*TOFRE-019*	*Tolima*
BOJN71	*Bolivar*	*NATU-002*	*Nariño*	*TOIB-050*	*Tolima*
CAVI-030	*Caldas*	*NACHA-004*	*Nariño*	*TOAL-004*	*Tolima*
CAVI-041	*Caldas*	*QUIPI-003*	*Quindio*	*TOIB-030*	*Tolima*
CAVI-030	*Caldas*	*QUIAR-022*	*Quindio*	*TOAL-005*	*Tolima*
CAVI-041	*Caldas*	*QUICO-009*	*Quindio*	*VAPA-066*	*Valledelcauca*
CACAJ-042	*Cauca*	*QUIPI-001*	*Quindio*	*VAPA-063*	*Valledelcauca*
CACAJ-044	*Cauca*	*QUIQUI-029*	*Quindio*	*VAPA-061*	*Valledelcauca*
CACAJ-037	*Cauca*	*QUIBU-011*	*Quindio*	*VABU-014*	*Valledelcauca*
CACAJ-036	*Cauca*	*QUICO-006*	*Quindio*	*VABU-010*	*Valledelcauca*
CEPU-008	*Cesar*	*QUICO-005*	*Quindio*	*VARO-003*	*Valledelcauca*
CELA-006	*Cesar*	*QUICO-015*	*Quindio*	*VABU-024*	*Valledelcauca*
HUGA-012	*Huila*	*RIPE-006*	*Risaralda*	*VAPA-062*	*Valledelcauca*
HUSU-004	*Huila*	*RIQUI-008*	*Risaralda*	*VARO-001*	*Valledelcauca*
HUAL-017	*Huila*	*RIPE-007*	*Risaralda*	*VABU-021*	*Valledelcauca*
HUAL-018	*Huila*	*RIPE-001*	*Risaralda*	*VABU-016*	*Valledelcauca*
MASA-026	*Magdalena*	*RIPE-003*	*Risaralda*	*VARO-006*	*Valledelcauca*
MACI-005	*Magdalena*	*RIPE-002*	*Risaralda*	*VARO-002*	*Valledelcauca*
MACI-018	*Magdalena*	*SALA-028*	*Santander*	*VAPA-064*	*Valledelcauca*
MASA-001	*Magdalena*	*SACA-014*	*Santander*	*VAPA-026*	*Valledelcauca*
MACI-010	*Magdalena*	*SASA-003*	*Santander*	*VABU-022*	*Valledelcauca*
MACI-017	*Magdalena*	*SASA-005*	*Santander*	*VAPA-021*	*Valledelcauca*
MACI-025	*Magdalena*	*SASA-004*	*Santander*	*VARO-020*	*Valledelcauca*
MACI-019	*Magdalena*	*SASA-006*	*Santander*	*VAPA-020*	*Valledelcauca*
MACI-021	*Magdalena*	*SASA-009*	*Santander*	*VAPA-070*	*Valledelcauca*
MAFU-016	*Magdalena*	*SARI-027*	*Santander*	*VAPA-060*	*Valledelcauca*
MACI-023	*Magdalena*	*SARI-023*	*Santander*	*VAYO-098*	*Valledelcauca*
MAFU-048	*Magdalena*	*SACA-013*	*Santander*	*VAPA-056*	*Valledelcauca*

Estos cultivares fueron colectados entre los años 2006 – 2009, bajo un proyecto alianza entre Corpoica – Profrutales Ltda - CIAT, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y el Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola (FNFH). El ADN genómico de todos los cultivares a aguacate, fue obtenido a partir de hojas jóvenes con el método de extracción de ADN estandarizado por Cañas-Gutiérrez et al. (2015).

1.4.2. Análisis con marcadores SSR.

Los aguacates criollos de Antioquia que fueron colectados entre los años 2009 y 2011 fueron caracterizados a partir de los marcadores microsatélites utilizados por Alcaraz y Hormaza (2007) y diseñados por Sharon et al. (1997) y Ashworth et al. (2004), de los cuales se seleccionaron 14 microsatélites basados en su alto polimorfismo (Tabla 1-4). Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un volumen de 15 µl que contenían 16 mM (NH4)2SO4, 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% Tween20, 2 mM MgCl2, 0.1 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cada primer, 25 ng de ADN genómico y 0.5 unidades de BioTaqTM ADN polimerasa (Bioline, London, UK). Los primers forward fueron marcados con coloración fluorescente WellRed en el extremo 5' (Proligo, France). Las reacciones se hicieron en un termociclador I-cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) usando los siguientes perfiles de temperatura: un paso inicial de un minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos así: 30 segundos a 94°C, posteriormente 30 segundos a 50°C y un minuto a 72°C y un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en un equipo de electroforesis capilar en un equipo CEQTM 8000 capillary DNA analysis system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cada reacción fue repetida dos veces con el fin de minimizar la variación entre corridos.

Para la caracterización de los aguacates criollos colectados en Antioquia durante los años 2014 y 2015 y las accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate que comprende aguacates criollos de varios departamentos de Colombia se utilizaron únicamente 12 de los 14 microsatélites. En este caso, la amplificación se realizó a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tres reacciones multiplex, en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando como molde el ADN obtenido de cada uno de los cultivares y cebadores fluorescentes, siguiendo como base las condiciones reportadas por Alcaraz y Hormaza (2007).

Las tres reacciones de PCR multiplex fueron realizadas en un volumen de 10 µl que contenían 16 mM (NH4)2SO4, 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% Tween 20, 2 mM MgCl2, 0.1 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cada primer, 25 ng de ADN genómico y 0.5 unidades de GoTaq® ADN polimerasa (Promega, WI,USA). Los cebadores forward fueron marcados con coloración fluorescente (Life Technologies, CA, USA) en el extremo 5' (Tabla 1-5). Para las reacciones de PCR multiplex 2 y 3 se usaron los siguientes perfiles de temperatura: un paso inicial de un minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos así: 30 segundos a 94°C, posteriormente 30 segundos a 58°C y un minuto a 72°C y un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Para la reacción de PCR multiplex 1 se utilizaron los mismos perfiles de temperatura a excepción de la temperatura de anillamiento de los primers que para este caso fue de 55°C.

Los productos de amplificación fueron analizados en un equipo de electroforesis capilar ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA); como servicio prestado por el laboratorio Identigen de la Universidad de Antioquia. Una vez corridas las muestras se pasó a la etapa de identificación de alelos para cada uno de los individuos con cada uno de los locus microsatélites, mediante el uso de Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystem, CA, USA).

Tabla 1- 4. Marcadores SSRs seleccionados para la caracterización molecular de aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2009 y 2011.

Locus	Referencia
AVAG 21	Sharon *et al*. 1997
AVD003	Ashworth*et al*. 2004
AVD001	Ashworth*et al*. 2004
AVMIX03	Sharon *et al*. 1997
AVT 386	Ashworth*et al*. 2004
AVD006	Ashworth*et al*. 2004
AVT 372	Ashworth*et al*. 2004
AVD 102	Ashworth*et al*. 2004
AVD 017	Ashworth*et al*. 2004
AVD 022	Ashworth*et al*. 2004
AVMIX04	Sharon *et al*. 1997
AVT 226	Ashworth*et al*. 2004
AVD013	Ashworth*et al*. 2004
AVA 12	Sharon *et al*. 1997

Tabla 1- 5. Marcadores microsatélites seleccionados para la caracterización molecular aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2014 y 2015 y aguacates criollos de varios departamentos de Colombia.

Locus	Referencia	Fluoróforo	Rango alélico en pb
AVT 226	Ashworth*et al*. 2004	VIC	292-327
AVT 372	Ashworth*et al*. 2004	HEX	164-200
AVT 386	Ashworth*et al*. 2004	PET	220-234
AVD 102	Ashworth*et al*. 2004	PET	150-201
AVD 017	Ashworth*et al*. 2004	HEX	168-223
AVD 022	Ashworth*et al*. 2004	FAM	216-260
AVAG 21	Sharon *et al*. 1997	FAM	158-221
AVD.001	Ashworth*et al*. 2004	HEX	208-267
AVD006	Ashworth*et al*. 2004	FAM	301-348
AVA 12	Sharon *et al*. 1997	HEX	130-142
AVMIX03	Sharon *et al*. 1997	PET	143-190
AVMIX04	Sharon *et al*. 1997	VIC	121-194

1.4.3. Análisis de datos.

Los datos fueron analizados de forma independiente de acuerdo a la época en que fueron muestreados los cultivares criollos. Como primera medida se realizó un análisis para los aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2009 a 2011 y posteriormente el análisis de los cultivares criollos de Antioquia colectados durante los años 2014 y 2015 y los de otros departamentos de Colombia pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate.

Mediante el software GENALEX 6. (Pekall y Smouse, 2006) se determinó la diversidad genética para cada locus microsatélite a través de los siguientes estadísticos: número de alelos por locus (N), número de alelos diferentes (Na), número efectivo de alelos (Ne), calculado a través de la fórmula 1 / (Sum pi^2) donde pi es la frecuencia del alelo i, índice de Shannon-Weaber (I) mediante la fórmula -1* Sum (pi * Ln (pi)), heterocigosidad observada (H_o) como el número observado de heterocigotos sobre el número total de individuos, heterocigosidad esperada (H_e) dada como 1 - Sum pi^2, heterocigosidad esperada no sesgada (uH_e) dada como (2N/(2N-1))* H_e e índice de fijación (*F*) con la formula (H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e).

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p < 0.01$), fue calculado para cada locus y para cada población usando el método de cadena de Markov, al igual que el desequilibrio de ligamiento a través del programa GENEPOP v.4.0.10 (Raymond and Rousset, 1995). Para conocer el nivel de significancia se realizó el test de Bonferroni, test conservador que penaliza de mayor forma detectando menos diferencias de las que hay realmente en los datos, debido a que el nivel de significancia para el contraste global queda por debajo del fijado anteriormente.

Se realizaron análisis de genética poblacional para los aguacates criollos de Antioquia de forma independiente, de acuerdo a la época en que fueron muestreados y para los aguacates criollos colombianos; a través del uso del software GENALEX 6. (Pekall y Smouse, 2006), identificando parámetros de estructura poblacional teniendo en cuenta los estimadores F_{IT}, F_{IS} y F_{ST}. Adicionalmente mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) se analizó la variación entre y dentro de poblaciones, con su significancia estadística, bajo la hipótesis nula “los alelos o genotipos tienen la misma distribución en todas las poblaciones”, pero sin requerir equilibrio de Hardy Weinberg; este análisis también fue realizado mediante el software GENALEX 6 (Pekall y Smouse, 2006). Para complementar este análisis un dendograma Neighbour joining fue calculado por individuo para los cultivares provenientes de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011, usando el índice de similaridad de Dice con el programa PAST Versión 3.22 (Hammer et al. 2001). Para los aguacates criollos de Antioquia colectados en los años 2014 a 2015 y criollos colombianos, se uso el software GENALEX 6 (Pekall y Smouse, 2006), para calcular las distancias genéticas de Nei pareadas entre las muestras pertenecientes a los tres niveles de poblaciones: localidades, Subregiones de Antioquia y departamentos de Colombia. Estas distancias fueron utilizadas para graficar dendogramas neighbor joining (NJ) con el programa MEGA 4.0 (Kumar et al., 2008). Valores bootstrap no fueron estimados para el dendograma NJ, ya que los datos de entrada fueron distancias de Nei pareadas calculadas únicamente entre los individuos muestreados.

Se realizó también un análisis basado en el modelo de agrupamiento STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000) el cual fue usado para evaluar la pertenencia más probable de cada individuo a cada grupo para las poblaciones de aguacates criollos de las diferentes subregiones de Antioquia y las poblaciones de aguacates criollos procedentes de diferentes departamentos de Colombia. El programa fue corrido con una Cadena de

Markov Monte Carlo (CMMC) de 1.000.000 pasos, después de un periodo de burnin de 100.000 iteraciones desde K=1 hasta K=15 bajo un modelo de admixtura. Cada valor K fue calculado a partir de 10 corridas independientes. La probabilidad estimada ad hoc de K (delta K) (Evanno et al. (2005) fue empleada para estimar el número más probable de poblaciones (K) basado en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos [Ln Pr (X/K)].

1.5. Resultados.

1.5.1. Resultados obtenidos para cultivares de aguacate colectados en el departamento de Antioquia durante los años 2009 a 2011.

1.5.1.1. Polimorfismo SSR y diversidad genética.

Los parámetros de diversidad genética para las 11 poblaciones del departamento de Antioquia se observan en la tabla 1-6. Con los 14 marcadores SSR analizados se logró la amplificación de 147 fragmentos. El número de alelos por locus estuvo en un rango desde 4 (*AVA12*) hasta 16 (*AVMIX04*), con un promedio de 10,5. El número total de alelos amplificados por población fue mayor para la población de Sonsón con 248. El menor número de alelos amplificados por población fue de 28 para la población de Santa Bárbara, la cual a la vez presento el menor número de individuos por población (2). Con respecto al número de alelos diferentes por locus (Na), la población de Caramanta fue la que presento el mayor valor (6,429) y el menor fue para la población de Santa Bárbara (2,0). El número de alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación determinada por el número de alelos efectivos por locus (Ne) fue mayor para la población de Rionegro con un valor de 4,0 y menor en la población de Santa Bárbara. El índice de Shannon – Weaber, el cual es un indicativo de la diversidad existente en las poblaciones, estuvo en un rango entre 0,582 para Santa Bárbara a 1,485 para las poblaciones de Rionegro y Caramanta. La heterocigosidad observada a estuvo en un rango entre 0,393 (Santa Bárbara) y 0,571(Valparaíso) y la heterocigosidad esperada en un rango entre 0,384 (Santa Bárbara) y 0,724 (Rionegro). El índice de fijación de Wright's (*F*), el cual permite comparar la heterocigosidad observada y esperada, fue positivo para la mayoría de poblaciones con excepción de la población de Santa Bárbara, y El Retiro, donde el parámetro *F* fue negativo.

Tabla 1- 6. Parámetros de diversidad genética para poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011.

Población	Ni	Nt		N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Sonsón	**18**	**248**	**Media**	17,714	5,786	3,336	1,344	0,486	0,663	0,258
			DE	0,163	0,576	0,341	0,099	0,043	0,031	0,061
Abejorral	**9**	**125**	**Media**	8,929	4,143	2,820	1,120	0,528	0,603	0,120
			DE	0,071	0,533	0,279	0,107	0,051	0,035	0,083
El Retiro	**5**	**67**	**Media**	4,786	3,143	2,686	0,984	0,560	0,570	-0,011
			DE	0,155	0,275	0,257	0,105	0,092	0,052	0,146
La Ceja	**6**	**84**	**Media**	6,000	4,786	3,717	1,373	0,536	0,702	0,221
			DE	0,000	0,422	0,345	0,087	0,053	0,025	0,081
San Vicente	**6**	**82**	**Media**	5,857	3,857	2,775	1,066	0,398	0,574	0,316
			DE	0,097	0,443	0,294	0,122	0,073	0,054	0,095
Marinilla	**6**	**83**	**Media**	5,929	3,643	2,626	1,010	0,426	0,548	0,213
			DE	0,071	0,341	0,307	0,109	0,081	0,051	0,118
Rionegro	**9**	**123**	**Media**	8,786	5,643	4,008	1,485	0,539	0,724	0,233
			DE	0,155	0,401	0,340	0,084	0,051	0,026	0,084
Santa Barbara	**2**	**28**	**Media**	2,000	2,000	1,814	0,582	0,393	0,384	-0,030
			DE	0,000	0,182	0,157	0,097	0,107	0,061	0,193
Valparaiso	**3**	**42**	**Media**	3,000	3,214	2,655	1,021	0,571	0,587	0,028
			DE	0,000	0,214	0,223	0,077	0,089	0,035	0,137
Caramanta	**14**	**191**	**Media**	13,643	6,429	3,739	1,485	0,435	0,703	0,365
			DE	0,133	0,510	0,345	0,086	0,052	0,028	0,078
Montebello	**12**	**162**	**Media**	11,571	5,429	3,117	1,305	0,521	0,648	0,212
			DE	0,137	0,402	0,241	0,088	0,055	0,033	0,073

Ni= Número de individuos por población
Nt= Número total de alelos
N= Número promedio de alelos
DE= Desviación estandar
Na= Número de alelos diferentes
Ne= Número de alelos efectivos
I= Indice de Shannon
Ho= Heterocigosidad observada
He= Heterocigosidad esperada
F= Indice de fijación

Con respecto al equilibrio Hardy – Weinberg, todos los microsatélites probados por población resultaron estar en equilibrio de Hardy – Weinberg; luego de realizar la corrección de Bonferroni (Tabla 1-7). Con relación al análisis de desequilibrio de ligamiento una vez realizada la corrección de Bonferroni, mostró que la mayoría de microsatélites estaban en equilibrio de ligamiento (datos no presentados).

Tabla 1- 7. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011.

				Test de Bonferroni		
Población	**P-Val**	**D.E.**	**Switches (ave.)**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
Sonsón	1.000	0.0000	14299.71	0.05/11	0,0045	ns
Abejorral	0.9995	0.0002	22094.43	0.05/10	0,005	ns
El Retiro	0.9839	0.0012	17810.15	0.05/9	0,0055	ns
La Ceja	1.000	0.0000	12670.14	0.05/8	0,0062	ns
San Vicente	1.000	0.0000	14988.69	0.05/7	0,0071	ns
Marinilla	0.9998	0.0001	13880.15	0.05/6	0,0083	ns
Rionegro	1.000	0.0000	9659.57	0.05/5	0,01	ns
Santa Barbar	0.9854	0.0004	23649.25	0.05/4	0,0125	ns
Valparaiso	0.9898	0.0007	10294.38	0.05/3	0,016	ns
Caramanta	1.000	0.0000	9671.36	0.05/2	0,025	ns
Montebello	1.000	0.0000	11768.43	0.05/1	0,05	ns

P-Val= Valor probabilidad D.E.= Desviación estandar

1.5.1.2. Análisis de varianza molecular y relaciones genéticas.

La prueba AMOVA estimó un valor F_{ST} = 0.05439, p<0.0001 (Tabla 1-8) sugiriendo la estructuración genética de cultivares de aguacate dentro de Antioquia. Además la prueba AMOVA también mostró que la mayor variabilidad genética ocurrió dentro (94.5%) más que entre poblaciones (5.44%).

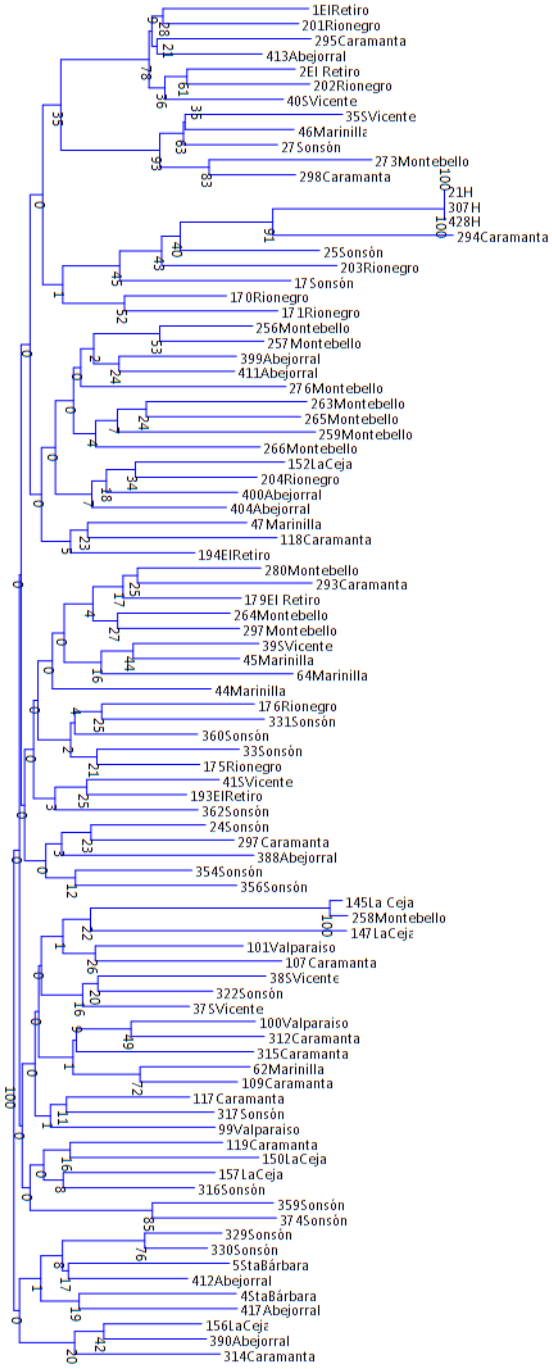
Tabla 1- 8. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo del departamento de Antioquia colectados en los años 2009 y 2011.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Fst	P
Entre poblaciones	10	76.455	0.23010 Va	5.44	0.05439	0.00001
Dentro poblaciones	169	676.117	4.0007 Vb	94.56		

Adicionalmente, el dendograma basado en análisis Neighbour - Joining, usando matriz de similaridad generada por la distancia de Dice, agrupo a los aguacates criollos de Antioquia

provenientes de 11 poblaciones en 6 cluster; sin embargo esta agrupación no estuvo determinada por la localidad y altitud de donde fueron colectadas (Figura 1-1).

Figura 1- 1. Agrupamiento de los 90 cultivares de aguacate colectado en los años 2009 a 2011 en el departamento de Antioquia. Dendograma basado en análisis Neighbour - Joining, usando matriz de similaridad generada por la distancia de Dice.



1.5.1.3. Asignación poblacional.

Con el análisis con STRUCTURE para los cultivares de aguacate de Antioquia colectados entre los años 2009 a 2011 (N= 11 poblaciones), se obtuvo un valor K= 3 grupos, los cuales fueron agrupados basados en el valor de máxima verosimilitud de Ln (P|D) = -3839.8, producción de un valor de máxima probabilidad ΔK = 6.79 (Figura. 1-2). La figura generada por STRUCTURE nos muestra que algunos cultivares tienen una alta probabilidad de pertenecia a uno de los K= 3 grupos, mientras que otros se mezclan entre los K=3 grupos. Esto se puede observar mejor en la tabla 1-9, en donde se observan las probabilidades de inferencia a un K grupo de las 11 poblaciones analizadas, en donde, cultivares pertenecientes a los municipios de Abejorral, El Retiro y Montebello presentaron probabilidades de inferencia por encima de 0,6 de pertenecer al grupo 1 y los cultivares pertenecientes a los municipios de Sonsón, San Vicente, Marinilla, Valparaiso y Caramanta presentaron probabilidades de inferencia por encima de 0,6 de pertenecer al grupo 3. Los cultivares pertenecientes a las poblaciones de Santa Bárbara, La Ceja y Rionegro presentaron probabilidades de inferencia por de bajo de 0,5 para los 3 grupos. Estos resultados nos indican que las K=3 poblaciones definidas por STRUCTURE no están definidas de acuerdo a los municipios y subregiones donde se encuentran los cultivares analizados.

Figura 1- 2. Número de K subpoblaciones obtenidas con STRUCTURE posterior al test de Evanno para los cultivares de Antioquia.

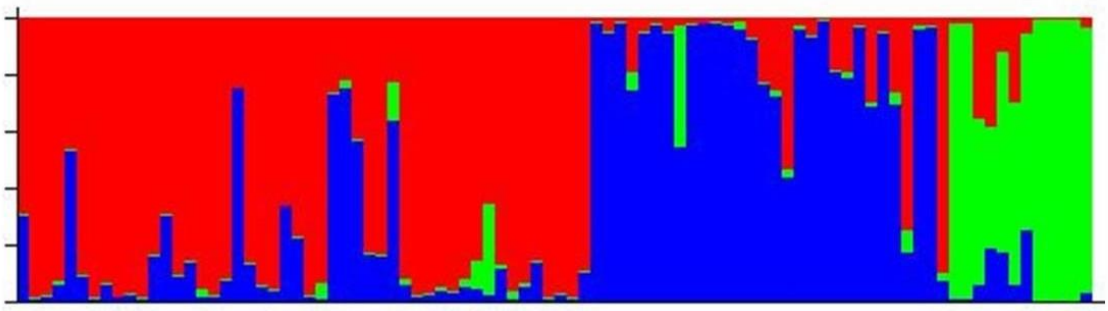


Tabla 1-9. Subpoblaciones K inferidas a través de STRUCTURE y test de Evanno para cultivares del departamento de Antioquia.

A. Poblaciones inferidas obtenidas para cultivares de Antioquia.

Pop	Inferred clusters			Individuals
	1	2	3	
Sonsón	0.219	0.150	*0.631*	18
Abejorral	*0.607*	0.013	0.380	9
Retiro	*0.704*	0.008	0.288	5
La Ceja	0.284	0.294	*0.422*	6
San Vicente	0.294	0.019	*0.687*	6
Marinilla	0.324	0.009	*0.667*	6
Río Negro	*0.448*	0.248	0.304	9
Santa Bárbar	0.430	0.007	*0.563*	2
Valparaíso	0.092	0.028	*0.880*	3
Caramanta	0.113	0.210	*0.677*	14
Montebello	*0.784*	0.178	0.038	12

B. Test de Evanno para cultivares de Antioquia.

k	Ln P(D)	Var [LnP(D)]	L´k	L´´k	[L´´k]	DeltaK
1	-4276	65.9				
2	-4020.4	278.2	255.60	-65.00	65.00	38.970
3	-3829.8	261.1	190.60	-109.80	109.80	*67.951*
4	-3749.0	319.7	80.80	-9.20	9.20	0.51453
5	-3677.4	405.2	71.60	-88.40	88.40	43.915
6	-3694.2	560.4	-16.80	-83.00	83.00	35.061
7	-3794.0	911.2	-99.80	169.30	169.30	56.085
8	-3724.5	869.2	69.50	-5.90	5.90	0.2001
9	-3660.9	665.5	63.60	89.50	89.50	34.693
10	-3507.8	650.3	153.10	-153.10	153.10	60.036

1.5.2. Resultados obtenidos para aguacates criollos colectados en el departamento de Antioquia durante los años 2014 a 2015 y aguacates criollos de otros departamentos de Colombia.

1.5.2.1. Polimorfismo y diversidad genética.

Los parámetros de diversidad genética para las poblaciones correspondientes a los aguacates criollos procedentes de las seis subregiones de Antioquia para cada locus microsatélite se observan en la tabla 1-10. Un total de 147 fragmentos fueron amplificados con los 12 marcadores microsatélites analizados para las poblaciones de las 6 subregiones de Antioquia. El número de alelos por locus estuvo en un rango desde 9 (*AVT386*, AVT372, *AVD102*) a 18 (*AVD013*), con un promedio de 12,25 alelos por locus. Con respecto al número total de alelos amplificados por población, el Suroeste presentó el mayor número con 375 alelos, seguido del Oriente con 244 alelos y la población con menor número de alelos amplificados fue el Altiplano norte con solo 13 alelos; cabe anotar que la población del Altiplano norte estaba conformada solo por 3 individuos, un número mucho menor al Suroeste (36) y el Oriente (25). Para el número de alelos diferentes por locus (Na), las poblaciones que presentaron el mayor valor fueron Oriente (8,50) y Suroeste (8,50); la población que presentó el menor valor fue el Altiplano – norte (1,42). Con respecto al número efectivo de alelos por locus (Ne), el cual nos indica los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación, fue mayor en la población del Oriente con un valor de 4,57 y menor en el Altiplano – norte con un valor de 1,40. El índice de Shannon – Weaber, el cual es un indicativo de la diversidad existente estuvo en un rango de 0,43 para el Altiplano – norte y 1,70 para la población de Oriente. La heterocigosidad observada para las seis poblaciones estuvo en un rango entre 0.52 (Altiplano norte, Urabá) a 0.59 (Occidente) y la heterocigosidad esperada en un rango entre 0.30 (Altiplano – norte) a 0.76 (Oriente); la comparación entre estos dos parámetros se llevó a cabo basado en el índice de fijación de Wright's (F). De las seis poblaciones analizadas, el parámetro *F* fue positivo para Oriente, Suroeste, Urabá y Occidente, indicando un déficit de heterocigotos, mientras que para las poblaciones de Nordeste y Altiplano norte el parámetro *F* fue negativo indicando un exceso de heterocigotos con relación a la proporción esperada.

Los parámetros de diversidad genética para las poblaciones correspondientes a los aguacates criollos procedentes de 13 departamentos de Colombia se observan en la tabla 1-11. Con los 12 marcadores SSRs analizados se obtuvo una amplificación de 167 fragmentos.

Tabla 1- 10. Parámetros de diversidad genética de las poblaciones de aguacates criollos de aguacate de las seis subregiones de Antioquia colectados en los años 2014 y 2015.

Población	Ni	Nt		N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Oriente	25	244	Media	20,333	8,500	4,566	1,705	0,540	0,758	0,284
			DE	1,170	0,723	0,447	0,097	0,055	0,023	0,072
Suroeste	36	375	Media	31,250	8,500	4,288	1,605	0,518	0,722	0,287
			DE	1,181	0,866	0,613	0,119	0,049	0,030	0,059
Uraba	15	161	Media	13,417	6,000	3,458	1,361	0,521	0,649	0,189
			DE	0,701	0,640	0,537	0,119	0,053	0,043	0,076
Occidente	7	81	Media	6,750	5,667	4,272	1,489	0,585	0,715	0,203
			DE	0,131	0,607	0,550	0,127	0,087	0,041	0,094
Nordeste	8	76	Media	6,333	4,000	2,662	1,003	0,568	0,530	-0,104
			DE	0,829	0,564	0,426	0,149	0,095	0,066	0,147
Altiplanonorte	3	13	Media	1,083	1,417	1,400	0,433	0,528	0,301	-0,786
			DE	0,288	0,288	0,285	0,115	0,139	0,078	0,114

Ni= Número de individuos por población
Na= Número de alelos diferentes
Ho= Heterocigosidad observada
Nt= Número total de alelos
Ne= Número de alelos efectivos
He= Heterocigosidad esperada
N= Número promedio de alelos
I= Indice de Shannon
F= Indice de fijación
DE= Desviación estandar

El número de alelos por locus estuvo en un rango desde 10 (*AVD102*) a 21 (*AVD006*), con un promedio de 13,9 alelos por locus. El número total de alelos amplificados por población fue mayor para el departamento de Antioquia con 969 alelos amplificados, seguido por el departamento del Valle del Cauca con 217 alelos amplificados y menor para el departamento del Cesar con 20 alelos amplificados. Para el número de alelos diferentes por locus (Na), la población que presentó el mayor valor fue el departamento de Antioquia (12,25) y el menor para el departamento de Caldas (2,33). Con relación al número efectivo de alelos por locus (Ne), el mayor valor fue igualmente para el departamento de Antioquia (5,26) y menor para el departamento del Cauca (1,80). El indicativo de la diversidad existente mediante el índice de Shannon – Weaber, estuvo en un rango de 0.68 para el departamento del Cauca a 1,87 para el departamento de Antioquia. La heterocigosidad observada para las poblaciones representadas por los 13 departamentos de Colombia,

estuvo en un rango entre 0.37 (departamento del Cauca) y 0,70 (departamento de Risaralda) y la heterocigosidad esperada en un rango de 0,37 también para el departamento del Cauca y 0,78 para Antioquia y Valle del Cauca. El índice de fijación de Wright's (*F*) fue positivo para las poblaciones de los departamentos de Antioquia, Bolívar, Magdalena, Nariño, Quindío, Santander, Tolima y Valle del Cauca; para los departamentos de Caldas, Cauca, Cesar, Huila y Risaralda el parámetro *F* fue negativo.

Tabla 1- 11. Parámetros de diversidad genética de las poblaciones de aguacates criollos de 13 departamentos de Colombia.

Población	Ni	Nt		N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Antioquia	**96**	969	**Media**	80,750	12,250	5,262	1,873	0,537	0,785	0,319
			DE	3,908	0,970	0,611	0,100	0,044	0,020	0,050
Bolivar	**9**	85	**Media**	7,083	3,750	2,604	1,057	0,434	0,589	0,283
			DE	0,633	0,305	0,196	0,078	0,074	0,034	0,109
Caldas	**4**	30	**Media**	2,500	2,333	2,278	0,809	0,667	0,458	-0,483
			DE	0,557	0,527	0,522	0,183	0,142	0,100	0,070
Cauca	**4**	33	**Media**	2,750	2,417	1,801	0,683	0,375	0,378	-0,003
			DE	0,538	0,514	0,390	0,166	0,104	0,090	0,112
Cesar	**2**	20	**Media**	1,667	2,667	2,472	0,895	0,667	0,531	-0,267
			DE	0,188	0,333	0,319	0,131	0,112	0,074	0,127
Huila	**4**	34	**Media**	2,833	2,750	2,249	0,868	0,618	0,512	-0,189
			DE	0,322	0,329	0,277	0,112	0,106	0,060	0,143
Magdalena	**12**	107	**Media**	8,917	4,417	3,055	1,168	0,549	0,601	0,111
			DE	1,090	0,514	0,346	0,140	0,081	0,065	0,074
Nariño	**10**	95	**Media**	7,917	5,833	4,471	1,570	0,576	0,754	0,242
			DE	0,712	0,458	0,389	0,087	0,071	0,024	0,086
Quindio	**9**	93	**Media**	7,750	6,333	4,827	1,648	0,569	0,771	0,269
			DE	0,552	0,607	0,475	0,094	0,064	0,021	0,079
Risaralda	**6**	61	**Media**	5,083	4,500	3,341	1,319	0,700	0,686	-0,012
			DE	0,379	0,261	0,217	0,060	0,053	0,021	0,059
Santander	**15**	138	**Media**	11,500	5,750	3,400	1,315	0,453	0,628	0,271
			DE	0,839	0,566	0,531	0,130	0,059	0,052	0,063
Tolima	**7**	74	**Media**	6,167	4,833	3,423	1,347	0,587	0,694	0,145
			DE	0,345	0,405	0,237	0,072	0,059	0,020	0,092
Valledelcauca	**23**	217	**Media**	18,083	8,167	5,205	1,774	0,599	0,790	0,246
			DE	1,454	0,787	0,518	0,093	0,041	0,017	0,046

Ni= Número de individuos por población
Nt= Número total de alelos
N= Número promedio de alelos
DE= Desviación estandar
Na= Número de alelos diferentes
Ne= Número de alelos efectivos
I= Indice de Shannon
Ho= Heterocigosidad observada
He= Heterocigosidad esperada
F= Indice de fijación

1.5.2.2. Equilibrio Hardy Weinberg (EHW).

Los resultados del test para determinar el EHW en las poblaciones correspondientes a las 6 subregiones de Antioquia, después de realizar el test de Bonferroni, mostró diferencias significativas entre las heterocigocidades observadas y esperadas para 4 de las 6 poblaciones analizadas: Oriente (*P* = 0,000), Suroeste (*P* = 0,000), Urabá (*P* = 0,000), y Occidente (*P* = 0,000); las poblaciones del Nordeste y Altiplano – norte, no fueron significativos para el equilibrio de Hardy Weinberg (Tabla 1-12).

Tabla 1- 7. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de Antioquia.

			Test de Bonferroni			
Población	**P-Val**	**D.E.**	**switches (ave.)**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
Oriente	0.0000	0.0000	7012.33	0.05/6	0.0083	*
Suroeste	0.0000	0.0000	7875.25	0.05/5	0,01	*
Urabá	0.0000	0.0000	8630.17	0.05/4	0,0125	*
Occidente	0.0000	0.0000	8352.17	0.05/3	0,016	*
Nordeste	0.0399	0.0044	11291.10	0.05/2	0,025	ns
Altiplano norte	0.5683	0.0036	15582.00	0.05/1	0,05	ns

P-Val= Valor probabilidad D.E.= Desviación estandar

Los resultados del test para determinar el EHW en los loci analizados mostró diferencias significativas entre las heterocigocidades observadas y esperadas para 9 de los 12 loci: *AVT226* (*P*=0.0000), *AVT372* (*P* = 0,000), *AVD017* (*P* = 0,000), *AVD022* (*P* = 0,000), *AVD001* (*P* = 0,000), *AVD006* (*P* = 0,000), *AVA12* (*P* = 0,000), *AVMIX03* (*P* = 0,000), *AVMIX04* (*P* = 0,000); Los loci *AVT386*, *AVD102*, *AVAG21*, no fueron significativos para el equilibrio de Hardy Weinberg (Tabla 1-13).

Los resultados del test para determinar el EHW en las poblaciones correspondientes a los 13 departamentos de Colombia, después de realizar el test de Bonferroni, mostró diferencias significativas entre las heterocigocidades observadas y esperadas para 7 de las 13 poblaciones, las cuales fueron: Antioquia (*P* = 0,000), Bolívar (*P* = 0,001), Nariño (*P* = 0,000), Quindío (*P* = 0,000), Santander (*P* = 0,000), Tolima (*P* = 0,009), y Valle del Cauca (*P* = 0,000) (Tabla 1-14). Las 6 poblaciones restantes (Caldas, Cauca, Cesar, Huila, Magdalena y Risaralda) no fueron significativas para el equilibrio de Hardy Weinberg.

Tabla 1- 8. Test para evaluar el EHW por cada locus en las poblaciones de Antioquia.

				Test de Bonferroni		
Locus	**P-Val**	**D.E.**	**Switches (ave.)**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
AVT 226	0.0000	0.0000	10219.00	0.05/12	0,0041	*
AVT 372	0.0000	0.0000	8467.80	0.05/11	0,0045	*
AVT 386	0.0351	0.0043	9466.00	0.05/10	0,005	ns
AVD 102	0.3060	0.0159	7941.00	0.05/9	0,0055	ns
AVD 017	0.0000	0.0000	4826.00	0.05/8	0,0062	*
AVD 022	0.0000	0.0000	9805.83	0.05/7	0,0071	*
AVAG 21	0.0197	0.0048	7059.00	0.05/6	0,0083	ns
AVD001	0.0000	0.0000	10397.75	0.05/5	0,01	*
AVD006	0.0000	0.0000	5276.40	0.05/4	0,0125	*
AVA 12	0.0000	0.0000	14385.60	0.05/3	0,016	*
AVMIX03	0.0000	0.0000	3912.20	0.05/2	0,025	*
AVMIX04	0.0000	0.0000	14111.20	0.05/1	0,05	*

P-Val= Valor probabilidad D.E.= Desviación estandar

Tabla 1- 9. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de Colombia.

				Test de Bonferroni		
Población	**P-Val**	**D.E.**	**Switches (ave.)**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
Antioquia	0.0000	0.0000	7454.92	0.05/13	0,0038	*
Bolivar	0.0001	0.0000	16431.67	0.05/12	0,0041	*
Caldas	1.000	0.0000	14617.38	0.05/11	0,0045	ns
Cauca	0.1050	0.0043	9966.57	0.05/10	0,005	ns
Cesar	0.1758	0.0035	7024.22	0.05/9	0,0055	ns
Huila	0.6658	0.0044	12396.56	0.05/8	0,0062	ns
Magdalena	0.0125	0.0019	14420.91	0.05/7	0,0071	ns
Nariño	0.0000	0.0000	8394.33	0.05/6	0,0083	*
Quindio	0.0000	0.0000	7753.00	0.05/5	0,01	*
Risaralda	0.1048	0.0049	8489.08	0.05/4	0,0125	ns
Santander	0.0000	0.0000	7773.42	0.05/3	0,016	*
Tolima	0.0009	0.0002	10254.83	0.05/2	0,025	*
Valle del Cauca	0.0000	0.0000	8910.58	0.05/1	0,05	*

P-Val= Valor probabilidad D.E.= Desviación estandar

Los resultados del test para determinar el EHW en los loci analizados mostró diferencias significativas entre las heterocigosidades observadas y esperadas para 11 de los 12 loci analizados; únicamente el locus *AVD102* estuvo en equilibrio de Hardy Weinberg; este

locus también estuvo en equilibrio de Hardy Weinberg en el análisis de las poblaciones de las subregiones de Antioquia (Tabla 1-15).

Tabla 1- 10. Test para evaluar el EHW por cada locus en las poblaciones de Colombia.

				Test de Bonferroni		
Locus	**P-Val**	**D.E.**	**Switches (ave.)**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
AVT 226	0.0000	0.0000	10104.00	0.05/12	0,0041	*
AVT 372	0.0000	0.0000	13905.18	0.05/11	0,0045	*
AVT 386	0.0003	0.0002	12030.00	0.05/10	0,005	*
AVD 102	0.0463	0.0068	11515.67	0.05/9	0,0055	ns
AVD 017	0.0000	0.0000	10081.08	0.05/8	0,0062	*
AVD 022	0.0000	0.0000	9277.00	0.05/7	0,0071	*
AVAG 21	0.0000	0.0000	8132.08	0.05/6	0,0083	*
AVD001	0.0000	0.0000	11319.08	0.05/5	0,01	*
AVD006	0.0000	0.0000	9804.23	0.05/4	0,0125	*
AVA 12	0.0000	0.0000	13651.33	0.05/3	0,016	*
AVMIX03	0.0000	0.0000	4852.46	0.05/2	0,025	*
AVMIX04	0.0000	0.0000	8203.12	0.05/1	0,05	*

P-Val= Valor probabilidad D.E.= Desviación estandar

1.5.2.3. Desequilibrio de ligamiento.

El análisis de desequilibrio de ligamiento (DL) realizado en las poblaciones correspondientes a las seis subregiones de Antioquia índicó que la mayoría de marcadores no se encuentran ligados o asociados; sin embargo al realizar la corrección de Bonferroni se mostraron algunos marcadores asociados en la población del Oriente antioqueño, en donde el 4,5% de comparaciones entre marcadores estuvieron asociados (Tabla 1-16), que correspondieron a las parejas *AVD006*-AVA12, *AVD006-AVMIX03*, *AVT226-AVMIX03* y en la población del Suroeste en donde el 1,5% de comparaciones entre marcadores estuvieron asociados, correspondiendo a la pareja *AVT372-AVDO22* (Tabla 1-16). Para las poblaciones correspondientes a 13 departamentos de Colombia, al igual que para las subregiones de Antioquia la mayoría de marcadores no se encontraron asociados; solo en las poblaciones correspondientes a los departamentos de Magdalena, Quindío y cesar cada una presento una comparación de marcadores asociada y estas fueron *AVD102-AVD006*, *AVD006-AVA12*, *AVAG21-AVD001* respectivamente (Tabla 1-16).

Tabla 1- 11. Comparaciones de marcadores ligados de acuerdo a la corrección de Bonferroni.

						Test de Bonferroni		
Población	**Locus #1**	**Locus #2**	**P-Value**	**S.E.**	**Switches**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
OrienteAnt	*AVD006*	*AVA12*	0.000000	0.000000	1049	0.05/22	0,0022727	*
OrienteAnt	*AVD006*	*AVMIX03*	0.000910	0.000910	526	0.05/13	0,0038462	*
OrienteAnt	*AVT226*	*AVMIX03*	0.000000	0.000000	919	0.05/12	0,0041667	*
SuroesteAnt	*AVT372*	*AVDO22*	0.000700	0.000700	1401	0.05/55	0,0009091	*
Magdalena	*AVD102*	*AVD006*	0.001530	0.000988	3185	0.05/24	0,0020833	*
Quindio	*AVD006*	*AVA12*	0.001260	0.001210	3458	0.05/12	0,0041667	*
Santander	*AVAG21*	*AVD001*	0.001080	0.000725	8610	0.05/32	0,0015625	*

1.5.2.4. Análisis de varianza molecular.

El análisis de varianza molecular fue realizado en aguacates criollos procedentes del departamento de Antioquia a nivel de localidades (municipios) y subregiones. A nivel de localidades de Antioquia, el análisis de varianza molecular obtenido (Tabla 1-17) presentó un valor F_{ST} = 0.130 (P<0.01), valor significativo, sugiriendo que las poblaciones de aguacate a nivel de localidades están genéticamente diferenciadas, presentando una diferencia del 13% entre localidades y del 56% dentro de las localidades.

A nivel de subregiones de Antioquia el análisis de varianza molecular (Tabla 1-18) presentó un valor F_{ST} = 0.084 (P<0.01), valor significativo, sugiriendo que las poblaciones de aguacate a nivel de subregiones de Antioquia están también genéticamente diferenciadas, presentando un 8% de diferencia entre poblaciones y el 51% dentro de las poblaciones.

Tabla 1- 12. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo de Antioquia a nivel de localidades (municipios).

Fuente de Variación	df	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Estimación varianza.	%	Estadisticos F	P
Entre poblaciones	21	225,067	10,717	0,636	13%	Fst = 0,13	0,001
Entre individuos	66	379,643	5,752	1,498	31%	Fis = 0,352	0,001
Dentro individuos	88	242,5	2,756	2,756	56%	Fit = 0,436	0,001
Total	175	847,21		4,89	100%		

Tabla 1- 13. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo de Antioquia a nivel de subregiones.

Fuente de Variación	df	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Estimación varianza.	%	Estadisticos F	P
Entre poblaciones	5	89,847	17,969	0,415	8%	Fst = 0,084	0,001
Entre individuos	88	559,44	6,357	1,828	37%	Fis = 0,403	0,001
Dentro individuos	94	254	2,702	2,702	55%	Fit = 0,454	0,001
Total	187	903,287		4,945	100%		

El análisis de varianza molecular correspondiente a los aguacates criollos provenientes de los 13 departamentos de Colombia (Tabla 1-19), presentó un valor F_{ST} = 0.068 (P<0.01), valor significativo, sugiriendo igualmente que las poblaciones de aguacate a nivel de departamentos de Colombia están diferenciadas genéticamente, mostrando un 7% de diferencia entre poblaciones y un 55% dentro de las poblaciones.

Tabla 1- 14. Análisis de varianza molecular realizado a cultivares de aguacate criollo a nivel de departamentos de Colombia.

Fuente de Variación	df	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Estimación varianza.	%	Estadisticos F	P
Entre poblaciones	12	179,658	14,972	0,339	7%	Fst = 0,068	0,001
Entre individuos	188	1236,046	6,575	1,918	38%	Fis = 0,412	0,001
Dentro individuos	201	550,500	2,739	2,739	55%	Fit = 0,452	0,001
Total	401	1966,204		4,996	100%		

1.5.2.5. Relaciones de similitud genética entre las diferentes poblaciones.

Los dendogramas generados para los tres niveles de poblaciones (localidades de Antioquia, Subregiones de Antioquia y departamentos de Colombia) a través del método Neighbour joining (Saitou y Nei, 1987) y las distancias genéticas de Nei pareadas, presentaron en su mayoría la tendencia de agruparse de acuerdo a su ubicación geográfica y altitudes similares. La topología generada para las localidades de Antioquia (Figura 1-3) muestra mayor similitud genética entre las poblaciones de los municipios de Necocli y Apartado, Uramita y Cisneros con Chigorodó; las poblaciones de los municipios de Maceo con Turbo y Carepa y a la vez con la población del municipio de San roque; la población del municipio de Urrao, presentó mayor similitud genética con las poblaciones de los municipios de Santa Bárbara, Venecia y Jardín; la población del municipio de Sonsón está más relacionada genéticamente con las poblaciones de los municipios de Jericó, Abejorral, Caramanta y Valparaíso. Más distante en el dendograma se encuentra la población del municipio de Entrerríos, relacionada genéticamente con las poblaciones de los municipios de Arboletes, Rionegro y Cañasgordas.

El dendograma generado para las poblaciones correspondientes a las subregiones de Antioquia (Figura 1-4) muestra mayor similitud genética entre las subregiones del Urabá Antioqueño y el Occidente antioqueño con la subregión del Nordeste; seguidas por las

poblaciones correspondientes a las subregiones de suroeste y Oriente; y más alejada genéticamente se encuentra la subregión del Altiplano – norte.

Figura 1 - 3. Dendograma generado con el método Neighbour joining (Saitou y Nei, 1987) y distancia genética de Nei, para las poblaciones correspondientes a localidades (municipios) de Antioquia.

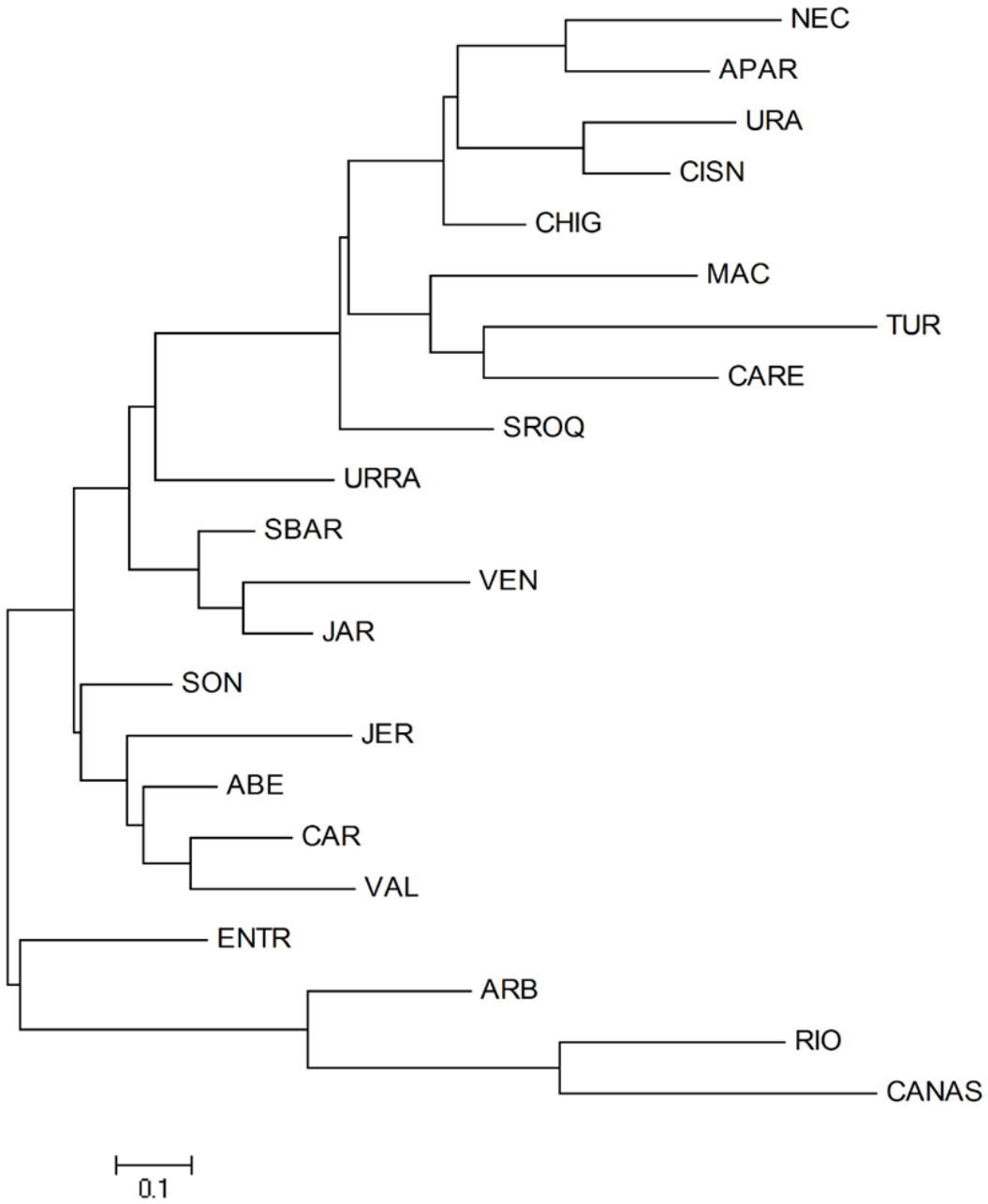
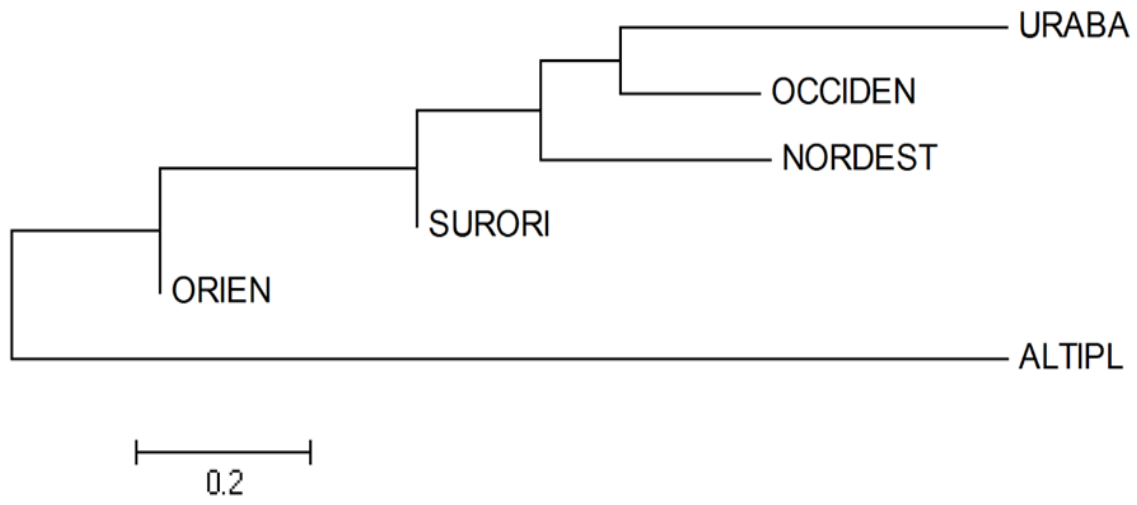
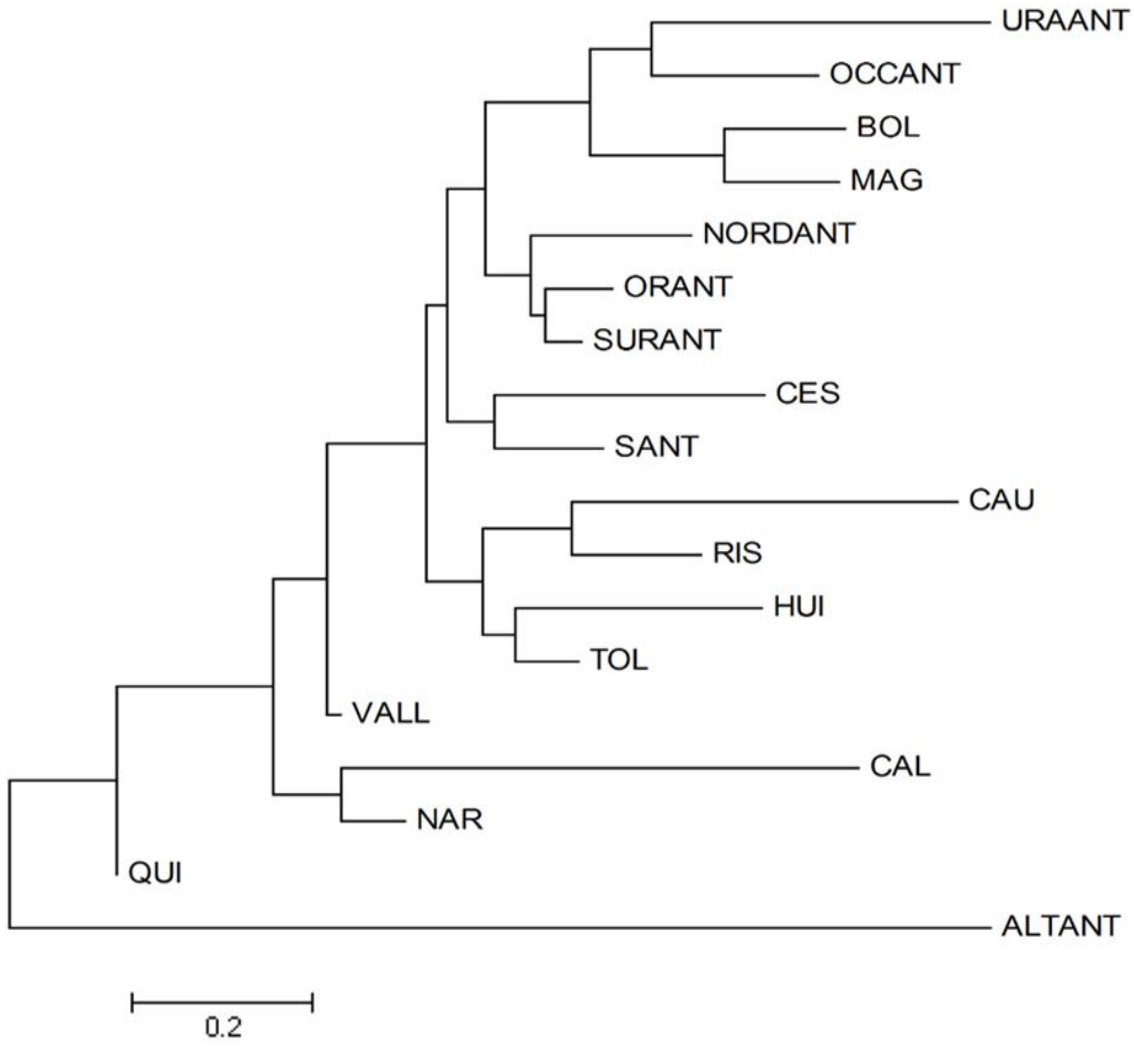


Figura 1-4. Dendograma generado con el método Neighbour joining (Saitou y Nei, 1987) y distancia genética de Nei, para las poblaciones correspondientes a Subregiones de Antioquia.



En el dendograma generado para las poblaciones correspondientes a los departamentos de Colombia (Figura 1-5), se realizó comparando las 6 subregiones de Colombia con las poblaciones de aguacates criollos correspondientes a los 12 departamentos de Colombia. Las poblaciones correspondientes a las subregiones de Antioquia Urabá y Occidente muestran mayor similitud genética con las poblaciones de los departamentos de Bolívar y Magdalena; las poblaciones correspondientes al nordeste antioqueño, Oriente y Suroeste antioqueño muestran mayor similitud genética con las poblaciones de los departamentos de Cesar y Santander; las poblaciones correspondientes a los departamentos de Cauca y Risaralda, resultaron estar genéticamente cercanas a las correspondientes a los departamentos de Huila y Tolima; estas seguidas por los departamentos de Valle del Cauca, la cual muestra estar más cercana genéticamente con los departamentos de Caldas y Nariño, y más alejada se encuentra la población del departamento del Quindío. Al igual que la topología generada para las poblaciones correspondientes a las Subregiones de Antioquia, el Altiplano – norte fue la población que estuvo más alejada genéticamente de las otras poblaciones.

Figura 1 - 5. Dendograma generado con el método Neighbour joining (Saitou y Nei, 1987) y distancia genética de Nei, para las poblaciones correspondientes a Subregiones de Antioquia y departamentos de Colombia.



1.5.2.6. Asignación poblacional.

El análisis de asignación poblacional mediante el software STRUCTURE, realizado para aguacates criollos de los departamentos de Antioquia, Bolívar, Cauca, Cesar, Huila, Magdalena, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca, permitió determinar que los aguacates criollos de estos 12 departamentos de Colombia, se subdividieron en K = 8 poblaciones, representadas en la figura 1-6.

El valor K = 8 fue seleccionado de acuerdo a que produjo el menor valor de probabilidad posterior bayesiana (Ln P (D)= -6289, varianza = 792,6), además el test ΔK o test de Evanno (Evanno et al. 2005) permitió estimar también ocho clusters (K= 8) como el número de poblaciones más acertado, debido a que produjo el mayor valor mejorado de máxima verosimilitud ΔK = 115.16 (Tabla 1-20). Las probabilidades de inclusión de un individuo de aguacate en una población K definida por STRUCTURE se observan en la tabla 1-21; las probabilidades fueron muy bajas, lo que dificulto la asignación de los cultivares a un grupo K especifico.

Figura 1 2. Resultado del análisis de asignación poblacional mediante el software STRUCTURE para aguacates criollos de aguacate procedentes de 12 departamentos de Colombia.

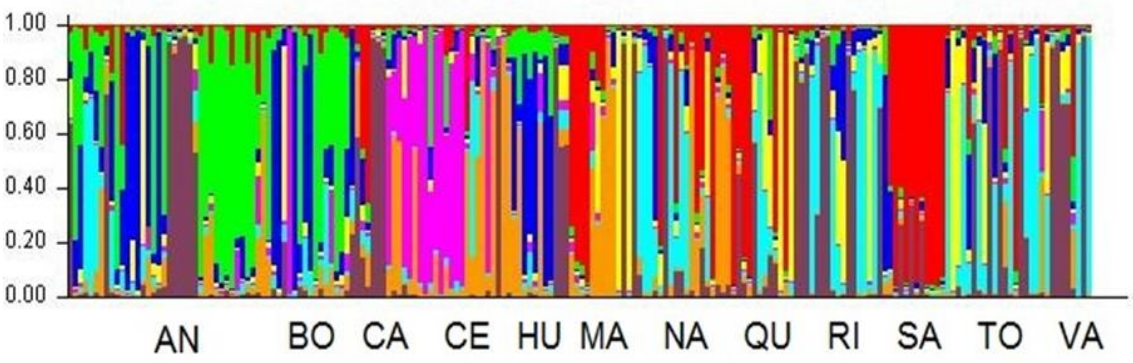


Tabla 1- 15. Test de Evano obtenido para la identificación de los K clusters en los que se subdividen las poblaciones de aguacate muestreadas en 12 departamentos de Colombia.

k	LnP(D)	Var [LnP(D)]	L 'k	L' ' k	[L' 'k]	DeltaK
1	-7678	77,6	0	0	0	0
2	-7225	237,4	159,8	-17,6	-17,6	1,1422793
3	-6884	379,6	142,2	-60,6	-60,6	3,1103519
4	-6665	461,2	81,6	-58,5	-58,5	2,7240258
5	-6459	484,3	23,1	-82,8	-82,8	3,7624705
6	-6388	590,2	105,9	1781,7	1781,7	73,338999
7	-7254	2477,8	1887,6	-3572,8	3572,8	71,775393
8	-6289	792,6	-1685,2	3242,3	3242,3	**115,1665**
9	-6963	2349,7	1557,1	-1942,9	1942,9	40,081525
10	-6757	1963,9	-385,8	225,6	225,6	5,0907223
11	-6537	1803,7	-160,2	347,4	347,4	8,1798937
12	-6550	1990,9	187,2	1562,9	1562,9	35,027284
13	-7361	3741	1750,1	-3728,4	3728,4	60,95771
14	-6318	1762,7	-1978,3	4581	4581	109,11164
15	-7566	4365,4	2602,7	-558,2	558,2	8,448465
16	-8579	6409,9	2044,5	-3474,8	3474,8	43,401445
17	-7863	4979,6	-1430,3	9,9	9,9	0,1402936
18	-7038	3559,2	-1420,4	5423,8	5423,8	90,91331
19	-9156	7562,6	4003,4	-2867,1	2867,1	32,969114
20	-9565	8698,9	1136,3	-1136,3	1136,3	12,183185

Tabla 1- 16. Probabilidad de inclusión de los individuos de aguacate incorporados en diferentes K cluster, determinados por el test de Evanno.

Población	1	2	3	4	5	6	7	8	Individuos
Antioquia	0,046	**0,243**	**0,186**	0,04	**0,145**	0,06	**0,13**	**0,15**	96
Bolivar	**0,442**	0,029	0,026	0,074	0,039	0,016	**0,368**	0,006	9
Cauca	0,011	0,012	0,109	**0,26**	0,007	**0,329**	0,023	**0,248**	8
Cesar	**0,408**	0,012	0,01	0,058	0,004	0,022	0,007	**0,479**	2
Huila	**0,209**	0,029	0,064	0,06	0,009	**0,556**	0,019	0,054	4
Magdalena	**0,491**	0,015	0,012	0,058	0,013	0,039	**0,298**	0,074	12
Nariño	**0,179**	0,056	0,028	**0,311**	0,008	**0,144**	0,018	**0,257**	10
Quindio	0,019	0,03	**0,116**	**0,116**	0,008	**0,251**	0,01	**0,45**	9
Risaralda	0,007	0,008	0,049	**0,185**	0,007	**0,488**	0,008	**0,248**	6
Santander	**0,611**	0,024	0,09	**0,126**	0,006	0,063	0,015	0,067	15
Tolima	0,084	0,028	**0,189**	**0,153**	0,01	**0,302**	0,012	**0,221**	7
Valle del Cauca	**0,129**	0,024	0,022	0,073	0,022	**0,31**	0,056	**0,364**	18

Debido a que STRUCTURE identifica las K subpoblaciones de una población general asignando un individuo a cada subpoblación dependiendo de su genotipo, se encontró que la subpoblación 1 estuvo mayoritariamente representada con *P* >0,4 por individuos de los departamentos de Bolívar, Cesar, Huila, Magdalena, Nariño, Santander, Valle del Cauca; la subpoblación 2 representada con *P* >0,2 por individuos únicamente del departamento de Antioquia; la subpoblación 3 representada con *P* >0,1 por individuos de los departamentos de Antioquia, Quindío y Tolima; La subpoblación 4 con un valor máximo de *P* >0,3 por individuos de los departamentos de Cauca, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander y Tolima; la subpoblación 5 representada con *P* >0,1 por individuos únicamente del departamento de Antioquia; la Subpoblación 6 con un valor máximo de *P* > 0,5 por individuos de los departamentos de Cauca, Huila, Nariño, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca; La subpoblación 7 con un valor máximo de *P* >0,3 por individuos de los departamentos de Antioquia, Bolívar, Magdalena y la Subpoblación 8 con un valor máximo de *P* >0,4 por individuos de los departamentos de Antioquia, Cauca, Cesar, Nariño, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca, siendo este el que albergo cultivares de aguacate criollos de más departamentos (tabla 1-22).

Tabla 1- 17. Distribución de aguacates criollos de aguacate de los 12 departamentos de Colombia en las diferentes k poblaciones.

Población	Subpoblación k
Antioquia	2 - 3 - 5 - 7 - 8
Bolivar	1 - 7
Cauca	4 - 6 - 8
Cesar	1 - 8
Huila	1- 6
Magdalena	1 - 7
Nariño	1 - 4 - 6 - 8
Quindio	3 - 4 - 6 - 8
Risaralda	4 - 6 - 8
Santander	1 - 4
Tolima	3 - 4 - 6 - 8
Valle del Cauca	1 - 6 - 8

1.6. Discusión.

Cabe resaltar que en este capítulo, a pesar de que se utilizaron los mismos marcadores microsatélites, no se pudo realizar un análisis en conjunto de todos los aguacates criollos colectados en el departamento de Antioquia y aguacates criollos colectados en otros departamentos de Colombia; ya que las colectas se hicieron en diferentes periodos de tiempo; adicionalmente las reacciones de amplificación y análisis de electroforesis capilar fue realizado en laboratorios y equipos diferentes.

Para los 90 aguacates criollos colectados durante los años 2009 y 2011, se obtuvo la amplificación de 147 alelos con 14 marcadores SSR; valor igual al obtenido para los 92 aguacates criollos colectados en Antioquia durante los años 2014 y 2015; a pesar de que estos fueron caracterizados con un número menor de marcadores SSR (12 de los 14 marcadores SSR). De igual forma, el número promedio de alelos por locus fue mayor en los aguacates criollos colectados durante los años 2014 y 2015, con relación a los colectados durante los años 2009 y 2011. Esto puede atribuirse a que el muestreo realizado en los años 2014 y 2015 incluyó cultivares de otras subregiones de Antioquia con condiciones de altitud y clima diferentes a las incluidas en el primer muestreo como por ejemplo cultivares de la subregión del Urabá antioqueño, en donde se colectaron aguacates en un rango de altitud entre 35 a 337 m.s.n.m, el cual es característico de cultivares de la raza Antillana, lo cual permite pensar que estos cultivares podrían estar aportando alelos diferentes. Para los aguacates criollos de diferentes departamentos de Colombia, analizados con 12 de los14 marcadores SSR, tanto el número de alelos amplificados como el número promedio de alelos por locus fue mayor a los obtenidos para los aguacates criollos de Antioquia; aportando 20 alelos diferentes.

Con relación a los paramentos de diversidad genética observados para los aguacates criollos colectados en los años 2009 a 2011, la población que presentó el menor valor en todos los parámetros evaluados fue la población de Santa Barbará; que a la vez fue la que presentó el menor número de individuos por población; esto demuestra el efecto que tiene la deriva en los muestreos que se realizan en poblaciones naturales, reduciendo la variabilidad genética de una población evaluada (Hedrick, 2004; Freeland, 2005). Con respecto al número de alelos diferentes (Na), número efectivo de alelos (Ne) e Índice de Shanoon (I), las poblaciones de Caramanta y Rionegro fueron las que presentaron los mayores valores; a pesar de que no fueron las poblaciones que presentaron el mayor

número de individuos, indicando una mayor diversidad genética en los aguacates criollos colectados en estas poblaciones con relación a las otras estudiadas.

Con relación a la heterocigosidad esperada como estimador de la variabilidad genética de una población (IPGRI and Cornell University, 2003), para los cultivares criollos colectados durante los años 2009 a 2011 estuvo en un rango de 0,384 para la población de Santa Bárbara y 0,724 para la población de Rionegro con un valor promedio de 0,609; indicando una vez más que de las poblaciones analizadas, la población de Santa Bárbara fue la que presento menor variabilidad y la población de Rionegro la que presento mayor variabilidad genética. Con respecto a la heterocigosidad observada, se presentó un promedio de 0,490, valor mas bajo comparado con otros estudios de diversidad genética de aguacate realizados con marcadores microsatélites; como por ejemplo el realizado por Alcaraz y Hormaza (2007) en donde encontraron una heterocigosidad observada promedio de 0,64 en 75 genotipos de aguacate con 16 marcadores microsatélites que incluyen los 14 utilizados en el presente estudio; otro ejemplo similar es el estudio realizado por Asworth y Clegg (2003), quienes obtuvieron una heterocigosidad promedio de 0.635; de igual forma fue más baja que el estudio realizado por Ponce (2013) en 20 materiales de la zona austral del Ecuador y 214 pertenecientes a 32 ecotipos de una colección de trabajo de aguacate de la Granja Experimental Tumbaco perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador con 10 marcadores microsatélites, en donde se obtuvo una heterocigosidad observada de 0,65. Sin embargo la heterocigosidad observada en las poblaciones de cultivares de aguacate del departamento de Antioquia fue mayor a las encontradas por Galindo – Tovar et al. (2011) en cultivares de aguacate de la zona Centro del estado de Veracruz en México, en donde los rangos de heterocigosidad estuvieron entre 0,0625 y 0,4194. Con relación al índice de fijación de Wright (F), el cual permite comparar la heterocigosidad observada y esperada, fue positivo para la mayoría de poblaciones con excepción de las poblaciones de Santa Bárbara y el Retiro, indicando una tendencia a la exogamia en estas poblaciones.

Los paramentos de diversidad genética observados para los aguacates criollos de Antioquia colectados en los años 2014 a 2015, mostraron que la población que presento el menor valor en los parámetros analizados fue la correspondiente a la subregión del Altiplano norte; la cual a la vez también presento el menor número de individuos por población (3), presentándose una reducción de la variabilidad genética por efecto de la

deriva en los muestreos en poblaciones naturales de igual forma como se presentó en la poblaciones de aguacate colectadas en los años 2009 a 2011. Para el caso de las poblaciones correspondientes a departamentos de Colombia, la población del Cesar, la cual estuvo conformada por solo 2 cultivares, no presento el valor más bajo en la mayoría de parámetros evaluados; poblaciones como Caldas y Cauca presentaron valores más bajos con referencia al número de alelos diferentes (Na), número efectivo de alelos (Ne), Índice de Shanoon (I) y heterocigosidad observada, indicando mayor diversidad genética en los aguacates del Cesar con respecto a los de Cauca y Caldas. Para las poblaciones correspondientes a cultivares de varios departamentos de Colombia, la población que mayor diversidad genética presento de acuerdo al número de alelos diferentes (Na) e Índice de Shanoon (I), fue la población de Antioquia; sin embargo se debe tener en cuenta que el número de cultivares analizados en esta población fue muy superior a los analizados en los otros departamentos, lo cual pudo influenciar en los valores obtenidos para estos parámetros. La población de cultivares de aguacate pertenecientes al Valle del Cauca, presentaron también alta diversidad genética de acuerdo a valores altos en cuanto a número de alelos diferentes (Na) e Índice de Shanoon (I).

La heterocigosidad esperada como estimador de la variabilidad genética de una población para los cultivares criollos de Antioquia colectados en los años 2014 y 2015 estuvo en un rango de 0,301 para el Altiplano norte y 0,758 para el Oriente antioqueño con un promedio de 0,6125, valor muy similar al obtenido en las poblaciones de cultivares criollos de Antioquia en donde el valor promedio de heterocigosidad esperada fue de 0,609. Para las poblaciones de cultivares criollos correspondientes a departamentos de Colombia, la heterocigosidad esperada estuvo en un rango de 0,378 para el departamento del Cauca y 0,790 para el departamento del Valle del Cauca con un valor promedio de 0,629, muy similar a los obtenidos en las poblaciones de cultivares criollos del departamento de Antioquia

Con relación a la heterocigosidad observada para las poblaciones de aguacates criollos de Antioquia colectadas en los años 2014 y 2015 estuvieron en un rango de 0,518 para la población del Suroeste a 0,585 para la población de Occidente; con un promedio de 0,543. Desde el punto de vista de la heterocigosidad como una medida de diversidad genética, estas poblaciones de aguacate presentan mayor diversidad comparada con las poblaciones de aguacate colectadas durante los años 2009 a 2011; esto debido posiblemente a la incursión de cultivares de aguacate de otras subregiones de Antioquia

colectados en rangos altitudinales más amplios desde 35 a 2.493 m.s.n.m que abarcan las zonas de adaptación para las tres razas botánicas de *P. americana.* La heterocigosidad observada para las poblaciones de aguacates de diferentes departamentos de Colombia estuvo en un rango de 0,37 para el departamento de Cauca y 0,70 para el departamento de Risaralda, con un promedio de 0,563, superior a la heterocigosidad observada para los aguacates del departamento de Antioquia, lo cual es atribuible a la inclusión de cultivares de aguacate de zonas con mayores distancias geográficas y diversas condiciones ambientales. Sin embargo los valores de heterocigosidad observada para cultivares criollos colombianos fueron menores a los obtenidos por Alcaraz y Hormaza (2007), Asworth y Clegg (2003) y Ponce (2013).

Respecto a los resultados obtenidos con el análisis de varianza molecular (AMOVA), tanto para los aguacates criollos del departamento de Antioquia colectados durante los años 2009 al 2011, los colectados en los años 2014 y 2015 y los colectados en otros departamentos de Colombia; los valores F_{ST} fueron significativos, indicando diferenciación genética entre las poblaciones; sin embargo los porcentajes de variación fueron bajos. Por el contrario los porcentajes de variación al interior de las poblaciones fueron altos, indicando una gran variabilidad de los aguacates criollos al interior de los municipios, subregiones o departamentos de donde fueron colectados; esto debido posiblemente a que el aguacate presenta alta alogamia (polinización cruzada) y la hibridación entre cultivares cercanos ocurre con facilidad y de forma natural (Bergh, 1992 reportado por Sánchez - Pérez, 1999). Este resultado, corroboró lo encontrado por Cañas-Gutiérrez et al. (2015) en donde el análisis de varianza molecular realizado con 49 marcadores AFLP en 111 cultivares de aguacate del departamento de Antioquia mostró mayor diferenciación genética al interior de las poblaciones que entre las poblaciones.

Con relación a los análisis de similitud genética, para el dendograma basado en análisis Neighbour Joining (Saitou y Nei, 1987), usando matriz de similaridad generada por la distancia de Dice (Dice, 1945) para los cultivares de aguacate del departamento de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011, se presenta la formación de seis grupos sin una característica determinada para su agrupación; sin embargo se dio la formación de un grupo conformado por el cultivar 294 de Caramanta y los tres cultivares Hass analizados en este capítulo; este cultivar criollo podría ser candidato para portainjerto de la variedad

Hass, de acuerdo a su similitud genética. Para los análisis de similitud genética en los dendogramas generados con el método Neighbour joining (Saitou y Nei, 1987) y distancias genéticas de Nei pareadas, se observa en general similitud genética entre los cultivares de aguacate explicada por su aproximación geográfica tanto para las poblaciones correspondientes a las subregiones de Antioquia como para las correspondientes a los departamentos de Colombia. Una excepción a esta hipótesis se da con la población correspondiente al Altiplano norte, la cual se observa alejada genéticamente de las demás poblaciones estudiadas; esto puede deberse a que el número de individuos de esta población es menor a las demás poblaciones; otra razón puede ser que las condiciones agroclimáticas de esta subregión son diferentes a las otras estudiadas, ya que los aguacates criollos seleccionados en esta zona se encontraron por encima de los 2.350 m.s.n.m.

Los resultados de STRUCTURE obtenidos para los cultivares de aguacate de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011, realizaron una asignación Bayesiana de K= 3; sin embargo las probabilidades de asignación a un grupo presentaron valores muy por debajo del 70%, impidiendo definir cuales cultivares pertenecen a un grupo determinado. Para el caso de los cultivares de Antioquia colectados en los años 2014 y 2015 y cultivares de departamentos de Colombia, los resultados de STRUCTURE realizaron una asignación Bayesiana de K=8. De igual forma que para los cultivares de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011, las probabilidades de asignación a un grupo presentaron valores muy por debajo del 70%, impidiendo también definir cuales cultivares pertenecen a un grupo determinado; esto debido posiblemente al carácter hibrido de los cultivares analizados, los cuales han sido propagados de forma sexual, producto de la polinización cruzada. El análisis de asignación bayesiana realizado a los aguacates criollos colombianos en el presente estudio, no permitió la asignación de raza botánica de acuerdo a la agrupación dada por STRUCTURE; como si ocurrió en el estudio realizado por Gross - German and Viruel (2013); quienes evaluaron 42 cultivares de aguacate representativos de las tres razas botánicas, mediante el uso de 25 marcadores SSRs y 15 marcadores EST-SSRs. Cabe anotar que Gross - German and Viruel (2013) analizaron aguacates pertenecientes a las tres razas botánicas y no analizaron aguacates procedentes de diferentes pisos térmicos; mientras que en el presente estudio se caracterizaron aguacates criollos ubicados en diferentes altitudes en localidades cercanas a la cordillera de los Andes. Estos árboles criollos representan híbridos entre las tres razas botánicas, ya que son el producto

de hibridaciones entre ellas mejoradas por insectos polinizadores (Sánchez 1999; Barrientos-Priego and López 2007).

1.7. Conclusiones.

- Los marcadores microsatélites utilizados en el presente estudio, fueron muy útiles, ya que se estandarizaron fácilmente y fueron altamente polimórficos permitiendo establecer diferentes grupos genéticos según su origen geográfico y altitud.

- Aunque nuevas técnicas de secuenciación de nueva generación han sido utilizadas en la caracterización de plantas domesticadas, los microsatélites siguen siendo muy útiles, ya que en una secuencia solo se estudian cuatro nucleótidos por posición, mientras que en el caso de los microsatélites se pueden encontrar muchos alelos por locus, por lo cual su polimorfismo es más alto.

- El análisis mediante marcadores moleculares microsatélites, permitió establecer que las poblaciones de aguacates criollos en el departamento de Antioquia y en los departamentos de Bolívar, Cauca, Caldas, Cesar, Huila, Magdalena, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca se encuentran genéticamente diferenciadas, aunque con un porcentaje de diferenciación genética bajo entre el 5 y 8%.

- La mayor diferenciación genética de los aguacates criollos del departamento de Antioquia y los departamentos de Bolívar, Cauca, Caldas, Cesar, Huila, Magdalena, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca se encuentra al interior de las poblaciones; debido posiblemente al tipo de polinización cruzada de la especie.

- De acuerdo a los parámetros de diversidad genética estudiados en este capítulo, los aguacates criollos del Oriente antioqueño y dentro de estos los provenientes del municipio de Rionegro presentaron alta diversidad genética en comparación con las otras poblaciones analizadas; lo cual los hace promisorios como fuente de variabilidad genética en aguacates criollos para el departamento de Antioquia.

- A pesar de que se logró determinar la estructura genética de los aguacates criollos de aguacate para Antioquia (K=3) y para 12 departamentos de Colombia (K=8), no

fue posible la asignación de los cultivares a cada grupo, por la baja probabilidad de asignación que presentaron los cultivares debido a su carácter híbrido. Además no fue posible identificar su raza botánica

- Los marcadores moleculares microsatélites utilizados en este estudio permitieron identificar un cultivar criollo del departamento de Antioquia con similitud genética con el cultivar Hass, lo cual lo hace promisorios para su uso como portinjertos para esa variedad.

- La diferencia encontrada entre las poblaciones de aguacates criollos de diferentes departamentos de Colombia esta influenciada por las montañas de la cordillera de los Andes, lo que sugiere que está ha actuado como una barrera para el flujo de genes ya que los agricultores comparten material vegetal usualmente con sus vecinos.

1.8. Bibliografía.

Alcaraz, M. Hormaza, I. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. Hereditas 144: 244-253.

Ashworth, V.E.T.M. Kobayashi, M.C. De la Cruz, M. Clegg, M.T. (2004). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers Scientia Horticurturae101:255–267.

Bergh, B. (1992). The origin, nature and genetic improvement of the avocado. California Avocado Society Yearbook. 76:61-75.

Barrientos-Priego A, López-López L (2007) Historia y genética del aguacate. In: Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colin. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del aguacate en el estado de México. Coatepec de Harinas, México. 1: 100-121.

Bernal, E.J.A., y C. A. Díaz, compiladores. (2005). Tecnología para el cultivo del aguacate. Manual técnico 5. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia.

Borrone, J.W. Schnell, R.J. Violi, H.A. Ploetz,. R.C. (2007), Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Mill. (avocado) expressed sequence tags. Molecular Ecology Notes 7:439–444

Cañas-Gutiérrez, G.P. Galindo-López, L.F. Arango- Isaza, R.E. Saldamando-Benjumea, C.I. (2015) Diversidad genética de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Antioquia. Colombia. Agronomía Mesoamericana 26:129-143.

Campos-Rojas, E. Terrazas, T. López-Mata, L. (2007). *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. Genetic Resources Crop Evolution. 54: 249-258.

Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 26: 297-302.

Evanno, G. Regnaut, S. Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611–2620.

Freeland, J. (2005) Molecular Ecology. Ed. John Wiley and Sons. West Sussex. England.
Galindo, M. Milagro, P. (2011). Genetic relationships within avocado (Persea Americana Mill.) in seven municipalities of central Veracruz characterized using microsatellites markers. Tropical and subtropical agroecosystems. California. USA.

Gross-German, E. Viruel, M.A. (2013) Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity population structure and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. Tree Genetics Genomes 9:539- 555

Gutiérrez-Díez, A. Martínez de la Cerda, J. García-Zambrano, E.A. Iracheta- Donjuan, L. Ocampo-Morales, J.D. Cerda-Hurtado, I.M. (2009). Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Revista. Fitotecnia. Mexicana. 32: 9-18**.**

Hammer, O.D. Harper, A.T. Ryan, P.D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Paleontology. Electric. 4:1-9

Hedrick, P.W. (2004). Genetics of populations. Jones and Barlett Publishers, SudburyMassachusets, 737 p.

IPGRI and Cornell University (2003). Análisis de diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: módulo de aprendizaje. Disponible en: https://biologiamyblog.files.wordpress.com/2010/03/ii-gen_tica_de_poblaciones1.pdf

Kovach, W.L. (1998). MVSP a multivariate statistical package for Windows. version 3.0. Kovach Computing Services. Pentraeth. Wales. UK.

Kwame Acheampong, A. Akromah, R. Ofori, F.A. Takrama, J.F. Saada, D. Bitton, I. Lavi, U. (2008). Genetic characterization of Ghanaian avocados using microsatellite markers. Journal of American Society for Horticultural Science 133: 801-809

Mijares, P. López, L. (1998). Variedades de aguacate y su producción en México. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C., México.

Peakall, R. Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology. Notes 6:288-295.

Pritchard, J.K. Stephens, M. Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959.

Raymond, M. Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86:248-249

Ríos-Castaño, D. (2003). Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia. En: Actas V Congreso Mundial del Aguacate. 19-24 octubre 2003. Málaga España. Vol II. p. 143-147.

Saitou, N. Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406-425.

Sánchez, P. J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:7-18.

Sharon, D. Cregan, P.B. Mhameed, S. Kusharska, M. Hillel, J. Lahav, E. Lavi, U. (1997). An integrated genetic linkage map of avocado. Theoretical and Applied Genetics. 95: 911 -921.

Schnell, R.J. Brown, J.S. Olano, C.T. Power, E.J. Krol, C.A. (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. Journal of the American Society Horticultural Science. 128: 881-889.

Sneath, P.H. Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. Editorial Freeman, San Francisco, CA, USA.

Storey, W.B. Bergh, B. Zentmyer, G.A. (1986). The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. California Avocado Society Yearbook. 70:127-143.

Capítulo II.

Comparación genética del aguacate criollo colombiano con genotipos de aguacate en condiciones *ex situ* de diversos orígenes del mundo.

2.1. Resumen.

La mejor alternativa para el éxito de un cultivo comercial de aguacate es la injertación de variedades comerciales, sobre portainjertos locales; ya que de esta manera se garantiza una alta adaptabilidad al pertenecer a un mismo ecosistema. Además uno de los aspectos más importantes para formar una unión funcional entre la copa y el portainjerto, es que ambos estén lo suficientemente relacionados taxonómicamente, es decir, genéticamente. Con el fin de determinar si los aguacates criollos del departamento de Antioquia y de algunos departamentos de Colombia tienen potencial para su uso como portainjertos de acuerdo a su similitud genética con variedades comerciales y su identificación racial; se realizó su caracterización molecular con marcadores microsatélites. Aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2009 a 2011 fueron comparados con accesiones de la Colección de Aguacate del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora UMA-CSIC y cultivares de Antioquia colectados en los años 2014 y 2015 y cultivares de otros departamentos de Colombia fueron comparados con variedades comerciales, obsoletas y patrones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate. Mediante análisis de asignación bayesiano a través del programa STRUCTURE, dendograma UPGMA basado en las distancias F_{ST} pareadas y dendograma con algoritmo UPGMA y distancias genéticas de Nei & Li; se corroboro que los aguacates criollos antioqueños fueron genéticamente diferentes a las accesiones pertenecientes a la Colección de Aguacate de La Mayora. La similitud genética de los aguacates criollos de Antioquia colectados en los años 2014 y 2015 y los colectados en otros departamentos de Colombia con los aguacates pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate a través de análisis de asignación bayesiano y de un un dendograma Neighbour Joining e índice de similaridad de Dice, permitió identificar algunos aguacates criollos cercanos genéticamente con cultivares usados como patrones de injertación. La caracterización molecular con marcadores microsatélites de los aguacates criollos colombianos y su comparación con accesiones de la Colección de La Mayora y la Colección Colombiana de Aguacate, no permitieron su identificación racial ni similitud genética con variedades comerciales de interés para la región.

2.2. Introducción.

La propagación por injerto es el método más apropiado para reproducir las variedades seleccionadas de un cultivo comercial, ya que los árboles injertados son uniformes en cuanto a la calidad, forma y tamaño de la fruta (Anacafe, 2004). Por consiguiente la mejor alternativa para el éxito de un cultivo comercial de aguacate es la injertación de variedades comerciales de aceptación en el mercado, que sean seleccionadas del mismo huerto, zona o región, sobre portainjertos locales, ya que de esta manera se garantiza una alta adaptabilidad al pertenecer a un mismo ecosistema.

Comúnmente, la injertación de cultivares comerciales de aguacate se realiza sobre portainjertos francos (originados por semilla), por lo tanto presentan una alta heterocigosis que resulta en huertos heterogéneos en cuanto a comportamiento y productividad; por tal motivo, reviste vital importancia la elección de un buen portainjerto, ya que de él puede depender el éxito o fracaso de una plantación (Barrientos–Priego et al. 2000). El injerto es la unión de dos porciones de tejido vegetal viviente para que se desarrolle como una sola planta. Predecir el resultado de un injerto es muy complicado, de modo general se puede decir que el éxito del injerto va íntimamente ligado a la afinidad botánica de los materiales que se injertan.

Uno de los aspectos más importantes para formar una unión funcional entre la copa y el portainjerto, es que ambos estén lo suficientemente relacionados taxonómicamente, es decir, genéticamente. El grado de relación necesario para la compatibilidad (límites entre la compatibilidad) varía entre los diferentes taxones (especies, géneros, familias) (Cornell University, 1999). Un aspecto importante a tener en cuenta con relación a la compatibilidad que puede existir entre portainjerto y copa en el cultivo del aguacate (*P. americana*), es su diferenciación botánica en tres razas hortícolas: *P. americana* var. drymifolia conocida como raza Mexicana, *P. nubigena* var. guatemalensis conocida como raza Guatemalteca y *P. americana* var. americana conocida como raza Antillana (Storey, Bergh y Zentmyer, 1986); generalmente, dentro de cada raza los cultivares tienen respuestas similares a las condiciones edáficas y climáticas; sin embargo, existen varias diferencias entre las razas en cuanto a sus características morfológicas, fisiológicas y de adaptabilidad a las condiciones ambientales (Bergh, 1995; Bernal et al. 2014).

La selección de un portainjerto adecuado debe estar en función tanto del genotipo de la copa como del entorno o zona agroclimática en la que se cultivara la planta injertada, de ahí la importancia de la selección como portainjertos de árboles de aguacate denominados comúnmente como “criollos”; su importancia se basa no solamente en su desempeño (desarrollo y productividad) en estos ecosistemas, sino también en que constituyen una fuente importante de variabilidad genética, cuya composición se hace necesario conocer. Como lo manifiesta la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y Agricultura de la FAO: los recursos genéticos constituyen la materia prima de que disponen las comunidades locales y los investigadores para aumentar la producción de alimentos y mejorar la calidad de estos.

En este sentido, en este capítulo se pretende determinar si existe similitud genética entre los aguacates criollos colombianos y aguacates de interés comercial como el Hass o clones de aguacate con características deseables para portainjertos, de forma que se puedan seleccionar aguacates criollos con potencial para su uso como portainjertos en el establecimiento de cultivos comerciales de aguacate en el departamento de Antioquia. Para resolver este interrogante se realizara la caracterización mediante marcadores moleculares microsatélites de aguacates criollos en condiciones *in situ* en el departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia y cultivares de aguacate de diversos orígenes a nivel mundial conservados en condiciones *ex situ,* y su posterior comparación.

2.3. Objetivos.

A. Estimar el nivel de similitud genética e identificación racial entre aguacates criollos en condiciones *in situ* de zonas productoras del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia con cultivares de aguacate de diversos orígenes a nivel mundial conservados en condiciones *ex situ* mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

B. Determinar si existe estructuración genética entre los aguacates criollos colombianos y cultivares de aguacate de diversos orígenes del mundo.

2.4. Materiales y Métodos.

2.4.1. Material vegetal y extracción de ADN.

Para el presente capítulo, como aguacates criollos en condiciones *in situ* se utilizaron las muestras de los cultivares que fueron caracterizados en el capítulo I, las cuales incluyeron los 90 aguacates criollos provenientes de 3 subregiones de Antioquia colectados durante los años 2009 a 2011 (Tabla 1-1), los 92 aguacates criollos provenientes de 6 subregiones de Antioquia colectados durante los años 2014 a 2015 (Tabla 1-2) y los aguacates criollos de diferentes departamentos de Colombia pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate (tabla 1-3). Como cultivares de aguacate de diversos orígenes conservados en condiciones *ex situ,* se utilizaron 67 accesiones de *P. americana*, pertenecientes a la colección del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora UMA-CSIC, ubicado en la localidad de Algarrobo-Costa en Málaga, España; la cual comprendía diferentes portainjertos, variedades comerciales y cultivares colectados en España (Alcaraz y Hormaza, 2007) (Tabla 2-1) y 62 accesiones de *P. americana* pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate, la cual incluyo variedades comerciales, variedades obsoletas y patrones (tabla 2-2). El ADN genómico de todos los cultivares a aguacate, fue obtenido a partir de hojas jóvenes con el método de extracción de ADN estandarizado por Cañas-Gutiérrez et al., (2015).

2.4.2. Análisis con marcadores SSR.

Los 90 aguacates criollos provenientes de 3 subregiones de Antioquia colectados durante los años 2009 a 2011 y las 67 accesiones de *P. americana*, pertenecientes a la colección de La Mayora fueron caracterizados con los 14 marcadores microsatélites reportados en el capítulo I (Tabla 1-4). Los 92 aguacates criollos provenientes de 6 subregiones de Antioquia colectados durante los años 2014 a 2015, los aguacates criollos de diferentes departamentos de Colombia pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate, junto con las variedades comerciales, variedades obsoletas y patrones pertenecientes a esta misma colección, fueron caracterizados con los 12 marcadores microsatélites reportados en el capítulo I (Tabla 1-5).

Tabla 2- 1. Listado de las 67 accesiones pertenecientes a la Colección de Germoplasma de Aguacate de la Estación Experimental La Mayora en Málaga España.

Accesión	Pais de Origen	Raza	Accesión	Pais de Origen	Raza
Acueductos	España (Málaga)	Desconocida	Lonjas	Mexico	M[4]
Adi	Israel	GxM[10]	Lula	USA	G x M[3] / G x WI[2,5]
Alhaurin	España (Málaga)	Desconocida	Maoz	Israel	WI[8]
Bacon	USA	GxM[1]/M[2,3]	Marvel (BL 516)	USA	G x M[1]
Bentavol gar	España (Málaga)	Desconocida	Mexicola	USA	M[2,3]
Bentavol mv	España (Málaga)	Desconocida	Monsalve	España (Málaga)	Desconocida
BL 5552	USA	GxM[1]	Negra de la Cruz	Chile	M[5]
Bueno	España (Málaga)	Desconocida	Nobel (BL667)	USA	G x M[1]
Clavero	España (Málaga)	Desconocida	OA184	USA	G x M[1]
Coin	España (Málaga)	Desconocida	Pinkerton	USA	G x M[1,2]
Colin V-33	Mexico	MxG[3]	Regal	USA	Desconocida
Cupanda	Mexico	Desconocida	Rincoatl	Mexico	M[4]
Duke 6	Mexico	M[1]	RR-86	España (Islas canarias)	Desconocida
Duke 7	Mexico	M[1]	San Javier 1	España (Málaga)	Desconocida
Duke Parent	Mexico	M[1]	San Javier 4	España (Málaga)	Desconocida
Eden	Israel	GxM[6]	San Javier 6	España (Málaga)	Desconocida
El Viso	España (Málaga)	Desconocida	San Javier 8	España (Málaga)	Desconocida
Fito Chinea	España (Islas canarias)	Desconocida	San Javier 11	España (Málaga)	Desconocida
Fuerte	Mexico	G x M[1]	San Javier 12	España (Málaga)	Desconocida
Fundación 2	Mexico	Desconocida	San Javier 13	España (Málaga)	Desconocida
Fuchs 20	Israel	Wi x G[7]	San Javier 14	España (Málaga)	Desconocida
G-6	Guatemala	M[1]	San Javier 19	España (Málaga)	Desconocida
G-755 A	Guatemala	G x P.*schiedeana*	San Javier 28	España (Málaga)	Desconocida
Gem (3-29-5)	USA	G x M[1] /G[3]	San Javier 29	España (Málaga)	Desconocida
Gvar 13	Israel	M[9]	S. Chinea	España (Islas canarias)	Desconocida
Harvest	USA	G x M[1] /G[3]	Schmidt	Mexico	G[3]
Hass	USA	G[1,3] /G x M[2]	Scott	USA	M[3]
Hass Motril	España (Málaga)	Desconocida	Shepard	USA	G[3]
Iriet	Israel	G x M[2]	Sir Prize	USA	M[1]
La Consula 6	España (Málaga)	Desconocida	Thomas	USA	M[1]
La Consula 9	España (Málaga)	Desconocida	Topa Topa	USA	M[1,2,3]
La Consula 12	España (Málaga)	Desconocida	Toro Canyon	USA	M[1,5]
Lamb Hass (BL122)	USA	G x M[1,2]	Villena	España (Málaga)	Desconocida
La Piscina	España (Málaga)	Desconocida			

Razas. G: Guatemalteca M: Mexicana WI: Antillana

1: Ashworth and Clegg 2003 2: Schnell et al. 2003 3: http://www.ucavo.ucr.edu

4: Lopez et al. 2001 5: Ben-Ya'acov et al. 2003 6: Lavi et al. 1997

7: Kadman and Ben-Ya'acov 1981 8: Kadman and Ben-Ya'acov 1980a 9: Kadman and Ben-Ya'acov 1980b

10: Lahav et al. 1992

Las condiciones de amplificación y análisis por electroforesis capilar esta descrita para cada grupo de marcadores microsatélites en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Tabla 2- 2. Variedades obsoletas y comerciales pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate.

Nombre de la Accesión	Descripción	Codigo unico interno	Nombre de la Accesión	Descripción	Codigo unico interno
REDD	Variedad comercial	70200207	*BOOTH 8*	Variedad comercial	70200012
BRASILERO	Variedad no comercial	70200192	*NATIVO 2011*	Patrón	70200042
LA SELVA	Variedad no comercial	70200033	*RUHELE*	Variedad no comercial	70200050
BOOTH 7	Variedad comercial	70200011	*MONROE*	Variedad comercial	70200040
POLLOCK	Variedad comercial	70200047	*TRAPP*	Variedad comercial	70200055
CHOQUETTE	Variedad comercial	70200013	*ZUTANO*	Variedad no comercial	70200061
KANOLA	Variedad no comercial	70200032	*ECUATORIANO*	Variedad no comercial	70200017
COLLIN RED	Variedad comercial	70200014	*HASS*	Variedad comercial	70200025
ESTHER	Variedad no comercial	70200018	*NABELICO*	Variedad no comercial	70200041
HULUMANA	Variedad no comercial	70200027	*TUMACO*	Patrón	70200058
BACON	Variedad no comercial	70200008	*LOS SILOS*	Variedad no comercial	70200036
BOOTH 1	Variedad no comercial	70200009	*LINDA*	Variedad no comercial	70200034
SANTANA	Variedad comercial	70200051	*HAYES*	Variedad no comercial	70200026
OCULTA 1	Variedad no comercial	70200043	*MARCUS*	Variedad comercial	70200038
ORIENTE	Variedad no comercial	70200045	*PAPELILLO*	Variedad comercial	70200046
ITZAMA	Variedad no comercial	70200030	*FAIRCHILD*	Variedad comercial	70200019
PUEBLA	Variedad no comercial	70200049	*TRINIDAD*	Variedad comercial	70200057
LORENA	Variedad comercial	70200035	*MAYAPAN*	Variedad no comercial	70200039
TRAPICA	Variedad comercial	70200056	*COSTA RICA*	Variedad no comercial	70200015
GOTTFRIED	Variedad no comercial	70200022	*IBAGUE*	Variedad no comercial	70200029
WINDSLOWSON	Variedad no comercial	70200060	*G-755*	Patrón	70200021
SIMONDS	Variedad no comercial	70200054	*HOJA HASS*	Variedad comercial	La Selva
LULA	Patrón	70200037	*FUERTE*	Variedad comercial	70200020
GWENT	Patrón	70200024	*SEMILL 44*	Variedad comercial	70200053
TOPA-TOPA	Patrón	70200169	*BOOTH 5*	Variedad	70200010
SANTA CRUZ	Variedad comercial	70200152	*OCULTA 2*	Variedad no comercial	70200044
SANTA MARIA	Variedad no comercial	70200212	*JIM*	Variedad no comercial	70200031
SANBONY	Variedad comercial	70200211	*DUKE 7*	Patrón	70200016
AGUSTA	Variedad no comercial	70200191	*SARDI*	Variedad no comercial	70200052
POLO	Variedad no comercial	70200206	*WALDIN*	Variedad comercial	70200059
EDRANOL	Patrón	70200200	*GRIPIÑA*	Variedad no comercial	70200023

2.4.3. Análisis de datos para aguacates criollos de Antioquia y accesiones de la Colección de La Mayora.

Los aguacates criollos provenientes de 3 subregiones de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011 fueron analizados en conjunto con las accesiones de *P. americana*, pertenecientes a la colección del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora UMA-CSIC. De acuerdo al sitio de origen de cada uno de los cultivares a analizados, se conformaron 18 poblaciones para su estudio así: Sonsón, Abejorral, El Retiro, La Ceja, San Vicente, Marinilla, Rionegro, Santa Bárbara, Valparaíso, Caramanta, Montebello, Guatemala, Islas Canarias, Israel, Málaga, México, USA.

Mediante el programa GENALEX 6.501 (Peakal and Smouse 2006), se calcularon tanto para las poblaciones de Antioquia y para las accesiones pertenecientes a la colección de La Mayora, los siguientes parámetros: tamaño de los alelos, el número promedio de alelos por locus SSR (N), para cada población de aguacate muestreada, número de alelos diferentes (Na), número efectivo de alelos (Ne = 1 / (Sum pi^2)), el índice de Shannon (I = -1* Sum (pi * Ln (pi)), H_o = Heterocigocidad observada = No. Heterocigotos / N, H_e = Heterocigocidad esperada = 1 - Sum pi^2, e índice de Fijación ($F = H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e)$).

El programa Genepop 4.2 (Raymond and Rousset, 1995) fue usado para conocer si las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy–Weinberg y desequilibrio de ligamiento. GENALEX 6.501 también fue usado para calcular las distancias F_{ST} pareadas entre las localidades de Antioquia y las accesiones de la colección de La Mayora. Estas distancias fueron usadas para obtener un dendograma con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Sneath and Sokal 1973). El dendograma fue realizado con el programa Mega 4.0 (Kummar et al. 2008). También se generó un dendograma Neighbour joining a nivel de individuos, usando el índice de similaridad de Dice con el programa PAST Versión 3.22 (Hammer et al., 2001).

Adicionalmente, se realizó un análisis basado en el modelo de agrupamiento STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2000); este fue usado para evaluar la pertenencia más probable de cada individuo a cada grupo para las poblaciones de aguacate de Antioquia

junto con la Colección de Germoplasma de Aguacate de La Mayora. El programa se ejecutó para 1.000.000 pasos de la cadena de Markov Monte Carlo (CMMC) después de un periodo de 100.000 iteraciones para K= 1 a K=15 bajo un modelo de admixtura. Cada valor K fue calculado a partir de diez corridas independientes. La ad hoc de la probabilidad estimada de K (delta K) (Evanno et al. 2005) fue empleada para estimar el número más probable de poblaciones (K) basados en la tasa de cambio de la probabilidad logarítmica de los datos [Ln Pr (X/K)].

Finalmente, se realizó un análisis demográfico de genética de poblaciones con el programa BOTTLENECK 1.2 (Piry et al., 1999) para determinar si las muestras de Antioquia han pasado por efecto de cuello de botella. Este programa calcula para cada muestra de la población y para cada locus la distribución de la heterocigosidad esperada a partir del número de alelos observados (k), dado el tamaño de la muestra (n) asumiendo equilibrio entre mutación y deriva. La distribución es obtenida a través de la simulación de un proceso de coalescencia de n genes bajo tres posibles modelos de mutaciones, el MAI (modelo de alelos infinitos), El MMP (modelo de mutación en un paso) y el (modelo en dos fases). Por lo tanto el valor de la heterocigosidad calculado a través del número de alelos por un procedimiento de coalescencia (H_{eq}) es más bajo que la heterocigosidad esperada estimada directamente a partir de la frecuencia de los alelos (H_e). Para marcadores neutrales, en una población en equilibrio de la deriva de la mutación genética, hay una probabilidad igual que un locus dado tenga un leve exceso o déficit de heterocigosidad en lo que se refiere a la heterocigosidad calculada am partir del número de alelos. En contraste en una población en cuello de botella una gran fracción de los loci analizados puede presentar un exceso significante de heterocigosidad esperada. Para medir esta probabilidad se usaron tres procedimientos: a) prueba de signo b) prueba de diferencias estandarizada y c) Wilcoxon´s signed rank test.

2.4.4. Análisis de similitud genética entre aguacates criollos de Antioquia y otros departamentos de Colombia y accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate.

Con el fin de conocer la similitud genética existente entre los aguacates criollos de las diferentes subregiones del departamento de Antioquia y los provenientes de otros departamentos del país, con variedades comerciales y obsoletas de raza conocida y patrones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate bajo la custodia de Agrosavia, se realizó un análisis basado en el modelo de agrupamiento STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000); en donde se evaluó la pertenencia más probable de cada individuo a un grupo para las poblaciones de aguacates criollos colombianos y las accesiones pertenecientes a la Colección colombiana de aguacate las cuales fueron agrupadas como poblaciones de acuerdo a su raza botánica para su análisis. El programa fue corrido con una Cadena de Markov Monte Carlo (CMMC) de 150.000 pasos, después de un periodo de burn-in de 15.000 iteraciones desde K=1 hasta K=20. Cada valor K fue calculado a partir de 10 corridas independientes considerando además un modelo de admixtura y un modelo independiente de frecuencias alélicas. La probabilidad estimada ad hoc de K (delta K) (Evanno et al. (2005) fue empleada para estimar el número más probable de poblaciones (K) basado en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos [Ln Pr (X/K)]. El valor K fue estimado con STRUCTURE HARVESTER web v.0.6.92 (Earl and vonHoldt, 2012).

Adicionalmente un dendograma Neighbour Joining fue calculado por individuo para los aguacates criollos provenientes de los diferentes departamentos de Colombia y las variedades comerciales y obsoletas de raza conocida y patrones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate usando el índice de similaridad de Dice con el programa PAST Versión 3.22 (Hammer et al., 2001).

2.5. Resultados.

2.5.1. Polimorfismo y diversidad genética.

Los parámetros de diversidad genética para las 18 poblaciones estudiadas en el presente capitulo que incluyen cultivares de municipios de Antioquia y de diversos países del mundo como España, México, USA, Israel, Guatemala y Chile para cada locus microsatélite, se pueden observar en la tabla 2-3. Con los 14 marcadores SSR analizados se logró la amplificación de 254 alelos, con un promedio de alelos por locus de 18,14. El número de alelos por locus estuvo en un rango desde 9 (*AVT386*) hasta 25 (*AVD001*, *AVMIX03*, *AVMIX04*). El número total de alelos amplificados por población fue mayor para la población de Málaga España con 350 alelos seguido por los cultivares procedentes de USA con 266 alelos. De las poblaciones correspondientes a municipios del departamento de Antioquia, Sonsón fue la que presento el mayor número de alelos amplificados con 248. El menor número de alelos amplificados por población fue de 28 y correspondió a las poblaciones de Santa Bárbara en el departamento de Antioquia, Guatemala y Chile, las cuales a la vez fueron las que presentaron el menor número de individuos por población (2, 2, 1 respectivamente). Con respecto al número de alelos diferentes por locus (Na), Málaga fue la población que presento el mayor valor (7,214) y la de menor valor fue Santa Bárbara con 2,0. El número de alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación determinada por el número de alelos efectivos por locus (Ne) fue mayor para la población de Rionegro con un valor de 4,0 y menor en la población de Santa Bárbara. El índice de Shannon – Weaber, el cual es un indicativo de la diversidad existente en las poblaciones, estuvo en un rango entre 0,582 para Santa Bárbara a 1,485 para las poblaciones de Rionegro y Caramanta. La heterocigosidad observada estuvo en un rango entre 0,393 (Santa Bárbara) y 0,686 (México) y la heterocigosidad esperada en un rango entre 0,384 (Santa Bárbara) y 0,724 (Rionegro). El índice de fijación de Wright's (*F*), el cual permite comparar la heterocigosidad observada y esperada, fue positivo para la mayoría de poblaciones con excepción de las poblaciones de Guatemala y Santa Bárbara, donde el parámetro *F* fue negativo.

Tabla 2- 3. Parámetros de diversidad genética para poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia y cultivares de España, USA, México, Israel y Guatemala.

Población	Ni	Nt		N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Sonsón	**18**	**248**	**Media**	17,714	5,786	3,336	1,344	0,486	0,663	0,258
			DE	0,163	0,576	0,341	0,099	0,043	0,031	0,061
Abejorral	**9**	**125**	**Media**	8,929	4,143	2,820	1,120	0,528	0,603	0,120
			DE	0,071	0,533	0,279	0,107	0,051	0,035	0,083
El Retiro	**5**	**67**	**Media**	4,786	3,143	2,686	0,984	0,560	0,570	-0,011
			DE	0,155	0,275	0,257	0,105	0,092	0,052	0,146
La Ceja	**6**	**84**	**Media**	6,000	4,786	3,717	1,373	0,536	0,702	0,221
			DE	0,000	0,422	0,345	0,087	0,053	0,025	0,081
San Vicente	**6**	**82**	**Media**	5,857	3,857	2,775	1,066	0,398	0,574	0,316
			DE	0,097	0,443	0,294	0,122	0,073	0,054	0,095
Marinilla	**6**	**83**	**Media**	5,929	3,643	2,626	1,010	0,426	0,548	0,213
			DE	0,071	0,341	0,307	0,109	0,081	0,051	0,118
Rionegro	**9**	**123**	**Media**	8,786	5,643	4,008	1,485	0,539	0,724	0,233
			DE	0,155	0,401	0,340	0,084	0,051	0,026	0,084
Santa Barbara	**2**	**28**	**Media**	2,000	2,000	1,814	0,582	0,393	0,384	-0,030
			DE	0,000	0,182	0,157	0,097	0,107	0,061	0,193
Valparaiso	**3**	**42**	**Media**	3,000	3,214	2,655	1,021	0,571	0,587	0,028
			DE	0,000	0,214	0,223	0,077	0,089	0,035	0,137
Caramanta	**14**	**191**	**Media**	13,643	6,429	3,739	1,485	0,435	0,703	0,365
			DE	0,133	0,510	0,345	0,086	0,052	0,028	0,078
Montebello	**12**	**162**	**Media**	11,571	5,429	3,117	1,305	0,521	0,648	0,212
			DE	0,137	0,402	0,241	0,088	0,055	0,033	0,073
Guatemala	**2**	**28**	**Media**	2,000	2,786	2,538	0,922	0,607	0,554	-0,118
			DE	0,000	0,214	0,220	0,097	0,077	0,052	0,106
Islas Canarias	**2**	**42**	**Media**	3,000	3,571	3,107	1,090	0,548	0,591	0,088
			DE	0,000	0,388	0,401	0,131	0,083	0,055	0,110
Israel	**6**	**84**	**Media**	6,000	4,786	3,673	1,352	0,655	0,686	0,039
			DE	0,000	0,381	0,322	0,102	0,066	0,044	0,076
Málaga	**26**	**350**	**Media**	25,000	7,214	3,665	1,466	0,577	0,699	0,175
			DE	0,000	0,735	0,317	0,096	0,042	0,026	0,052
Mexico	**10**	**140**	**Media**	10,000	5,500	3,652	1,423	0,686	0,700	0,027
			DE	0,000	0,389	0,309	0,076	0,046	0,025	0,049
USA	**19**	**266**	**Media**	19,000	6,857	3,963	1,527	0,643	0,721	0,120
			DE	0,000	0,592	0,329	0,093	0,044	0,028	0,052

Ni= Número de individuos por población
Nt= Número total de alelos
N= Número promedio de alelos
DE= Desviación estandar
Na= Número de alelos diferentes
Ne= Número de alelos efectivos
I= Indice de Shannon
Ho= Heterocigosidad observada
He= Heterocigosidad esperada
F= Indice de fijación

Todos los microsatélites probados por población resultaron estar en equilibrio de Hardy – Weinberg; luego de realizar la corrección de Bonferroni (Tabla 2-4). Con relación al análisis de desequilibrio de ligamiento una vez realizada la corrección de Bonferroni,

mostró que la mayoría de microsatélites estaban en equilibrio de ligamiento (datos no presentados).

Tabla 2- 4. Test para evaluar el EHW en las poblaciones de poblaciones de aguacates criollos de aguacate de municipios de Antioquia y cultivares de España, USA, México, Israel, Guatemala y Chile.

				Test de Bonferroni		
Población	**P-Val**	**D.E.**	**Switches (ave.)**	**α=0.05/n**	**α**	**Signif**
Sonsón	1.000	0.0000	14299.71	0.05/17	0,0029	ns
Abejorral	0.9995	0.0002	22094.43	0.05/16	0,0031	ns
El Retiro	0.9839	0.0012	17810.15	0.05/15	0,0033	ns
La Ceja	1.000	0.0000	12670.14	0.05/14	0,0035	ns
San Vicente	1.000	0.0000	14988.69	0.05/13	0,0038	ns
Marinilla	0.9998	0.0001	13880.15	0.05/12	0,0041	ns
Rionegro	1.000	0.0000	9659.57	0.05/11	0,0045	ns
Santa Barbara	0.9854	0.0004	23649.25	0.05/10	0,005	ns
Valparaiso	0.9898	0.0007	10294.38	0.05/9	0,0055	ns
Caramanta	1.000	0.0000	9671.36	0.05/8	0,0062	ns
Montebello	1.000	0.0000	11768.43	0.05/7	0,0071	ns
Guatemala	0.9936	0.0004	9437.91	0.05/6	0,0083	ns
Islas Canarias	0.9998	0.0001	8203.83	0.05/5	0,01	ns
Israel	0.9940	0.0010	9430.29	0.05/4	0,0125	ns
Málaga	1.000	0.0000	8402.29	0.05/3	0,016	ns
Mexico	0.9510	0.0053	11402.14	0.05/2	0,025	ns
USA	1.000	0.0000	9547.07	0.05/1	0,05	ns

P-Val= Valor probabilidad D.E.= Desviación estandar

El dendograma UPGMA basado en las distancias Fst pareadas entre las poblaciones de cultivares de Antioquia y las pertenecientes a la colección de germoplasma de La Mayora produjo dos grupos principales (Figura. 2-1A). El primer grupo estuvo conformado por todos los aguacates de Antioquia y el segundo grupo por las accesiones de la colección de La Mayora. De igual forma cuando se realizó el dendograma Neighbour Joining e índice de Dice, se observa la separación entre los aguacates criollos del departamento de Antioquia y los pertenecientes a la Colección de La Mayora (Figura 2-2). El cuadro verde encierra los cultivares pertenecientes a la colección de la Mayora y el cuadro rojo los aguacates criollos del departamento de Antioquia.

Figura 2-1. Dendograma UPGMA producido con distancias genéticas de Fst pareados de poblaciones de aguacates de Antioquia y accesiones de la Colección de Germoplasma de IHSM La Mayora en España. Número de K subpoblaciones obtenidas con STRUCTURE después del test de Evanno en cultivares de Antioquia y del IHSM La Mayora.

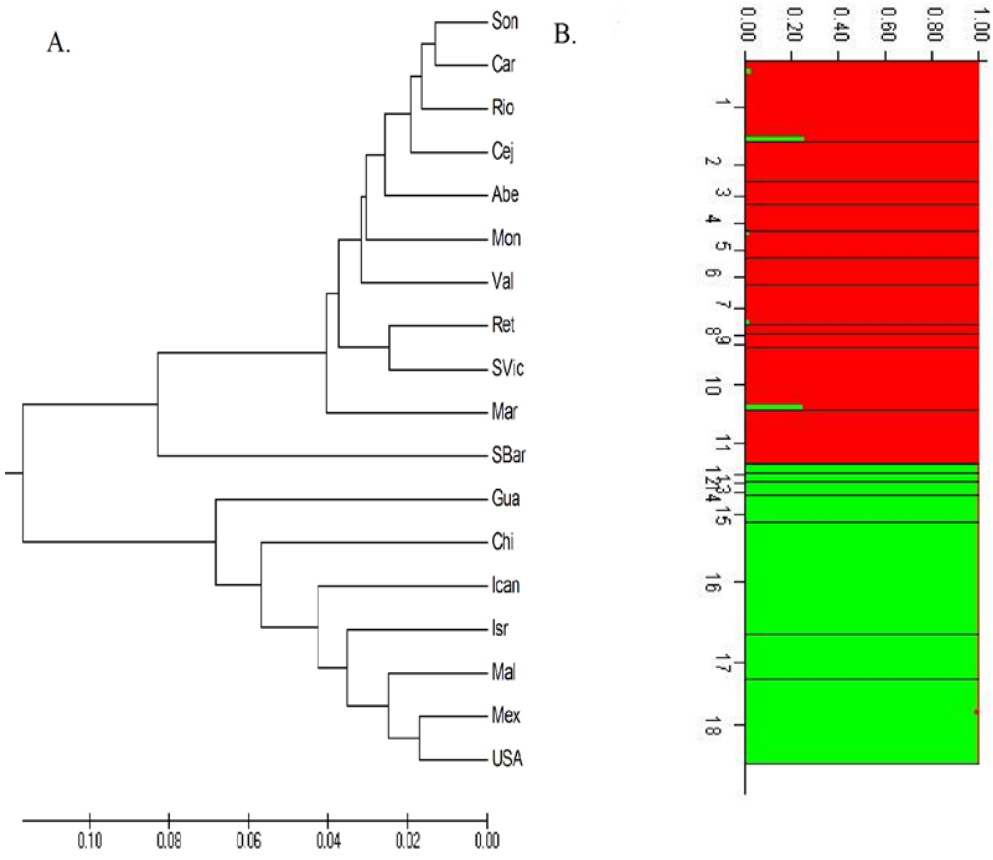
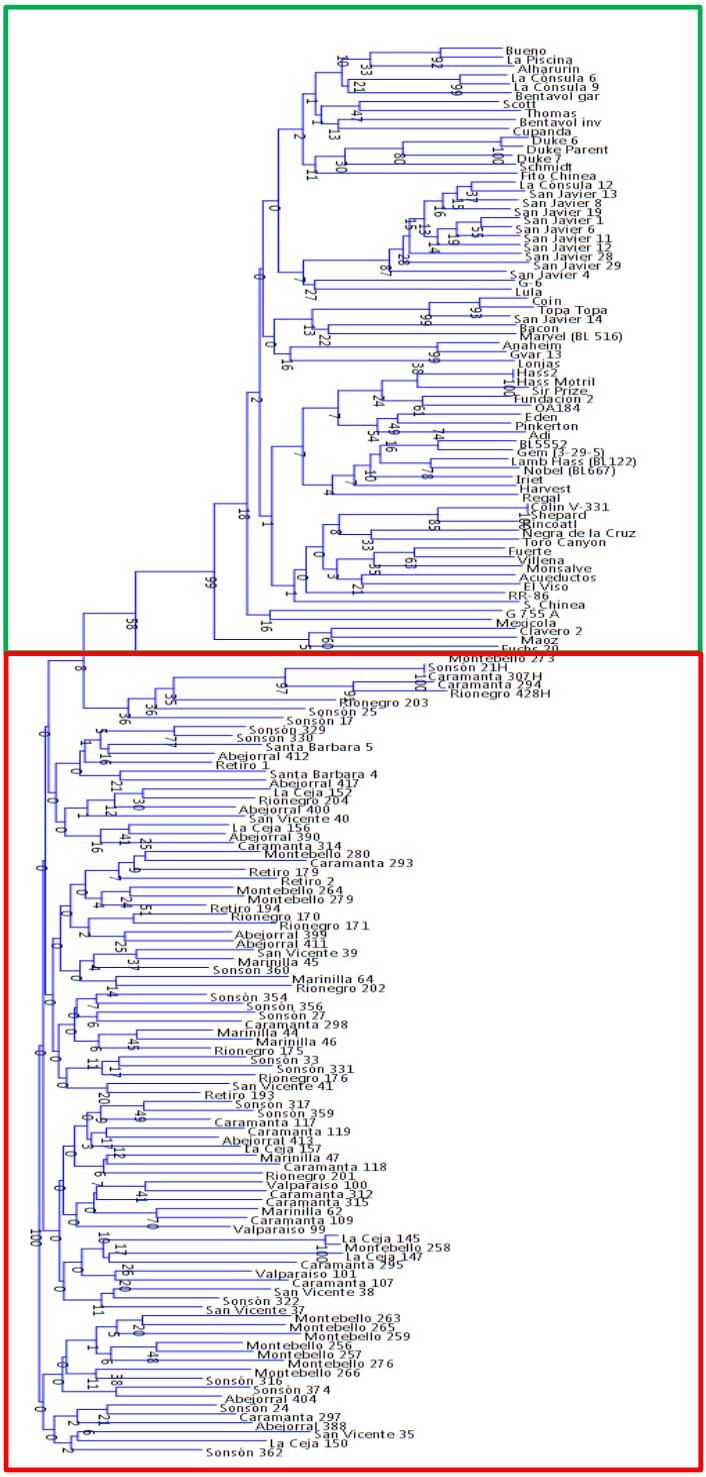


Figura 2- 2. Dendograma Neighbour Joining e índice de Dice por individuos



2.5.2. Asignación poblacional

El análisis de estructura poblacional Bayesiano para los cultivares de Antioquia y las accesiones pertenecientes a la Colección de La Mayora, produjo un K = 2 poblaciones estimado a partir de 18 orígenes de colecta de los cultivares analizados (Figura 2-1B). El valor de máxima verosimilitud se encontró en Ln (P|D) = - 7705.3 produciendo el mejor valor de probabilidad ΔK = 496.15 (Tabla 2-5B). Los cultivares de Antioquia (Sonsón, Abejorral, El Retiro, La Ceja, San Vicente, Marinilla, Río Negro, Santa Bárbara, Valparaíso, Caramanta, Montebello) se encontraron en el grupo 1, mientras las accesiones de la colección de La Mayora en el grupo 2 (Tabla 2-5 A). Estos resultados apoyan aún más lo obtenido con el árbol UPGMA demostrando que el aguacate "criollo" de Antioquia es genéticamente diferente al aguacate de La colección La Mayora. Esto puede explicarse posiblemente a los múltiples cruzamientos por polinización cruzada entre los arboles de aguacate de esta región, particularmente entre los cultivos vecinos.

2.5.3. Análisis cuello de botella.

Finalmente, en las simulaciones de cuello de botella, "the sign test", "the standardized difference test", y "the Wilcoxon´s signed rank test" no se produjeron valores *P* significativos con la excepción de los cultivares de El Retiro y Rio Negro (Tabla 2-6). Estas pruebas se realizaron, dada la diferenciación genética entre los aguacates de Antioquia y las accesiones de la colección de germoplasma de La Mayora, como se muestra en el árbol UPGMA y los resultados de STRUCTURE. La simulación de cuello de botella sugiere que las poblaciones de aguacate de Antioquia no han sufrido efectos de cuello de botella recientes.

Tabla 2- 5. Subpoblaciones K inferidas a través de STRUCTURE y test de Evanno para cultivares del departamento de Antioquia y accesiones de la Colección de Germoplasma de La Mayora, España.

A. Poblaciones inferidas obtenidas para cultivares de Antioquia y accesiones colección de germoplasma

Pop	Infered clusters		Individuals
	1	2	
Sonsón	0.016	0.984	18
Abejorral	0.001	0.999	9
El Retiro	0.001	0.999	5
La Ceja	0.001	0.999	6
San Vicente	0.006	0.994	6
Marinilla	0.001	0.999	6
Río Negro	0.003	0.997	9
Santa Bárbara	0.001	0.999	2
Valparaíso	0.001	0.999	3
Caramanta	0.019	0.981	14
Montebello	0.001	0.999	12
Chile	0.999	0.001	2
Guatemala	0.999	0.001	2
Islas Canarias	0.999	0.001	3
Israel	0.999	0.001	6
Málaga	0.999	0.001	25
México	0.999	0.001	10
USA	0.998	0.002	19

B. Test de Evanno para cultivares de Antioquia y accesiones colección de germoplasma.

k	Ln P(D)	Var [LnP(D)]	L´k	L´´k	[L´´kk]	DeltaK
1	-1030.80	119.30				
2	-7705.30	200.50	-6674.50	7025.40	7025.40	*496.15*
3	-7354.40	263.30	350.90	200.50	200.50	12.36
4	-6803.00	413.30	551.40	-626.40	626.40	30.81
5	-6878.00	423.70	-75.00	-532.80	532.80	25.88
6	-7485.80	1892.80	-607.80	1285.90	1285.90	29.56
7	-6807.70	517.20	678.10	-914.80	914.80	40.23
8	-7044.40	1212.00	-236.70	-364.60	364.60	10.47
9	-7645.70	2660.90	-601.30	-6479.70	6479.70	125.61
10	-14726.70	16787.50	-7081.00	13966.60	13966.60	107.79
11	-7841.10	3094.20	6885.60	-5810.00	5810.00	104.45
12	-6765.50	811.60	1075.60	-935.30	935.30	32.83
13	-6625.20	767.50	140.30	-991.80	991.80	35.80
14	-7476.70	2606.60	-851.50	851.50	851.50	16.68
15	-9915.90	7280.20	-2439.20	2439.20	2439.20	28.59

Tabla 2- 6. Análisis de cuello de botella realizado en cultivares del departamento de Antioquia. Sing = Sing test. SD = standard deviation test. W = Wilcoxon test. 1t = one tail. 2t = two tail. Prob= probability. IAM = Infinite allele model. SMM = Step mutation model. TPM = Two phase model.

Population	mean_N	mean_k	mean_He	p_sign_IAM	p_sign_TPM	p_sign_SMM	p_stdv_IAM	p_stdv_TPM	p_stdv_SMM
Sonson	35.43	5.86	0.68260	0.241438	0.322592	0.056137	0.057498	0.468066	0.002882
Abejorral	17.86	4.21	0.64063	0.069884	0.187419	0.342955	0.022011	0.180721	0.338319
El Retiro	9.57	3.14	0.63793	**0.008687**	0.010343	0.003454	0.000759	0.004356	**0.018500**
La Ceja	12.00	4.79	0.76623	0.235540	0.494524	0.526461	0.019843	0.113698	0.356827
San Vicente	11.71	3.86	0.62843	0.495886	0.534150	0.349768	0.212219	0.476529	0.149768
Marinilla	11.86	3.64	0.59935	0.375962	0.412004	0.245416	0.304880	0.387793	0.113970
Rionegro	17.57	5.79	0.77152	0.114304	0.564920	0.297486	0.018509	0.159779	0.364479
Valparaiso	6.00	3.14	0.70000	0.357111	0.502145	0.573756	0.241517	0.368649	0.483642
Caramanta	27.29	6.43	0.73013	0.553111	0.313053	0.017518	0.236581	0.134514	0.000069
Montebello	23.14	5.43	0.67725	0.434058	0.168818	0.004484	0.313795	0.117391	0.000186

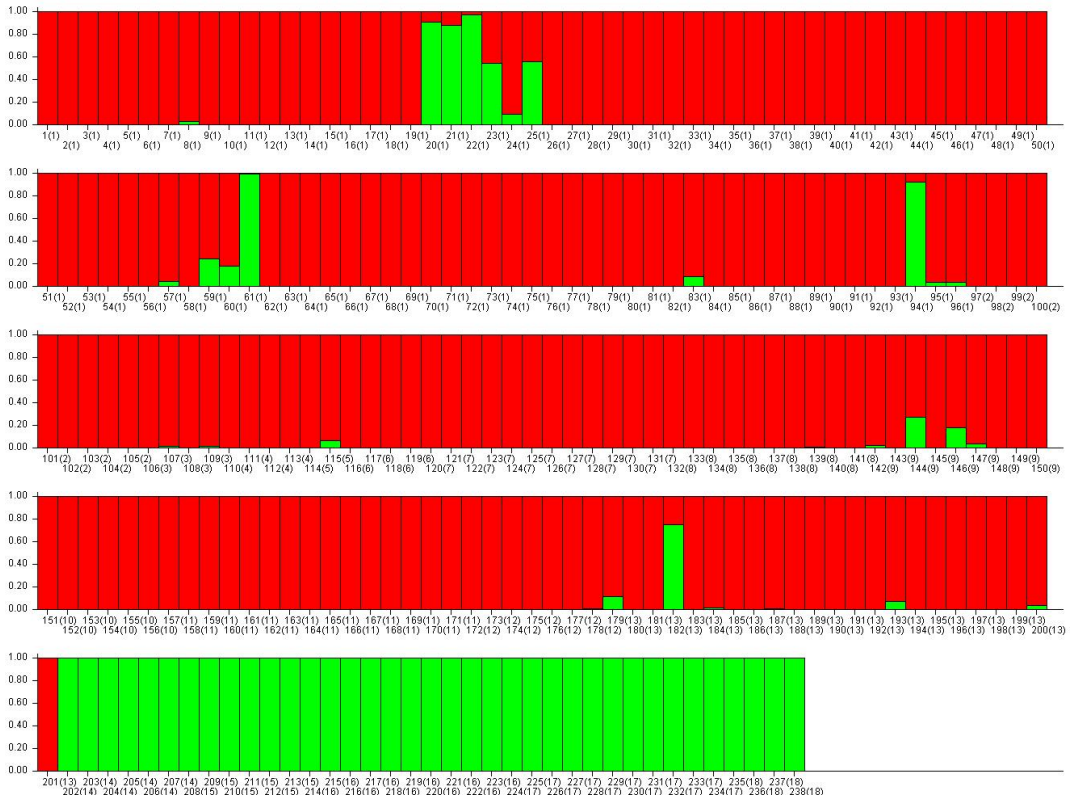
Population	mean_N	mean_k	mean_He	p_W_1t_IAM	p_W_2t_IAM	p_W_1t_TPM	p_W_2t_TPM	p_W_1t_SMM	p_W_2t_SMM
Sonson	35.43	5.86	0.68260	0.014771	0.029541	0.548401	0.951538	0.966187	0.078491
Abejorral	17.86	4.21	0.64063	0.002136	0.004272	0.076538	0.153076	0.451599	0.903198
El Retiro	9.57	3.14	0.63793	**0.010742**	**0.021484**	**0.010742**	**0.021484**	**0.010742**	**0.021484**
La Ceja	12.00	4.79	0.76623	0.028992	0.057983	0.108276	0.216553	0.312866	0.625732
San Vicente	11.71	3.86	0.62843	0.121948	0.243896	0.270874	0.541748	0.751343	0.541748
Marinilla	11.86	3.64	0.59935	0.250793	0.501587	0.665100	0.714844	0.786865	0.463135
Rionegro	17.57	5.79	0.77152	**0.002136**	**0.004272**	0.120605	0.241211	0.642578	0.760864
Valparaiso	6.00	3.14	0.70000	0.500000	1.000.000	0.572388	0.903198	0.619568	0.807739
Caramanta	27.29	6.43	0.73013	0.162903	0.325806	0.665100	0.714844	0.960754	0.090576
Montebello	23.14	5.43	0.67725	0.213135	0.426270	0.852112	0.325806	0.991699	0.020264

2.5.4. Análisis de similitud genética entre aguacates criollos de Antioquia y otros departamentos de Colombia y accesiones pertenecientes de la Colección Colombiana de Aguacate.

2.5.4.1. Asignación poblacional

Con el análisis con STRUCTURE para los cultivares criollos de aguacate de Antioquia y otros departamentos de Colombia y las accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate representada por variedades comerciales, obsoletas y patrones de injertación se obtuvo un valor K= 2, los cuales fueron agrupados basados en el valor de máxima verosimilitud de Ln (P|D) = -9634.52, producción de un valor de máxima probabilidad ΔK = 403.12 (Tabla 2-7).

Figura 2 - 3. Número de K subpoblaciones obtenida con STRUCTURE posterior al test de Evanno para aguacates criollos de Colombia y accesiones pertenecientes al al Colección Colombiana de Aguacate.



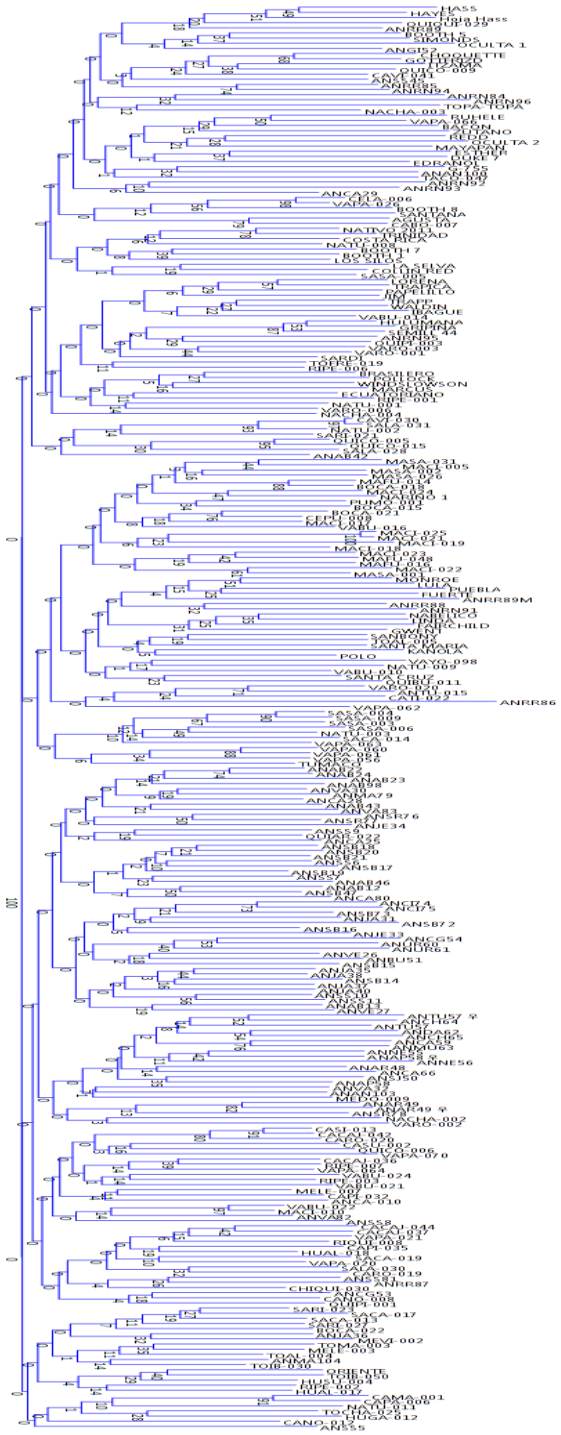
En la figura generada por STRUCTURE (Figura 2-3) se observa que la mayoría de los aguacates criollos colombianos fueron asignados al grupo K=1 de color rojo. Todas las accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate fueron asignadas al grupo K=2 de color verde, al igual que el cultivar criollo ANRR89M de Antioquia. Las accesiones de aguacate de la Colección Colombiana de Aguacate incluyo cultivares de las tres razas botánicas Mexicana, Guatemalteca y Antillana e híbridos Guatemaltecos x Antillanos y Mexicanos x Guatemaltecos.

Tabla 2- 7. Test de Evanno para aguacates criollos de Colombia y accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate.

K	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	lLn''(K)l	Delta K
1	-10.636.060.000	0.099472			
2	**-9.634.525.000**	**1.722.872**	**1.001.535.000**	**694.535.000**	**403.126.187**
3	-9.327.525.000	2.324.441	307.000.000	119.865.000	51.567.235
4	-9.140.390.000	2.503.660	187.135.000	137.745.000	55.017.444
5	-9.091.000.000	4.638.965	49.390.000	24.715.000	5.327.697
6	-9.066.325.000	44.814.916	24.675.000	261.520.000	5.835.557
7	-9.303.170.000	376.116.043	-236.845.000	324.845.000	0.863683
8	-9.215.170.000	353.505.078	88.000.000	157.480.000	0.445482
9	-9.284.650.000	381.131.601	-69.480.000	205.465.000	0.539092
10	-9.559.595.000	507.683.809	-274.945.000	585.900.000	1.154.065
11	-9.248.640.000	381.726.552	310.955.000	311.275.000	0.815440
12	-9.248.960.000	382.385.543	-0.320000	27.310.000	0.071420
13	-9.276.590.000	410.999.360	-27.630.000	47.355.000	0.115219
14	-9.256.865.000	386.229.022	19.725.000	162.050.000	0.419570
15	-9.075.090.000	96.648.903	181.775.000	250.565.000	2.592.528
16	-9.143.880.000	260.955.737	-68.790.000	85.960.000	0.329405
17	-9.126.710.000	239.660.051	17.170.000	5.090.000	0.021238
18	-9.104.450.000	168.424.568	22.260.000	30.405.000	0.180526
19	-9.112.595.000	187.059.063	-8.145.000	57.925.000	0.309662
20	-9.062.815.000	16.094.663	49.780.000	53.330.000	3.313.521
21	-9.066.365.000	19.487.493	-3.550.000		

Algunos de los aguacates criollos colombianos tuvieron algún porcentaje de asignación al grupo K=2, estos fueron: del departamento de Antioquia los cultivares ANSS45, ANR91, ANR92, ANR93, ANR94, ANR95, ANR96, ANRR86, ANGI52, ANER100, ANER101, ANER102, del departamento del Cesar el cultivar CELA006; del departamento del Quindío los cultivares QUICO009 Y QUIQUI029 y del departamento del Valle del Cauca los cultivares VAPA066, VABU014 Y VAPA026.

Figura 2- 4. Agrupamiento aguacates criollos de Colombia con accesiones de la colección Colombiana de Aguacate mediante un dendograma basado en análisis Neighbour - Joining, usando matriz de similaridad generada por la distancia de Dice.



Con el fin de determinar la similitud genética existente entre aguacates criollos y variedades comerciales, obsoletas de raza conocida y patrones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate, se realizó un análisis de similitud aplicando el índice de Dice (Dice, 1945) y se generó un dendograma Neighbour Joining (Saitou y Nei, 1987) (Figura 2-4). La mayoría de aguacates criollos presentaron la tendencia de agruparse entre ellos; sin embargo hubo algunos de ellos que se agruparon con accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate como fueron por ejemplo el cultivar QUIQUI029 el cual se agrupo con los cultivares Hass y Hayes, de igual forma el cultivar ANRR89 estuvo relacionado a estos tres cultivares. El cultivar ANGI52 se agrupo con la accesión Oculta1 y los cultivares Simonds de raza Antillana y Booth 5 híbrido entre las razas Guatemalteca y Antillana. El cultivar QUICO009 con el cultivar Itzama de la raza Guatemalteca. El cultivar NACHA003 con el cultivar Topa-Topa de la raza Mexicana. El cultivar VAPA066 con el cultivar Ruhele de raza Antillana. Los cultivares CELA006 y VAPA026 con los híbridos de razas Guatemalteca y Antillana Booth 8 y Santana. El cultivar ANRR89M con los híbridos de las razas Mexicana y Guatemalteca Fuerte y Lula, el híbrido entre las razas Guatemalteca y Antillana Monroe y el cultivar Puebla de la raza Mexicana. Otros aguacates criollos estuvieron agrupados con accesiones con características de resistencia al patógeno *Phytophthora cinnamomi,* como fue el caso de los cultivares ANER100 y TACO047 quienes se agruparon con el portainjerto G-755, conocido por su buena resistencia a *P. cinnamomi* (Castro, 1990). Los cultivares VAPA056, VAPA061, VAPA 060 y VAPA063 con el patrón Tumaco el cual se destaca por no presentar incompatibilidad con ninguna de las variedades comerciales además de ser tolerante a salinidad y alcalinidad (Rios –Castaño et al. 2005). El cultivar CANO008 del departamento de Caldas se agrupo con los aguacates criollos ANCG53 y QUIPI001; este cultivar mostro resistencia a *P. cinnamomi,* en un estudio realizado por Rodríguez-Henao, 2015. De igual forma el cultivar NATU001 presentó alta resistencia a *P. cinnamomi* en este mismo estudio y se agrupo con el cultivar VARU006.

2.6. Discusión.

En el presente capitulo mediante caracterización molecular con marcadores microsatélites, se logró comparar aguacates criollos del departamento de Antioquia y otros departamentos de Colombia en condiciones *in situ,* con cultivares de diversos orígenes del mundo, variedades comerciales y variedades obsoletas de raza botánica identificada y patrones de injertación reconocidos, conservados en condiciones *ex situ.* Esta comparación tuvo como finalidad poder determinar la identidad racial de los aguacates criollos colombianos e identificar si tienen similitud genética con las variedades comerciales de aguacate de interés para la región, de forma que se pudieran seleccionar algunos cultivares con potencial como portainjertos para las zonas productoras del departamento de Antioquia, garantizando una mayor compatibilidad copa / patrón desde el punto de vista de su afinidad botánica y por consiguiente genética .

El número de alelos amplificados con los 14 marcadores microsatélites para los 157 cultivares analizados incluyendo los de Antioquia y los de diversos orígenes del mundo pertenecientes a la Colección de La Mayora fueron de 254 alelos. Cuando se realizó la caracterización únicamente de los cultivares de Antioquia con los mismos marcadores microsatélites (Capítulo I), se obtuvo una amplificación de 147 alelos, lo que indica que los 107 alelos restantes fueron aportados por las accesiones de la colección de La Mayora. Cuando Alcaraz y Hormaza (2007) caracterizaron la colección de La Mayora con 16 marcadores microsatélites incluyendo los 14 empleados en el presente capítulo y 8 accesiones adicionales; obtuvieron una amplificación de 156 alelos; es decir, 49 alelos más que los obtenidos de esa colección en este capítulo, los cuales pudieron ser aportados por las 8 accesiones adicionales que ellos caracterizaron y por los dos loci adicionales que ellos emplearon en dicha caracterización. Esto nos indica que los alelos compartidos entre los cultivares antioqueños y las accesiones de la Colección de aguacate de La Mayora es casi inexistente. Este resultado fue corroborado mediante el análisis de estructura poblacional Bayesiano, dendograma UPGMA basado en las distancias F_{ST} pareadas y dendograma Neighbour joining e índice de similaridad de Dice; en donde se puede observar claramente la separación en dos grupos de los cultivares de Antioquia y los pertenecientes a la Colección de La Mayora.

Con relación al análisis de diversidad genética realizado en conjunto entre los cultivares de Antioquia y los pertenecientes a la Colección de La Mayora, los resultados obtenidos revelan que la población con mayor diversidad genética fue Málaga en España, en la cual se obtuvieron en total 350 alelos con los 14 marcadores microsatélites analizados. Esta población tuvo un tamaño de muestra de 26 individuos, y de todas las poblaciones estudiadas tanto en Antioquia como las pertenecientes a la Colección de La Mayora fueron en la que más individuos se analizaron. Para el caso de las poblaciones de Antioquia, el municipio de Sonsón presentó el mayor número de alelos (248) en 7 individuos. Por otro lado, el menor número de alelos por población fue de 28 y correspondió a las poblaciones de Santa Bárbara en Antioquia, y Guatemala, las cuales a la vez fueron las que presentaron el menor número de individuos por población; esto puede ser atribuido al efecto de la deriva en los muestreos que se realizan en poblaciones naturales, la cual reduce la variabilidad genética de una población evaluada (Hedrick, 2004; Freeland, 2005).

Con relación a la heterocigosidad esperada como estimador de la variabilidad genética de una población (IPGRI and Cornell University, 2003), el valor promedio obtenido para las poblaciones de aguacates criollos de Antioquia fue de 0,60. Este valor fue menor al obtenido en este estudio para las poblaciones de cultivares de la Colección de La Mayora, el cual fue de 0,65. De igual forma la heterocigosidad esperada de las poblaciones antioqueñas también fue menor a la encontrada en estudios de diversidad genética realizados en otras Colecciones y Bancos de germoplasma de aguacate con marcadores microsatélites; como por ejemplo el estudio realizado por Guzmán et al. (2017), quienes caracterizaron 318 accesiones pertenecientes a la Colección de Aguacate del Campo Experimental Bajio Celaya del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de México (INIFAP); la cual es representativa de la diversidad genética de aguacate existente en ese país y presentó una heterocigosidad esperada de 0,75. De igual forma menor al estudio realizado por Gross - German and Viruel (2013) quienes caracterizaron 42 accesiones de variedades de aguacate conservadas en varios institutos en España y representativas de las tres razas botánicas del aguacate y de un amplio rango geográfico; en este caso la heterocigosidad esperada fue de 0, 831.

El análisis conjunto de asignación bayesiana a través del programa STRUCTURE de los cultivares de Antioquia y las accesiones de la Colección de Germoplasma de Aguacate La Mayora (n = 18 poblaciones), produjo un K = 2 poblaciones estimado a partir de 18 orígenes

de colecta de los cultivares. Estos resultados corroboran lo encontrado con el árbol UPGMA demostrando que el aguacate “criollo” de Antioquia es genéticamente distante a los aguacates conservados en condiciones *ex situ* en la colección de La Mayora. Estos resultados podrían explicarse a las diferencias existentes entre las muestras analizadas, ya que el aguacate de Antioquia es producto de múltiples cruzamientos por polinización cruzada entre los arboles de aguacate de esta región; particularmente entre los cultivos vecinos, mientras que los cultivares de la colección de La Mayora, algunos son producto de cruces dirigidos para mejoramiento genético vegetal y otros fueron colectados de regiones muy distantes a Colombia como España. Por lo tanto, las accesiones de la colección de La Mayora no permitieron determinar mediante su comparación la identificación racial de los aguacates criollos de Antioquia; además que ninguno de estos cultivares presento similitud genética con las variedades comerciales pertenecientes a la Colección.

Debido a la gran diferencia genética encontrada entre los cultivares de Antioquia y los pertenecientes a la colección de La Mayora; además de la menor diversidad genética encontrada en los aguacates antioqueños, surgió por parte de los investigadores del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora UMA-CSIC que colaboraron en el presente estudio la hipótesis de que los cultivares de Antioquia pudieron haber pasado por un cuello de botella por un efecto antropogénico que pudo haber reducido su variabilidad genética; hipótesis que no fue confirmada, ya que las simulaciones de cuello de botella realizadas en el programa Bottleneck en los aguacates criollos de Antioquia, las pruebas de “sign test”, “standardized difference test”, y la evaluación de “Wilcoxon´s signed Rank” no fueron significativas para la mayoría de municipios Antioqueños, con la excepción de los cultivares de El Retiro y Rionegro; significando que la reducción del número de alelos y heterocigosidad observada en Antioquia respecto al banco de germoplasma español no se debe a un cuello de botella causada por la manipulación de los agricultores antioqueños, sino a las diferencias existentes entre las muestras evaluadas ya que la colección de La Mayora posee material de aguacate de orígenes muy distantes a Colombia y materiales producto del mejoramiento genético.

Con relación al estudio de similitud genética de los aguacates criollos de Antioquia colectados en los años 2014 y 2015 y los colectados en otros departamentos de Colombia con variedades comerciales y obsoletas y patrones de injertación pertenecientes a la

Colección Colombiana de Aguacate, se realizó un análisis de asignación bayesiana con el software STRUCTURE. La finalidad de este análisis fue identificar las razas botánicas de los aguacates criollos; basados en estudios previos en donde se logró la asignación de raza botánica de acuerdo a la agrupación dada por STRUCTURE Gross - German and Viruel (2013). En el presente estudio el análisis de asignación bayesiana arrojo un valor K=2, mostrando una marcada diferencia de asignación entre los aguacates criollos y las accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate. Este resultado fue similar al análisis de asignación bayesiana realizado entre los aguacates criollos de Antioquia colectados en los años 2009 a 2011 y las accesiones de la Colección de Aguacate de La Mayora. Además, este análisis no permitió identificar la raza botánica de los cultivares criollos, ni su similitud genética con una variedad comercial en particular. Sin embargo algunos aguacates criollos tuvieron algún porcentaje de asignación al grupo de las accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate, indicando más proximidad de estos aguacates a las razas botánicas. El resultado obtenido con STRUCTURE fue similar al obtenido por Guzmán et al.,(2017) en la caracterización molecular de las accesiones pertenecientes a la Colección de Aguacate del INIFAP en México, en donde el análisis STRUCTURE sugirió dos grupos genéticos dentro de la Colección estudiada y estos dos grupos no coincidieron con la determinación de las razas botánicas. La colección del INIFAP estuvo conformada por accesiones de las cuales se tenía conocimiento previo de su raza botánica y otras que no, de igual forma que el presente estudio. Estudios moleculares con el uso de marcadores y análisis de agrupamiento realizados en aguacate han permitido generalmente realizar la clasificación de razas botánicas (Ashworth and Clegg, 2003; Schnell et al. 2003; Alcaraz and Hormaza, 2007; Gross-German and Viruel, 2013 reportados por Guzmán et al., 2017). Sin embargo estos estudios se han basado en la caracterización principalmente de variedades mejoradas de las cuales se tiene registro de su pedigrí; a diferencia del presente estudio en el cual se han incluido aguacates criollos o locales que son el producto de hibridación entre las tres razas (Sánchez 1999; Barrientos-Priego and López 2007), lo cual hace extremadamente difícil la determinación de su raza.

Adicional al análisis de asignación bayesiana, se realizó un dendograma Neighbour Joining e índice de similaridad de Dice entre los aguacates criollos colombianos y las accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate. El dendograma presentó la tendencia de agrupación entre los aguacates criollos colombianos; sin embargo algunos de los

aguacates criollos analizados presentaron similitud genética con algunas de las accesiones pertenecientes a la Colección Colombiana de Aguacate y los cuales podrían ser candidatos para su uso como portainjertos. Según Warschefsky y colaboradores (2016) uno de los aspectos a tener en cuenta en la selección de un portainjerto, es que éste debe estar en función del genotipo de la copa con la que será injertado y con el ambiente en el cual la planta cultivada se desarrollará. Desde este punto de vista los aguacates criollos QUIQUI029 del departamento del Quindío y ANRR89 del departamento de Antioquia pueden ser una opción como portainjerto para el cultivar Hass, ya que presentaron similitud genética con este cultivar y el cultivar Hayes híbrido entre las razas Guatemalteca y Antillana. Otro de los aguacates criollos que presentó similitud genética con una variedad de interés comercial para Antioquia y Colombia fue ANRR89M, el cual es descendiente de ANRR89 y estuve cercano genéticamente al cultivar Fuerte hibrido entre las razas Mexicana y Guatemalteca.

Para el caso específico del cultivo del aguacate, uno de los atributos más importantes que deben tener los portainjertos son la resistencia a *Phytophthora cinnamomi,* la tolerancia a la salinidad y la adaptabilidad a suelos calcáreos (Whyley, 1992). En esta vía; algunos cultivares criollos presentaron similitud genética con cultivares o patrones con algunas de estas características. Por ejemplo los aguacates criollos ANER100 del departamento de Antioquia y TACO047 del departamento del Tolima estuvieron cercanos genéticamente al clon G-755. Este cultivar fue seleccionado a partir de semillas en Guatemala en 1975. Corresponde a un híbrido entre *Persea schiedeana* y *Persea americana* Mill. var. guatemalensis. Ha sido demostrada su compatibilidad con variedades comerciales como Hass, Gwen, Pinkerton y Fuerte. Después de varios años de evaluación en la Universidad de California en Riverside se ha encontrado superior en su resistencia a *Phytophthora* que Duke 7 y G 6 (Castro, 1990). Otro ejemplo de similitud genética con cultivares con características de resistencia a *P.cinnamomi,* es el caso de los aguacates criollos ANCGI53 de Antioquia y QUIPI001 del Quindío los cuales tuvieron similitud genética con la accesión CANO008. Esta accesión fue reportada por Jaramillo et al. (2009) como material resistente a *P.cinnamomi* y esta resistencia fue confirmada por Rodríguez-Henao, 2015. Esta accesión fue colectada en el municipio de Norcasia, Caldas a 551 m.s.n.m. con una temperatura media anual de 25ºC, precipitación promedio anual de 3.675mm, humedad relativa ambiental promedio de 76,76%. Norcasia registra clima cálido que se caracteriza

por fuertes lluvias en cortos tiempo, generando un ambiente óptimo para la aparición de *P. cinnamomi* en cultivos de aguacate (Rodríguez-Henao, 2015).

De igual forma el aguacate criollo VARU006 del departamento del Valle del Cauca presento similitud genética con la accesión NATU001. Esta accesión fue colectada en el municipio de Tumaco Nariño, en la costa pacífica de Colombia a 25 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 29ºC con oscilaciones entre 16 y 33ºC, humedad relativa promedio de 83,86%, precipitación de 2.792mm por año, topografía relativamente plana favoreciendo sobresaturación e inundaciones del terreno. El municipio se caracteriza por un clima cálido húmedo característico del bosque húmedo tropical (BHT), condiciones ideales para el desarrollo y posible infección de plantas de aguacate por *P. cinnamomi* (Rodríguez-Henao, 2015).

Los aguacates criollos VAPA056, VAPA061, VAPA 060 y VAPA063 del Valle del Cauca presentaron similitud genética con el patrón Tumaco. Este cultivar fue recolectado en Tumaco departamento de Nariño en 1936 y ha sido utilizado como patrón de injertación y designado de raza Antillana. Corresponde a un árbol de porte alto, con buena producción que se reparte en dos cosechas por año, frutos de 285 gramos, de buena calidad y sabor y pulpa de color verde amarillo. Posee un sistema radical amplio que le da una ventaja en suelos de mayor contenido de arcillas. Sus semillas son grandes, lo que le brinda buen desarrollo y rápido crecimiento de plantas para patronaje, lográndose injertar entre 50 y 60 días después de germinadas. No presenta incompatibilidad con ninguna de las variedades comerciales. Es tolerante a la salinidad, la alcalinidad y relativa tolerancia para soportar largos períodos de suelos inundados o mal drenados (Bernal et al. 2014).

Este estudio puede ser un primer paso para la selección de materiales promisorios para portainjertos de acuerdo a la similitud genética con cultivares con ciertos caracteres de interés; sin embargo se hace necesario realizar estudios adicionales como por ejemplo compatibilidad con variedades de interés comercial, evaluaciones de resistencia a factores como salinidad, alcalinidad, tolerancia a suelos inundados o mal drenados, pudriciones radiculares entre otros que son claves para el éxito de un cultivar como portainjerto.

2.7. Conclusiones.

- No fue posible determinar la raza botánica de los aguacates criollos colombianos, mediante su comparación con las accesiones de la Colección Colombiana de Aguacate y de La Mayora; ya que los aguacates criollos colombianos son genéticamente diferentes a las accesiones de raza conocida pertenecientes a ambas colecciones.

- Se pudo comprobar que la diferencia genética existente entre los aguacates criollos de Antioquia y las accesiones de la Colección de La Mayora no se debe a efectos de cuello de botella causado por reducción genética debida a manipulación por parte de los agricultores. La diferencia en la composición alélica y la baja diversidad genética de los aguacates antioqueños en comparación con las accesiones de La Mayora puede deberse a que estos aguacates están ubicados en un área geográfica de Colombia que se encuentra separada de otros países por la cordillera de los Andes.

- A pesar de la diferencia genética existente entre los aguacates criollos colombianos y las accesiones de las colecciones de aguacate, se lograron identificar algunos cultivares criollos candidatos a portainjertos por su similitud genética con variedades comerciales como Hass y Fuerte y con cultivares con características deseables para portainjertos como resistencia a *P. cinnamomi* y tolerancia a salinidad, alcalinidad y suelos mal drenados.

2.8. Bibliografía.

Alcaraz, M. Hormaza, I. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas* 144: 244-253.

Anacafe (2004). Asociación Nacional del café. Cultivo de aguacate. Programa de diversificación de ingresos de la empresa cafetalera. Guatemala. 25 p.

Barrientos–Priego, A. F.; Muñoz–Pérez, R. B.; Borys, M. W.; Martínez–Damián, MA. T. (2000). Cultivares y portainjertos del aguacate, pp. 35–54. In: El Aguacate y su Manejo Integrado.

Bernal E., J.A. y Díaz D., C. 2014. Manejo del cultivo. En: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica; Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Cultivo de Aguacate. 2ª. Ed. Medellin, Colombia. pp. 10-151.

Bergh, B.O. (1995). Evolution of crop plants. Longman Scientific and technical, USA and UK.

Ben-Ya'acov, A., Zilberstaine, M., Goren, M. et al. 2003. The Israeli avocado germplasm bank: where and why the items had been collected. Proc. V World AvocadoCongr. Pp.13-19.

Cañas-Gutiérrez, G.P. Galindo-López, L.F. Arango- Isaza, R.E. Saldamando-Benjumea, C.I. (2015) Diversidad genética de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Antioquia. Colombia. *Agronomía Mesoamericana* 26:129-143.

Castro, M. (1990). Propagación, portainjertos y reinjertación de palto. pp. F1-F14. In: Undurraga, P., De Kartzow, A., Soto, H., y Feito, X. Curso internacional, Producción, postcosecha y comercialización de paltas. 2 al 5 de Octubre de 1990. Viña del mar, Chile. Universidad Católica de Valparaíso y FAO. 262p.

Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 26: 297-302.

Earl, D.A. vonHoldt, B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetic Resources 4:359-361.

Evanno, G. Regnaut, S. Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.

Freeland, J. (2005) Molecular Ecology. Ed. John Wiley and Sons. West Sussex. England.

Gross-German, E. Viruel, M.A. (2013) Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity population structure and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. Tree Genetics Genomes 9:539- 555.

Guzmán, L.F. Machida-Hirano, R. Borrayo, E. Cortés-Cruz, M. Espíndola-Barquera, M.C. Heredia-García, E. (2017). Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. Front Plant Science 8:243.

Hammer, O.D. Harper, A.T. Ryan, P.D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Paleontology. Electric. 4:1-9

Hedrick, P.W. (2004). Genetics of populations. Jones and Barlett Publishers, SudburyMassachusets, 737 p.

Jaramillo, J. Mejía, A. Villamizar, P. Orozco, M. Arenas, A. (2009). Informe Final del Proyecto: Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a Phytophthora spp. CIAT, CORPOICA, PROFRUTALES. Palmira, Valle del Cauca, 153 p.

Peakall, R. Smouse, P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.

Piry, S. Luikart, G. Cornuet, J.M. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. J Heredity.

90: 502-503.

Pritchard, J.K. Stephens, M. Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.

Raymond, M. Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249

Rodríguez, E. (2015). Caracterización morfológica y evaluación de la resistencia de materiales criollos de aguacate *Persea americana* Mill. A la pudrición radical del aguacate *Phytophthora cinnamomi* Rands en el centro de investigación Palmira de CORPOICA. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Palmira Valle del Cauca, Colombia. 81 p.

Sánchez, P. J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:7-18.

Sneath, P.H. Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. Ed. Freeman. San Francisco

Storey, W.B. Bergh, B.O. Zentmyer, G.A. (1986). The origin indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70:127–133.

Whiley, A.W. (1992). Avocado varieties and rootstocks – a review. In: Proceedings of the Avocado Research Workshop. Queensland Departament of Primaty Industries, Brisbane pp 15-20.

Capítulo III.

Caracterización morfológica y molecular de aguacates criollos de aguacate del departamento de Antioquia candidatos a portainjertos.

3.1. Resumen.

Las razas botánicas del aguacate se diferencian entre si principalmente por sus características morfológicas, fisiológicas y de adaptabilidad a las condiciones ambientales (Bergh, 1995; Bernal et al., 2014). Con el objetivo de determinar la identidad racial de 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia con potencial de uso para portainjertos de variedades comerciales de interés para la región; se realizó su caracterización morfológica mediante el uso de descriptores morfológicos del árbol, rama y hoja. Los datos morfológicos obtenidos fueron correlacionados con caracteres moleculares y variables del paisaje como topografía y altitud mediante análisis de componentes principales y distancias euclidianas y algoritmo de Ward. Los caracteres morfológicos evaluados mostraron una variabilidad elevada en los aguacates criollos analizados, de acuerdo a su coeficiente de variación. Caracteres como el tamaño de las hojas y la superficie del tallo, los cuales son usados entre otros para la distinción de las razas botánicas en aguacate no fueron útiles para su determinación en los aguacates criollos de Antioquia. Los análisis multivariados y de agrupamiento realizados en este capítulo mostraron en general que los arboles de aguacate criollo evaluados en el departamento de Antioquia se diferenciaron en tres grupos basados en datos de caracteres morfológicos y la combinación de datos de caracteres morfológicos y moleculares. Estos agrupamientos ocurrieron al adicionar la variable altitud (elevación). Los resultados obtenidos en este capítulo soportan la afirmación realizada por Alcaraz y Hormaza (2007), quienes mencionan que los árboles de aguacate criollo son producto de múltiples hibridaciones entre las tres razas de aguacate conocidas hoy en día y por ello el uso de caracteres morfológicos para su clasificación dificulta el establecimiento de diferencias marcadas entre sus individuos y poblaciones.

3.2. Introducción.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol subtropical perenne, nativo de Centro América y México que posee 2n= 24 cromosomas (Ashworth y Clegg, 2003). Esta especie es miembro de la familia Lauraceae la cual se caracteriza por tener arboles subtropicales o tropicales que han sido incluidos dentro del clado de las Magnoliideas el cual está compuesto por plantas angioespermas que divergieron tempranamente en la escala evolutiva. Esta familia contiene aproximadamente 50 géneros que involucre entre 2.500 a 3.000 especies de árboles y arbustos (Chanderbali et al. 2008).

Desde su centro de origen, el aguacate se dispersó de tal manera que los primeros movimientos del aguacate nativo se produjeron de Sierra Nevada (origen) hasta Mesoamérica por los movimientos migratorios de grandes mamíferos como osos perezosos y animales de la familia Gomphotheriidae (Galindo y Arzate, 2010). Cuando el aguacate llegó al centro de México, se produjo una especie de radiación desde que un primer grupo de mamíferos migró a Guatemala, un segundo grupo al oeste de México, el cual llega al valle de Tehuacán y un tercer grupo a América del Norte y del Sur (Corona-Jacome et al. 2016). No existe certeza de que las civilizaciones antiguas que participaron en la domesticación del aguacate hayan contribuido de alguna forma a la diferenciación de *P. americana* en subespecies; sin embargo Chen et al. (2009) mencionan que una cultura Mesoamericana denominada “los Moyacas” pudieron haber transmitido sus prácticas agrícolas a otras culturas más recientes como los Mayas y los Olmecas, los cuales con el tiempo dieron origen a los diversos tipos de aguacate existente que con ayuda de su aislamiento geográfico dieron lugar a tipos botánicos distintos con diferencias en adaptación climática.

En la actualidad se reconocen tres razas hortícolas o razas ecológicas del aguacate: la raza Mexicana (*P. americana* ssp drymifolia), raza Guatemalteca (*P. americana* ssp. guatemalensis) y la raza Antillana (*P. americana* ssp americana) (Bergh, 1992). Las razas Mexicana y Guatemalteca se originaron y domesticaron en las tierras altas de México y Guatemala respectivamente (Storey et al., 1986; Bergh, 1992) mientras que la raza Antillana muy probablemente tuvo su origen en la costa del Pacífico de Centroamérica,

desde Guatemala hasta Costa Rica (Storey et al., 1986). Generalmente, dentro de cada raza los cultivares tienen respuestas similares a las condiciones edáficas y climáticas; sin embargo existen varias diferencias entre las razas en cuanto a sus características morfológicas, fisiológicas y de adaptabilidad a las condiciones ambientales (Bergh, 1995; Bernal et al. 2014). Por ejemplo, la raza Mexicana tiene como principal ventaja la resistencia al frio adaptándose a alturas sobre el nivel del mar por encima de 2.000 metros, se caracteriza por su alto contenido de aceite y olor a anís en sus hojas. La raza Guatemalteca se adapta a alturas sobre el nivel del mar entre 1.000 y 2.000 metros, presenta una cáscara bastante gruesa si se compara con las otras tres razas, lo que le permite resistencia del fruto al transporte; sin embargo, como está formada por tejidos esclereficados son bastante duros y no permite saber con el tacto si los frutos ya están en madurez de consumo. Otra característica favorable es el tamaño pequeño y forma redonda de la semilla en varios individuos de esta raza. La raza Antillana se adapta a climas tropicales con alturas sobre el nivel del mar por debajo de 1.000 metros, como portainjerto es más tolerante a la salinidad y tiene un lapso de flor a fruto bastante corto comparado con las otras razas (Barrientos y López – López, 2000). En la tabla 3-1 podemos observar una recopilación de algunas de las diferencias existentes entre razas de aguacate (Barrientos y López – López, 2000). Como resultado de la extensa distribución del germoplasma del aguacate hacia zonas bastantes alejadas de su sitio de origen, se ha producido un considerable cruzamiento interracial, a tal grado que los actuales cultivares de mayor importancia económica, tanto en áreas subtropicales como tropicales, son el resultado de la hibridación entre varias razas (Kinght, 2007 reportado por Bernal et al. 2014).

Esta hibridación libre entre las razas ha generado un aumento en la diversidad genética y en la plasticidad medio ambiental de las especies (Whiley y Shaffer, 1994 reportado por Bernal et al. 2014); por lo tanto en la mayoría de zonas productivas de varios países, en los que se incluye Colombia, existe una distribución de poblaciones de aguacate heterogénea o de gran diversidad en tamaño, forma y color de frutos; esto debido además a que su explotación se ha realizado como cultivo asociado y propagado por semilla (Avilán et al. 1980 reportado por Soto et al. 2007) lo que ha dado origen a una serie de árboles nativos o criollos y cultivares selectos reproducidos asexualmente, en los cuales el sabor y los valores nutritivos varían según el tipo ecológico (Mijares y López, 1998).

Una forma de conocer la diversidad genética existente en una especie vegetal, es mediante su caracterización. Una característica es un atributo de un organismo y es el producto de la interacción de uno o más genes en el ambiente los cuales a su vez se dividen en características cualitativas y cuantitativas (Engels, 1979 reportado por Avalos et al. 2006). Según el IPGRI (1980), una caracterización es la descripción de los atributos de un genotipo considerados invariables y representan una actividad muy importante en la cual se pueden extraer una serie de características cualitativas como color de frutos, flor, corteza, sabor de la pulpa y de características cuantitativas como peso, altura, diámetro, entre otros. La caracterización es la descripción de una variación que existe en una colección de germoplasma, en términos de características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad, es decir características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente (Avalos et al. 2006). Al contrario de la caracterización morfológica, la caracterización molecular a través del uso de marcadores moleculares como los microsatélites (SSR) es ventajosa ya que permite identificar variedades y diferenciar entre accesiones sin estar afectados por las condiciones ambientales (Morales - Palacio et al. 2016). Las técnicas de caracterización morfológica y molecular se complementan entre sí, en la medida en que la diversidad molecular no considera las interacciones genotipo-ambiente, por ello ambos métodos en conjunto pueden proveer un conocimiento amplio y real de la diversidad de especies (Morales - Palacio et al. 2016).

Para el caso de germoplasma de aguacate se han estado desarrollando trabajos donde se combina la caracterización morfológica y molecular, en donde, ambas técnicas permiten una descripción más completa, precisa y robusta de la información, generándose una descripción y distinción más completa entre los individuos (Gutiérrez-Díez et al. 2009).

Para evaluar la interacción de características del paisaje y variables ambientales con procesos microevolutivos como flujo génico deriva genética o selección, se hace uso del área de estudio denominada “Genética del Paisaje” (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). Esta área de estudio en particular considera atributos tales como montañas, ríos, carreteras, que funcionan como barreras, así como otras que facilitan el movimiento de individuos, como corredores. Así mismo, evalúa variables ambientales como temperatura, humedad, altitud, etc., con el objetivo de determinar la relación entre

dichas variables y procesos micro y macroevolutivos como flujo génico, deriva genética, selección o especiación (Manel et al. 2003; Storfer et al. 2007, 2010; Sork y Waits, 2010 reportados por Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013).

Tabla 3 1. Diferencias entre las razas de aguacate (*Persea americana* Mill.). (Barrientos y López – López, 2000).

Caracter	raza Mexicana	raza Guatemalteca	raza Costaricensis	raza Antillana
Clima	"semitropical" a templado	subtropical	subtropical	tropical
Altitud sobre el nivel del mar	Sobre 2000 m	entre 1000 y 2000 m	entre 800 y 1500 m	menos de 1000
Resistencia a salinidad	Menor	menor	¿?	mayor
Resistencia a frio	Mayor	intermedia	menor	menor
Hojas:				
tamaño	Menor	intermedio	menor	mayor
color	Verse obscuro	verde obscuro	verde obscuro	verde pálido
olor	olor a anís	sin olor a anís	sin olor a anís	sin olor a anís
Flor:				
pubescencia	Más	menos	¿?	menos
Tallo:				
brotes jóvenes	Verde pálido	rojizos	verde pálido	verde pálido
corteza del tronco	no acanalada	no acanalada	no acanalada	acanalada
Fruto:				
Tamaño	Variable, tendiente a pequeños	intermedios	pequeños	variable, tendientes a grandes
pedicelo	Cilíndricos y grosor mediano	cónico y grosor voluminoso	cilíndrico y grosor regular	forma de cabeza de clavo y poco grosor, y también existen tipos con mayor grosor.
persistencia del perianto en el fruto	Mayor	menor	menor	menor
cáscara	Delgada, lisa y suave	gruesa, quebradiza y rugosa	grosor mediano, flexible y suave	grosor mediano, flexible y suave
semilla	Adherida o suelta, cotiledones lisos o ligeramente rugosos	adherida y cotiledones lisos	adherida y cotiledones lisos	suelta y cotiledones rugosos
cubiertas de la semilla	Delgada	delgada	delgada	mediana o gruesa y membranosa
aceite	alto contenido	mediano contenido	¿?	bajo contenido
sabor	a especia y por lo general a anís	ligero, en ocasiones nogado	ligero, sin sabor específico	ligero y frecuentemente dulce, con un ligero amargor al final.
fibra en la pulpa	Común	no común	no común	no común
tiempo de flor a fruto	6-9 meses	10-16 meses	¿?	5 a 9 meses
Tamaño relativo del árbol y hábito de crecimiento general:	Medianos abiertos	altos y erectos	medianos y abiertos	altos y medianos, abiertos y erectos

La genética del paisaje puede considerarse un área de estudio relativamente reciente, es apenas en 2003 que Stephanie Manel y colaboradores acuñan el término "genética del

paisaje", cuya diferencia más importante con la genética de poblaciones es que ésta no considera a los atributos del paisaje para explicar la estructura genética (Holderegger y Wagner, 2008 reportado por Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013) y, con la filogeografía, porque ésta estudia procesos históricos y no procesos recientes o contemporáneos que afectan la variación genética (Wang, 2010 reportado por Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013).

El presente capitulo está orientado a estimar la variabilidad fenotípica del aguacate criollo de Antioquia mediante su caracterización morfológica a través del uso de descriptores morfológicos del árbol, rama y hojas específicos para el cultivo de aguacate, correlación con su caracterización molecular y de esta con variables del paisaje como la altitud en la que se encuentran los aguacates criollos, ya que este factor es determinante en la identificación de raza en relación a su adaptabilidad; también la topografía, ya que el aguacate se adapta a suelos con un máximo de 30% de pendiente (Anacafe, 2004). Esto con el fin de poder determinar la identificación racial de los aguacates criollos de Antioquia y seleccionar cultivares con potencial como uso para portainjertos para las variedades comerciales de interés en la región.

3.3. Objetivos.

A. Estimar la diversidad fenotípica existente en aguacates criollos procedentes de diferentes zonas productoras del departamento de Antioquia mediante el uso de descriptores morfológicos del árbol, rama y hoja.

B. Establecer si existe correlación entre la variabilidad genética, medida en términos de heterocigosidad y caracteres morfológicos de árbol rama y hoja en los aguacates criollos del departamento de Antioquia.

C. Determinar si existe correlación entre la variabilidad genética, medida en términos de heterocigosidad y caracteres del paisaje como la topografía y altitud del sitio de ubicación de los aguacates criollos del departamento de Antioquia.

3.4. Materiales y métodos.

3.4.1. Material vegetal.

Para la caracterización morfológica, molecular y variables del paisaje (topografía y altitud) se utilizaron los aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2009 a 2011. Su código asignado, su localidad de origen y altitud y topografía se pueden observar en las tablas 3-2 a 3-4.

Tabla 3 2. Listado de aguacates criollos del Oriente antioqueño subregión paramo, caracterizados morfológica y molecularmente con su respectivo código, altitud y topografía.

Zona agroecológica	Municipio	Código ecotipo	A.S.N.M	Topografía
Oriente Antioqueño Subregión Páramo	Sonsón	24	1949	Montañoso
		25	1892	Fuerte socavado
		27	1915	Fuerte socavado
		33	1833	Montañoso
		316	2205	Colinado
		317	2207	Colinado
		320	2130	Colinado
		322	2200	Colinado
		329	2152	Ondulado
		330	2146	Ondulado
		331	2136	Ondulado
		354	2340	Fuerte socavado
		355	2281	Fuerte socavado
		356	2341	Fuerte socavado
		359	2258	Fuerte socavado
		360	2268	Colinado
		362	2273	Fuerte socavado
		374	2145	Poco ondulado
	Abejorral	388	1800	Montañoso
		390	1761	Montañoso
		399	1636	Ondulado
		400	1647	Ondulado
		404	1650	Ondulado
		411	1642	Poco ondulado
		412	1644	Poco ondulado
		413	1655	Poco ondulado
		417	1658	Poco ondulado

Tabla 3-3. Listado de aguacates criollos del Oriente antioqueño subregión Altiplano, caracterizados morfológica y molecularmente con su respectivo código, altitud y topografía.

Zona agroecológica	Municipio	Código ecotipo	A.S.N.M	Topografía
Oriente Antioqueño Subregión Altiplano	El Retiro	1	1975	Montañoso
		2	1920	Quebrado
		179	2199	Colinado
		193	2112	Ondulado
		194	2110	Ondulado
	Marinilla	44	2049	Montañoso
		45	2100	Montañoso
		46	2124	Montañoso
		47	2183	Casi plano
		48	2155	Poco ondulado
		62	2185	Colinado
		64	2181	Casi plano
	Rionegro	170	2150	Poco ondulado
		171	2150	Poco ondulado
		175	2168	Poco ondulado
		176	2172	Poco ondulado
		201	2150	Casi plano
		202	2150	Casi plano
		203	2166	Casi plano
		204	2158	Casi plano
	La Ceja	145	2080	Quebrado
		147	2066	Poco ondulado
		150	2151	Quebrado
		152	2137	Quebrado
		156	2178	Quebrado
		157	2164	Quebrado
	San Vicente	35	2084	Quebrado
		37	2173	Quebrado
		38	2175	Quebrado
		39	2176	Quebrado
		40	2197	Plano
		41	2194	Plano

Tabla 3 - 4. Listado de aguacates criollos del Suroeste antioqueño, caracterizados morfológica y molecularmente con su respectivo código, altitud y topografía.

Zona agroecológica	Municipio	Código ecotipo	A.S.N.M	Topografía
Suroeste Antioqueño	Caramanta	107	2086	Montañoso
		109	2089	Montañoso
		117	1980	Montañoso
		118	1994	Montañoso
		119	1977	Montañoso
		293	2050	Montañoso
		294	2026	Montañoso
		295	2020	Montañoso
		297	2011	Montañoso
		298	2005	Montañoso
		312	2092	Colinado
		314	2085	Colinado
		315	2091	Colinado
	Valparaiso	99	1894	Montañoso
		100	1906	Montañoso
		101	1907	Montañoso
	Montebello	256	1965	Colinado
		257	1960	Colinado
		258	1954	Colinado
		259	1952	Colinado
		263	1932	Colinado
		264	1931	Colinado
		265	1930	Colinado
		266	1926	Colinado
		273	1915	Colinado
		276	1890	Colinado
		277	1872	Colinado
		279	1867	Colinado
		280	1868	Colinado
	Santa Bárbara	4	894	Montañoso
	Santa Bárbara	5	864	Montañoso

3.4.2. Descriptores morfológicos.

Para la caracterización fenotípica se seleccionaron descriptores morfológicos específicos para plantas de aguacate del International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, 1995). Los descriptores medidos fueron los siguientes:

3.4.2.1. Descriptores del árbol.

Se tuvieron en cuenta los siguientes descriptores

Altura del árbol: expresada en metros, tomada desde el nivel del suelo hasta la punta del árbol

Ancho copa: expresada en metros, registrada como la media del diámetro de dos direcciones

Forma del árbol: 1 Columnar – 2 Piramidal – 3 Obovado – 4 Rectangular – 5 Circular 6 Semicircular – 7 semielíptico – 8 Irregular (Figura 3-1)

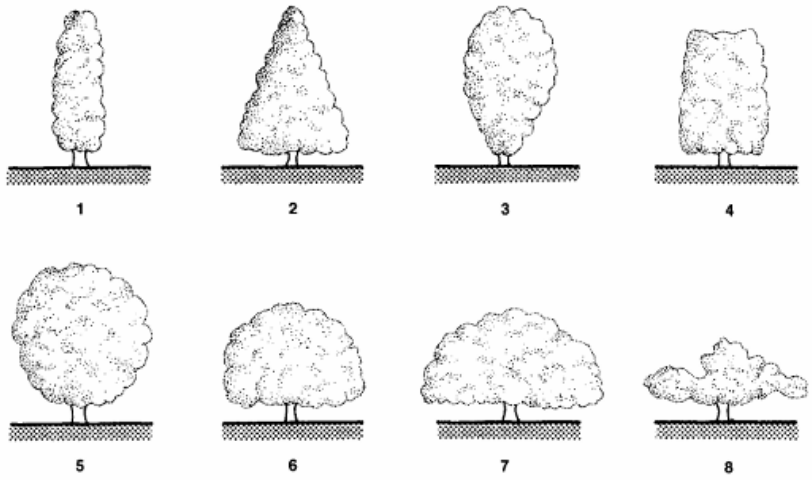


Figura 3- 1. Descriptores forma del árbol.

Superficie del tronco: 3 Lisa – 7 Rugosa – Muy rugosa

Circunferencia del tronco: expresada en centímetros, se registra a 30 cm sobre el nivel del suelo.

3.4.2.2. Descriptores de las ramas:

Se tuvieron en cuenta los siguientes descriptores

Patrón de ramificación: 1 Extensivo – 2 Intensivo – 3 Ambos (Figura 3-2)

Figura 3- 2. Descriptores de las ramas.

Distribución de las ramas: 1 ascendente – 2 Irregular – 3 Verticilada – 4 Axial - 5 Horizontal (Figura 3-3).

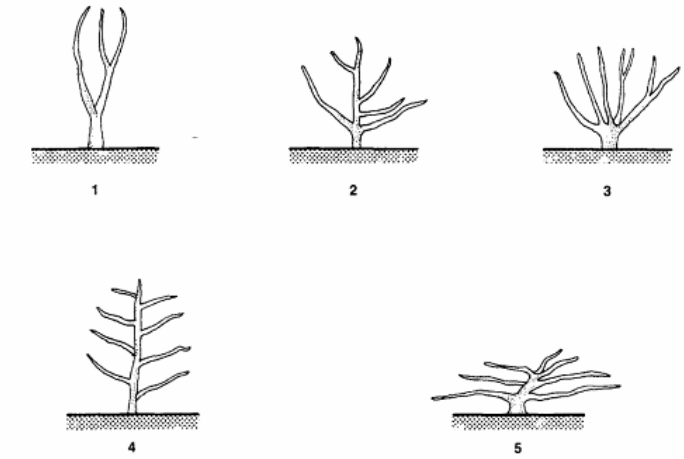


Figura 3- 3. Descriptores distribución de las ramas.

Ángulo inserción ramas: 1 Agudo (90°) – 2 obtuso (> 90°) (Figura 3-4)

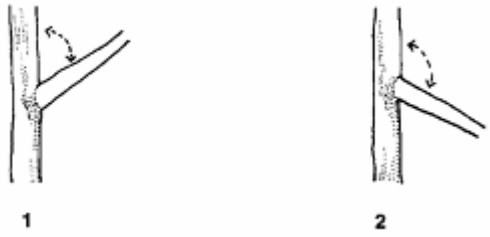


Figura 3- 4. Descriptores ángulo inserción ramas.

Color rama joven: **1 Amarillo – 2 Verde – 3 Rojo – 4 Otro**

Longitud entrenudos vástagos: expresada en centímetros, Medida en la parte intermedia del vástago, después de que el crecimiento de la temporada se detenga. Media de 10 vástagos escogidos al azar

Diámetro vástagos: expresada en centímetros, Tornado de vástagos en un entrenudo de la parte intermedia, y medida después de que el crecimiento de la temporada se detenga. Media de 10 vástagos escogidos al azar.

Superficie rama joven.

3.4.2.3. Descriptores de Hoja.

Se tuvieron en cuenta los siguientes descriptores

Forma hoja: 1 Ovada - 2 Obovada-angosta – 3 Obovada - 4 Oval - 5 Redondeada 6 Cordiforme 7 Lanceolada - 8 Oblonga - 9 Oblonga-lanceolada – 10 Otra (Figura 3-5)

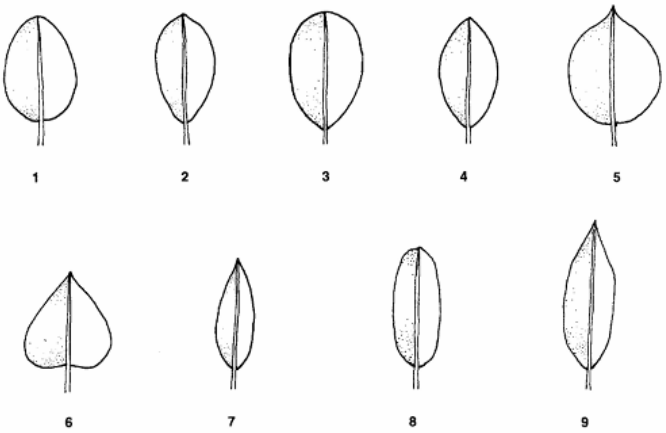


Figura 3- 5. Descriptores forma hoja.

Forma base hoja: 1 Aguda - 2 Obtusa - 3 Truncada (Figura 3-6)

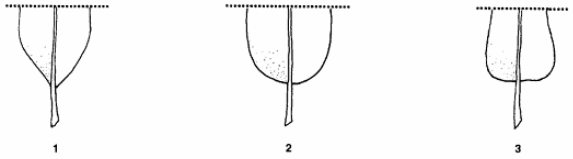


Figura 3- 6. Descriptores forma base hoja.

Ángulo inserción peciolo foliar: 1 Agudo (~90°) - 2 Obtuso (>90°) (Figura 3-7)

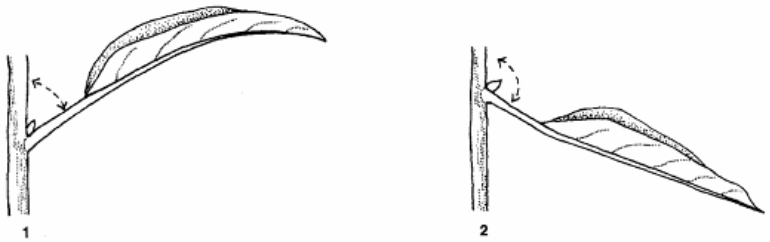


Figura 3- 7. Descriptores ángulo inserción peciolo foliar.

Longitud hoja: expresada en centímetros, promedio de 10 hojas maduras.
Ancho hoja máximo: expresada en centímetros, promedio de 10 hojas maduras.
Margen hojas: 1 Entero – 2 Ondulado (Figura 3-8)

Figura 3- 8. Descriptores margen hojas.

Forma ápice hoja: 1 Muy agudo - 3 Agudo - 5 Intermedio - 7 Obtuso - 9 Muy obtuso (Figura 3-9)

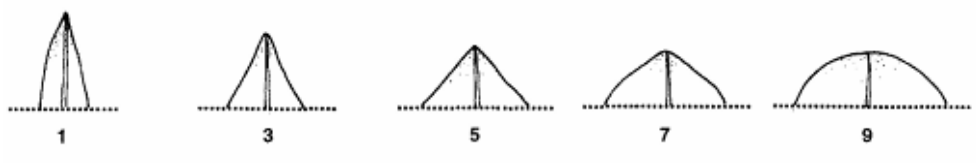


Figura 3- 9. Descriptores forma ápice hoja.

Número venas primarias: contadas en pares

Divergencia venas primarias con respecto a vena principal: expresada en grados y medida en la parte media de la hoja (Figura 3-10).

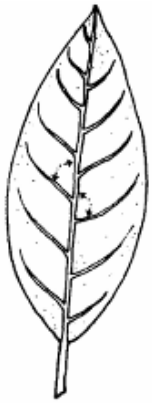


Figura 3- 10. Descriptores divergencia venas primarias con respecto a vena principal.

Relieve de la venación en la superficie del haz: 3 Sumida - 5 Intermedia - 7 Alzada

Textura de la hoja: 3 Blanda – 5 Semidura - 7 Dura - 9 Muy dura

Pubescencia del haz: 3 Escasa – 5 Intermedia - 7 Densa

Pubescencia del envés: 3 Escasa – 5 Intermedia - 7 Densa

Color haz hojas maduras: Color seleccionado de acuerdo a tabla de colores Munsell Plant Tissue

Color envés hojas maduras: Color seleccionado de acuerdo a tabla de colores Munsell Plant Tissue

3.4.2.4. Ambiental.

Se tuvo en cuenta el siguiente descriptor

Altitud: Altura sobre el nivel del mar expresada en metros sobre el nivel del mar

3.4.2.5. Paisaje.

Para este descriptor se tuvo en cuenta la topografía, la cual se refiere a los perfiles de elevación de la superficie del terreno a escala macro, siguiendo la clasificación de la FAO (1990) así

Topografía: Plano: elevación del 0 al 0.5% - 2 Casi plano: elevación del 0.6 al 2.9% - 3 Poco ondulado: elevación del 3 al 5.9% - 4 Ondulado: elevación del 6 al 10.9% - 5 Quebrado: elevación del 11 al 15.9% - 6 Colinado: elevación del 16 al 30% - 7 Fuerte socavado: >al 30%, moderada variación de elevaciones - 8 Montañoso: >al 30%, grandes variaciones de rango alto de elevación (>300m) - 9 Otro: especificar

En el caso de los caracteres cualitativos, estos fueron categorizados para facilitar su análisis.

3.4.3. Caracterización molecular.

Se utilizaron los datos obtenidos con los 14 marcadores microsatélites reportados en el capítulo 1.

3.4.4. Análisis de datos.

Mediante el programa estadístico IBM® SPSS Statistics® ser realizo un análisis descriptivo para los datos continuos y un análisis de frecuencia para los datos categóricos obtenidos de los 90 aguacates criollos de Antioquia. Se realizó además un análisis de componentes principales (PCA) de los 28 descriptores morfológicos medidos en éste cultivo. Para la realización de este análisis se utilizó el software Past 3.22 (Hammer et al. 2001). Adicionalmente, en el mismo programa, se realizó un análisis de cluster con el uso de una distancia Euclidiana y el algoritmo de Ward la cual es apta para datos categóricos y continuos para determinar si los agrupamientos generados por el análisis de PCA coincidían con este otro tipo de evaluación de datos.

El análisis de componentes principales (PCA) se amplió al concatenar los datos morfológicos de los 90 árboles con los datos moleculares de los 14 microsatélites por separado y en conjunto con los microsatélites estandarizados para la especie y las

altitudes en las que éstos fueron evaluados. En este caso también se utilizó software Past 1.2 (Hammer et al. 2001). Igualmente, con el mismo programa se realizó un análisis de clúster con el algoritmo de Ward para evaluar la relación existente entre los datos morfológicos y moleculares de ésta especie.

Posteriormente, los análisis de componentes principales y de clúster fueron realizados nuevamente teniendo en cuenta datos morfológicos y moleculares (únicamente los microsatélites) por separado y en conjunto pero en ausencia de los datos de las elevaciones. Estos análisis se realizaron para determinar la relación existente entre estos dos tipos de variables sin tener en cuenta un efecto ambiental.

Finalmente, con el fin de correlacionar la variabilidad genética con algunas variables del paisaje, se realizó una correlación de Pearson entre la Heterocigosidad esperada producida por los 14 microsatélites evaluados en los 90 árboles de aguacate criollo de los municipios del departamento de Antioquia muestreados y la topografía del lugar donde estaban ubicados los árboles, y otra correlación de Pearson fue realizada entre la heterocigosidad esperada producida por los 14 microsatélites y la altitud promedio de las localidades donde los árboles de aguacate fueron colectados. Estos análisis se realizaron en el software Past 1.2 (Hammer et al. 2001).

3.5. Resultados.

Los datos obtenidos en la caracterización morfológica para los 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia se pueden observar en el anexo A, B y C). En la figura 3-11 se presenta el registro fotográfico de algunos de los cultivares caracterizados representativos de los municipios muestreados.

3.5.1. Caracterización morfológica y variables del paisaje.

Los resultados obtenidos en el análisis descriptivo de los caracteres continuos se puede observar en la tabla 3-5.

Tabla 3-5. Análisis descriptivo de caracteres continuos correspondientes a los 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia.

Variable	Promedio	Minimo	Maximo	Desv. Est.	Coef. Var.
Altura sobre el nivel del mar	2015,11	864	2281	242,79	12,05
Altura del árbol	13,05	1,8	25,7	4,66	35,72
Ancho copa N-S	8,58	1,0	20,0	3,96	46,17
Ancho de copa,(m), N,S,x,Or,Oc	8,66	1,0	22,0	4,18	48,29
Circunferencia del tronco,	117,79	19,0	234,0	45,45	38,59
Longitud entrenudos vástagos,(cm)	0,62	0,234	1,428	0,25	39,62
Diámetro vástagos (cm)	0,48	0,29	1,04	0,10	21,01
Longitud hoja (cm)	18,58	9,80	30,80	4,12	22,15
Ancho max (cm)	8,78	4,70	14,50	2,08	23,64
Numero venas Pimarias (Pares)	7,44	1,00	16,00	3,68	49,42
Divergencia venas secundarias grados	41,52	30,00	60,00	6,05	14,57

Figura 3- 11. A. Muestra de cultivares representativos del Oriente antioqueño subregión Páramo.

Cultivar 300 Sonsón

Cultivar 413 Abejorral

Figura 3-11. B. Muestra de cultivares representativos del Oriente antioqueño subregión Altiplano.

Cultivar 01 El Retiro

Cultivar 62 Marinilla

Figura 3-12. B. Muestra de cultivares representativos del Oriente antioqueño subregión Altiplano.

Cultivar 204 Rionegro

Cultivar 147 La Ceja

Cultivar 35 San Vicente

Figura 3-11. C: Muestra de cultivares representativos del Suroeste antioqueño.

Cultivar 109 Caramanta

Cultivar 100 Valparaíso

Cultivar 280 Montebello

Cultivar 04 Santa Bárbara

El análisis descriptivo mostro una variación media alta en la mayoría de las caracteres medidos en las poblaciones de aguacates criollos de Antioquia (Tabla 3-5). Las características que mostraron mayor coeficiente de variación fueron: número de venas primarias (49,42%) ancho de la copa (48,29%), longitud entrenudos vástagos (39,62%), circunferencia del tronco (38,59%), altura del árbol (35,72). Las características que presentaron menor coeficiente de variación fueron la altura sobre el nivel del mar (12,05%) seguida de la divergencia de venas secundarias (14.57%).

Con relación a los caracteres categóricos los que más predominaron en los aguacates criollos de Antioquia analizados fueron los siguientes: para la variable forma del árbol la que más predomino en los 90 árboles fue la forma irregular, la cual estuvo presente en el 41,8% de los aguacates, seguida por la forma circular con el 26,4%, para la superficie del tronco el 58,2% presentaron la superficie rugosa seguidos por la superficie muy rugosa con el 25,3%, el patrón de ramificación en la combinación intensivo y extensivo fue el más común, presente en un 62,6% de los árboles seguido del intensivo con el 25,3%, la distribución de ramas más frecuente fue la irregular con el 85,7% seguida de la ascendente con el 9,9%, para la inserción del ángulo de la rama, el 97,8 de los arboles presentaron el ángulo agudo y el 2,2% el ángulo obtuso, en cuento al color de la rama joven el que más predomino fue el verde con el 96,7% seguido del rojo con el 2,2%, para el margen de las hojas el 64,8% de los arboles presentaron el margen entero y el 35,2% el margen ondulado, la textura de la hoja semidura fue la más presente en un 75,8% seguida de la textura blanda con el 17,6%, la superficie de la rama joven fue pubescente para el 69,2 de los árboles y glabra para el 30,8% restante, la forma de la hoja oval predomino con el 45,1% seguida por la forma obovada angosta, la pubescencia del haz fue escasa para el 97,8% de los árboles e intermedia para los 2,2% restantes, muy similar a la pubescencia del envés, la cual fue escasa para el 92,3 % e intermedia para el 7,7%, el ángulo de inserción del peciolo foliar fue agudo para el 100% de los aguacates criollos analizados, para la forma del ápice de la hoja el 60,4 de los arboles presentaron la forma aguda y el 23,1 la forma intermedia y para la forma de la base de la hoja el 93,4% presento la forma aguda y el 6,6% restante la forma obtusa. Para la variable del paisaje topografía las más frecuentes fueron colinado (del 16 al 30% de pendiente) y montañoso (> al 30% de pendiente) con el 25,3% y 24,2 % respectivamente. Los resultados de los análisis de frecuencia se pueden observar en el anexo D.

3.5.2. Análisis de componentes principales (PCA) para caracterización morfológica y variables del paisaje.

El análisis de datos morfológicos y del paisaje realizados en los 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia con el uso de un análisis de componentes principales (PCA) produjo un porcentaje de variación del componente principal 1 de 96%, siendo la variable altura sobre el nivel del mar la de mayor peso sobre este eje y del componente principal 2 del 4%. Con éste análisis de PCA se produjeron tres agrupaciones: La primera agrupó arboles encontrados en altitudes entre 800 a 1900 m. s. n. m e incluyó a los municipios de Abejorral, El Retiro, Sonsón, Santa Bárbara y Valparaíso. La segunda agrupación incluyó arboles ubicados entre los 2000 a 2100 m. s. n. m por lo que éstos árboles se encontraron en los municipios de Caramanta, La Ceja y Sonsón y la tercera agrupación tuvo en cuenta arboles entre los 2300 a 2400 m. s. n. m muestreados en los municipios de La Ceja, Marinilla, Sonsón, San Vicente y El Retiro (Figura 3-12). Algunos municipios se encontraron en común entre estas agrupaciones debido a que los muestreos se realizaron en un rango de altitudes estrecho, sin embargo estos resultados demuestran que la altitud influye de alguna manera en la adaptación de los árboles en el departamento de Antioquia, puesto que éste análisis tuvo adicionalmente en cuenta caracteres morfológicos entre ellos: altura del árbol, ancho de la copa, forma del árbol, superficie del tronco, distribución de las ramas, color de las hojas (haz, envés), entre otros.

Por otro lado, el análisis de clúster producido con la distancia Euclidiana de los datos morfológicos y de elevación también produjo 3 agrupaciones. La primera agrupación incluyó arboles colectados entre los 800 a 1900 m. s. n. m, la segunda agrupación, arboles colectados entre los 2000 a 2200 m. s. n. m y la tercera arboles ubicados entre 2200 a 2300 m. s. n. m. Este análisis coincidió con los resultados arrojados por el PCA, sin embargo hubo más sobre-lapamiento entre los municipios muestreados, esto dado que todos se encuentran cercanamente ubicados en Antioquia (Figura 3-13).

Figura 3- 12. Análisis de componentes principales de los datos morfológicos tomados en 90 árboles criollos y sus elevaciones.

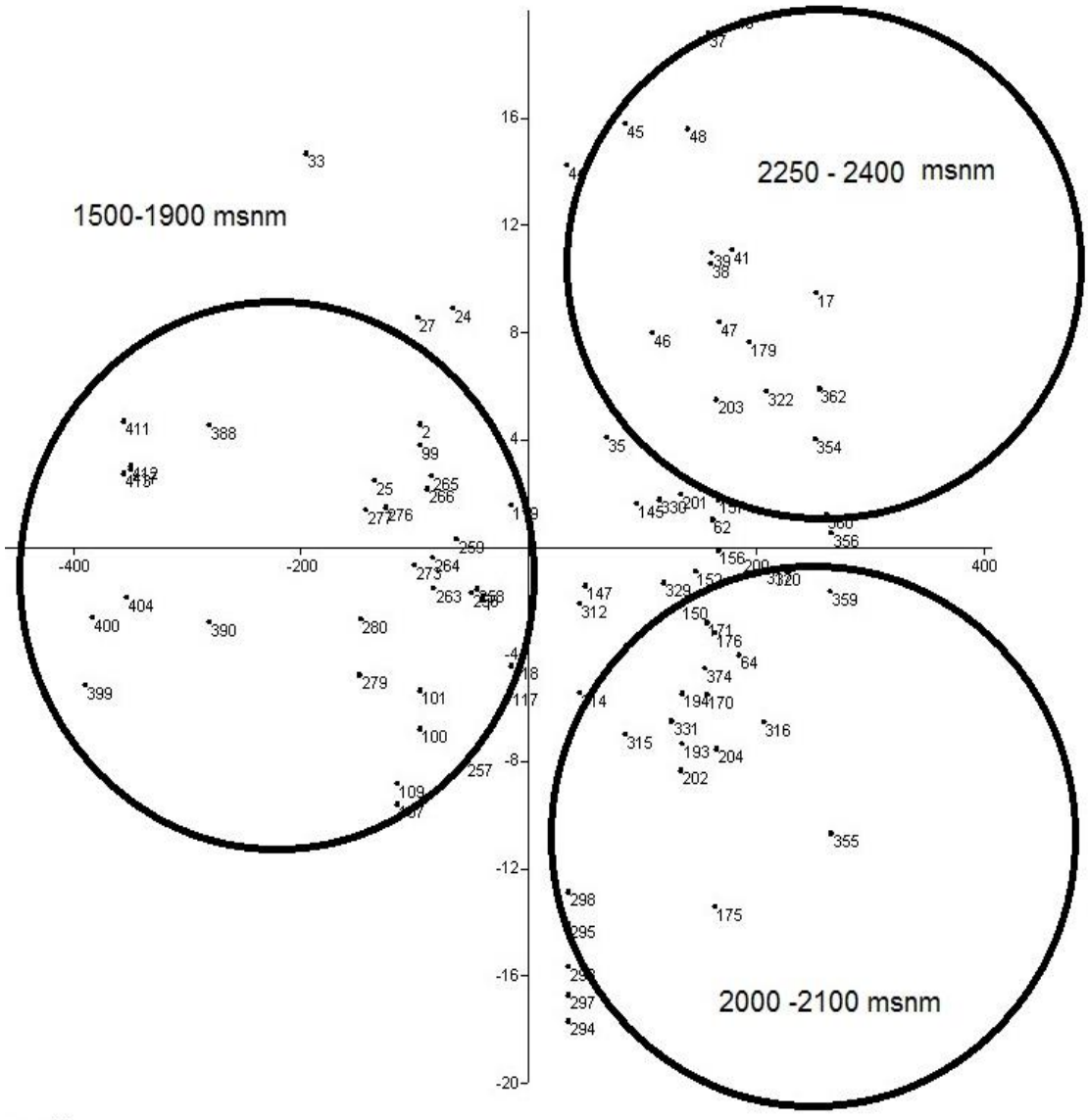
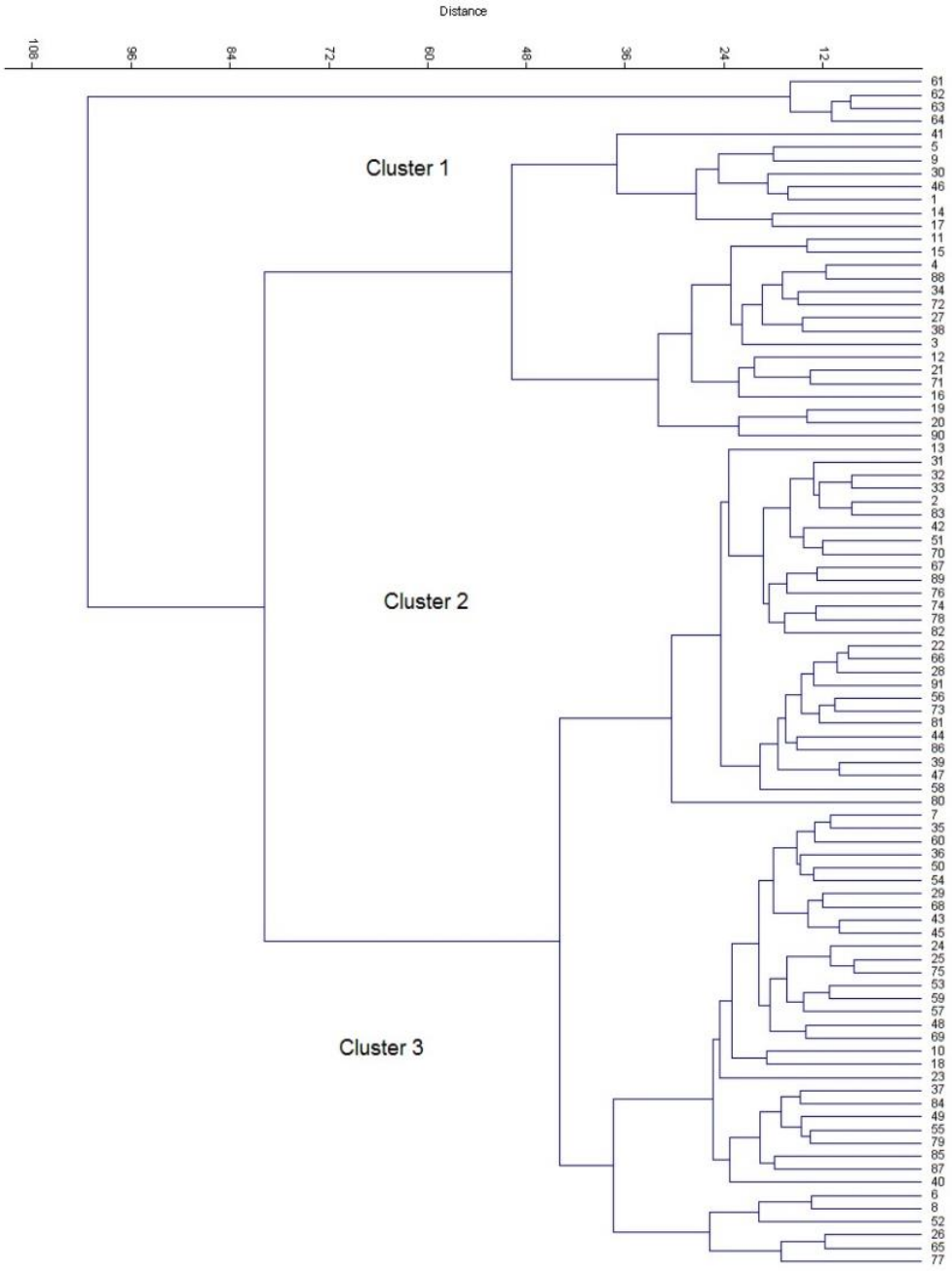


Figura 3- 13. Análisis de clúster con distancias Euclidianas de los datos morfológicos tomados en 90 árboles criollos y sus elevaciones.



3.5.3. Análisis conjunto caracterización morfológica y molecular.

Cuando se unieron los datos morfológicos con los datos moleculares provenientes de los marcadores microsatélites y elevaciones y se realizó un análisis de componente principal (PCA), se encontró de nuevo la formación de tres agrupaciones de árboles de aguacate. La primera agrupación estuvo compuesta por individuos muestreados en los municipios de Abejorral, Montebello y Santa Bárbara, los cuales se encuentran ubicados entre los 800 a 1900 m. s. n. m. La segunda agrupación incorporó árboles de Caramanta, Sonsón, El Retiro y Rionegro ubicados entre los 2000 a 2200 m. s. n. m. y la tercera incluyó árboles de aguacate encontrados en Valparaíso, Caramanta, La Ceja y Sonsón, con altitudes desde los 2300 a 2400 m. s. n. m. (Figura 3-14).

Adicionalmente, el análisis de clúster realizado con el algoritmo de Ward (Figura 3-15) produjo un dendrograma que separó los individuos de aguacate genotipificados con 14 microsatélites y evaluados morfológicamente con sus elevaciones en tres agrupaciones. La primera agrupación incluyó muestras tomadas en los municipios de Sonsón, San Vicente y La Ceja en altitudes entre 2000 a 2300 m. s. n. m. La segunda, arboles evaluados en los municipios de Caramanta, Marinilla y Valparaiso entre los 1900 a 2000 m. s. n. m y la tercera agrupación incluyó arboles colectados en Montebello y Abejorral entre los 800 a 1900 m. s. n. m.

Finalmente, un análisis de componente principal (PCA) y un análisis de clúster fueron realizados en ausencia de los datos de las elevaciones para determinar la relación directa entre los datos morfológicos y moleculares de los 90 árboles de aguacate evaluados (Figuras 3-16 y 3-17). Ambos análisis coincidieron en producir dos clusters. El primero, incluyó muestras de aguacate de los municipios de San Vicente, Marinilla, Valparaiso, La Ceja, Rio Negro y Santa Bárbara, los cuales se encuentran entre los 800 a 2200 m. s. n. m. El segundo clúster incluyó muestras de Montebello, Caramanta, Sonsón y Abejorral, ubicadas entre los 1600 a 2300 m. s. n. m.

Figura 3- 14. Análisis de componentes principales de los datos morfológicos y moleculares tomados en 90 árboles criollos y sus elevaciones.

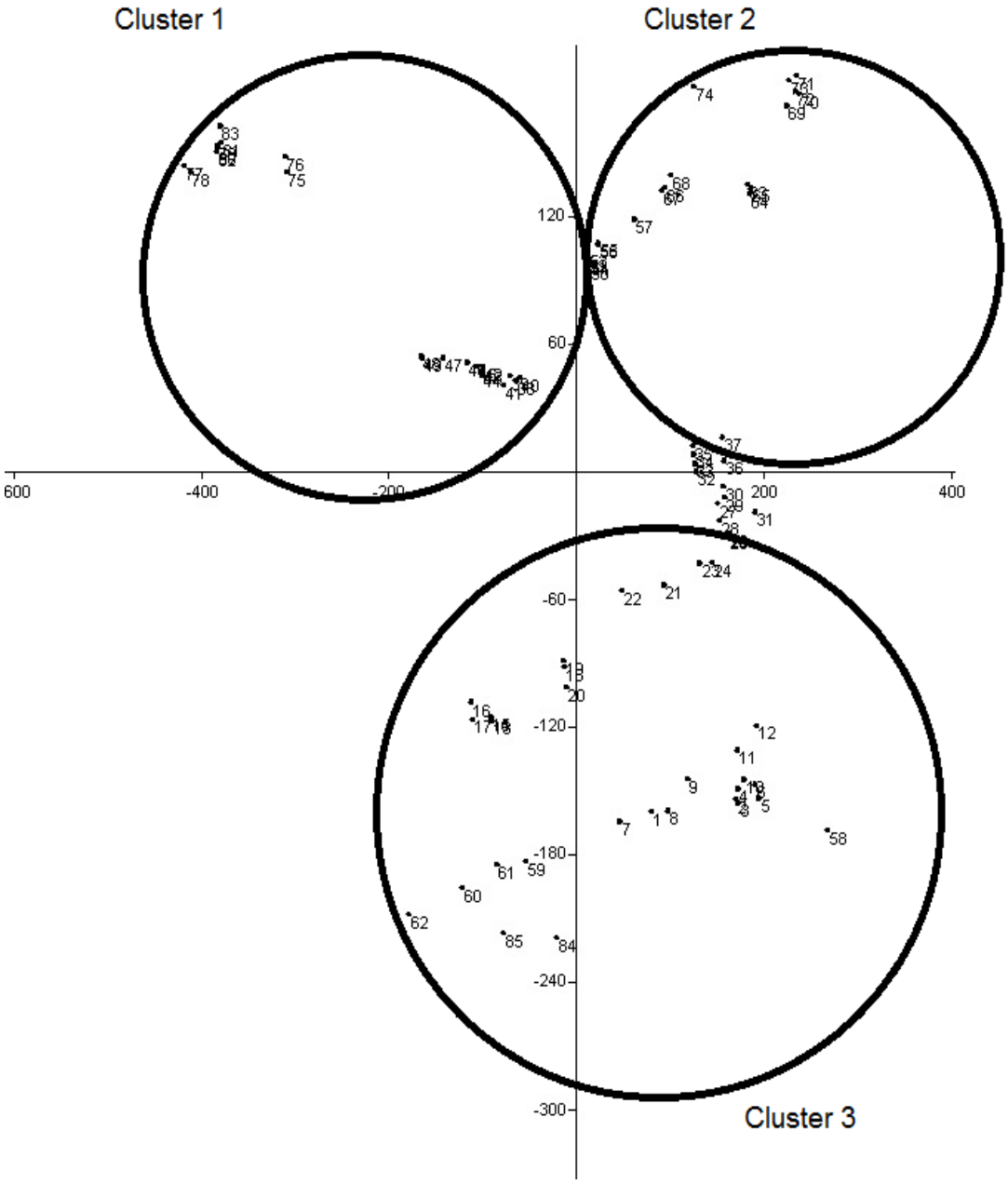


Figura 3- 15. Análisis de clúster con el algoritmo de Ward de los datos morfológicos tomados en 90 aguacates criollos y sus elevaciones.

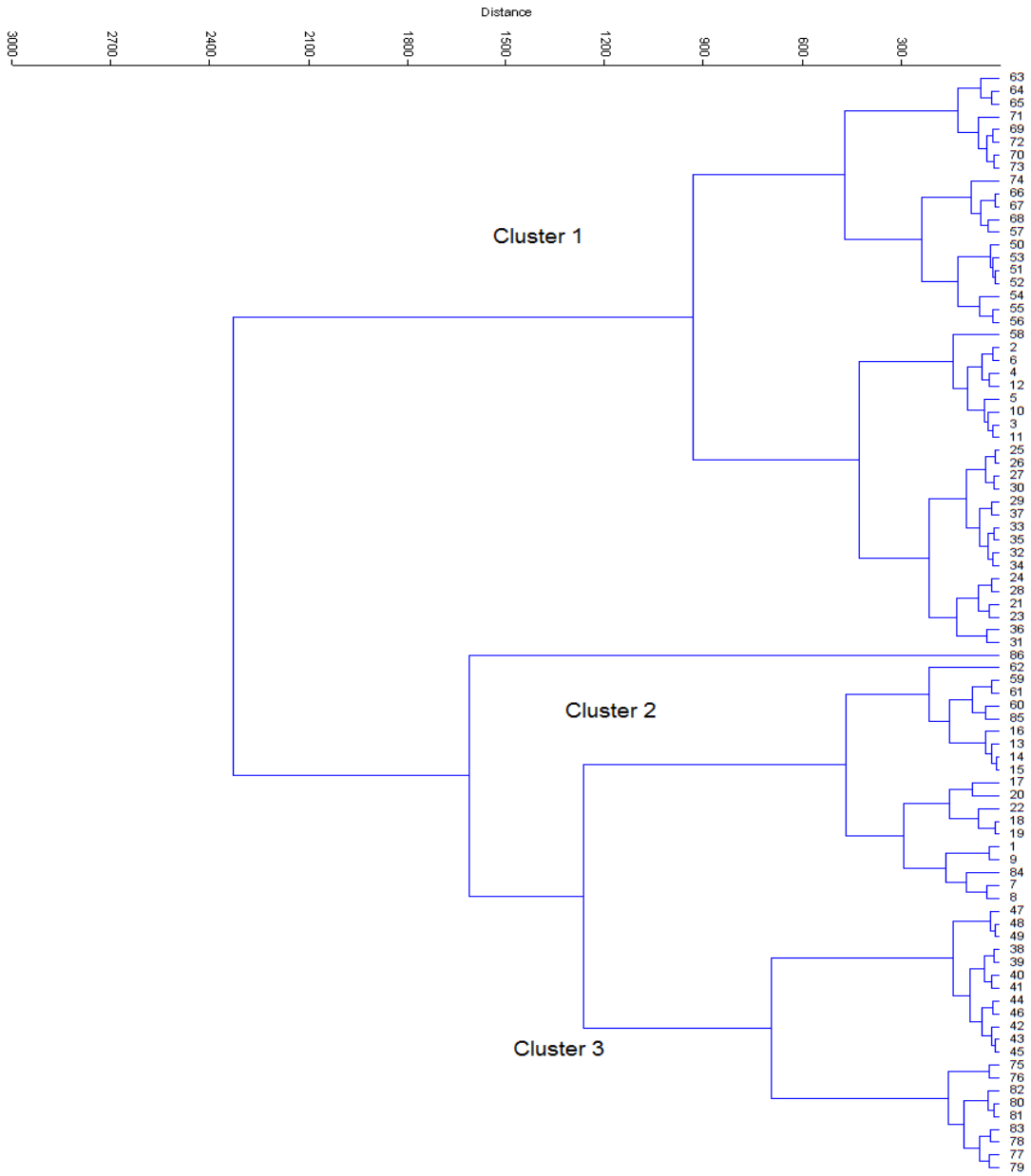


Figura 3- 16. Análisis de componentes principales de los datos morfológicos tomados en 90 aguacates criollos.

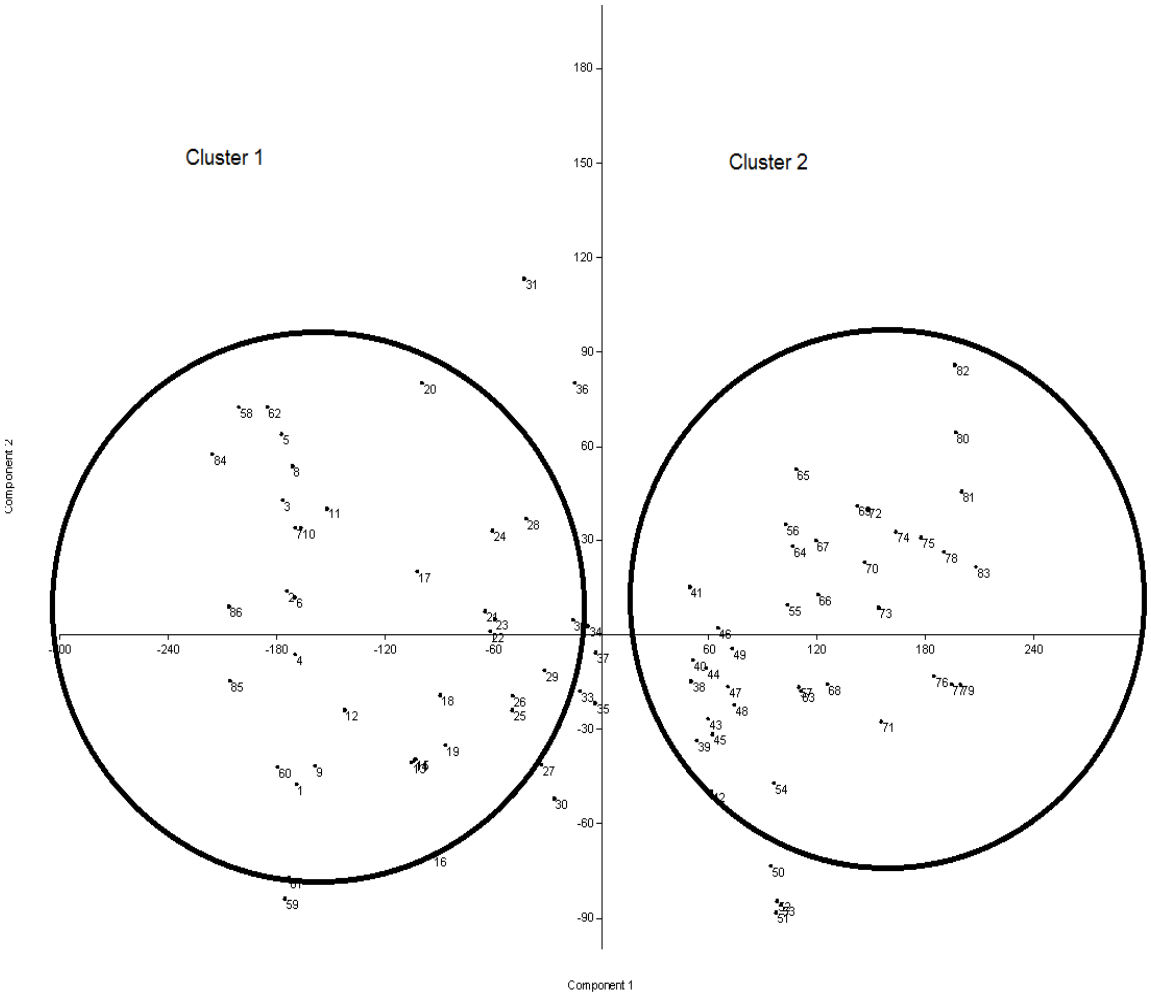
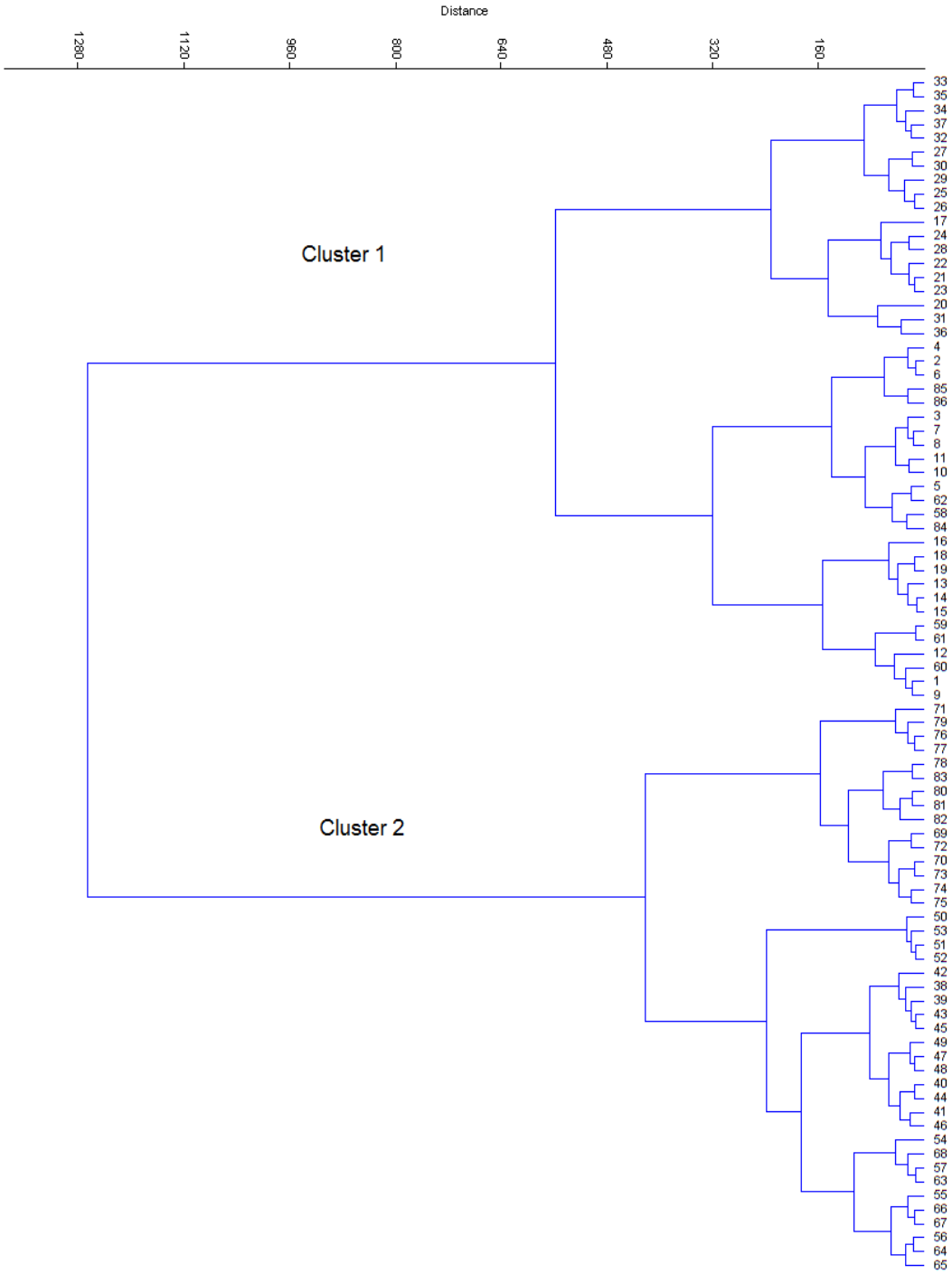


Figura 3- 17. Análisis de clúster con el algoritmo de Ward de los datos morfológicos tomados en 90 aguacates criollos.



3.5.4. Correlación entre variabilidad genética y variables del paisaje (altitud y topografía).

Los resultados arrojados de la correlación de Pearson realizada entre la Heterocigosidad esperada por localidad de los 14 microsatélites vs la topografía promedio y la elevación promedio por cada municipio muestreado para los 90 árboles de aguacate criollo mostraron valores contrastantes de correlación y significancia puesto que no se encontró asociación significativa entre la heterocigosidad esperada y la topografía de cada localidad (Figura 3-18), ya que r = -0.2893, p = 0.3886, mientras que si hubo una asociación significativa entre la heterocigosidad esperada y la elevación de cada localidad puesto que r = 0.7112 y p = 0.014029, indicando que a mayor altitud, mayor heterocigosidad esperada en los aguacates criollos del departamento de Antioquia (Figura 3-19).

Figura 3- 18. Correlación de Pearson entre la heterocigosidad esperada y el promedio topográfico de cada municipio muestreado del departamento de Antioquia.

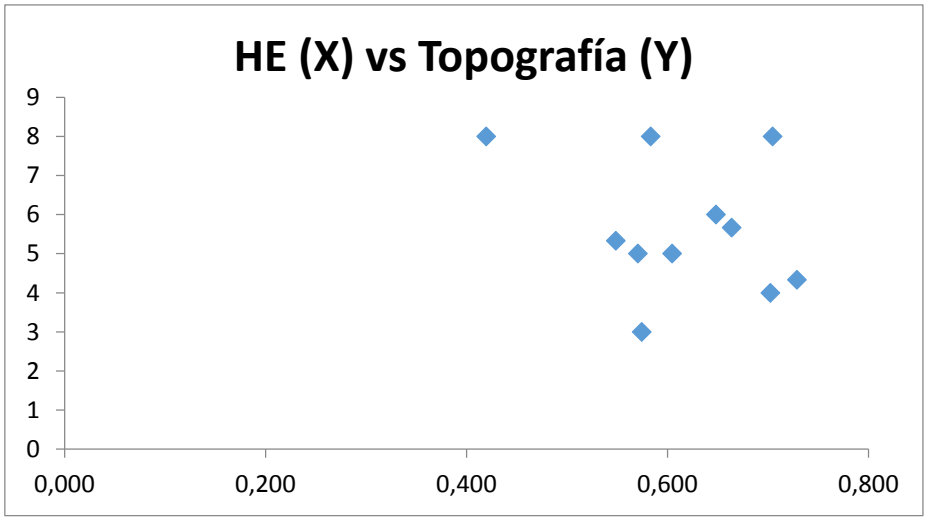
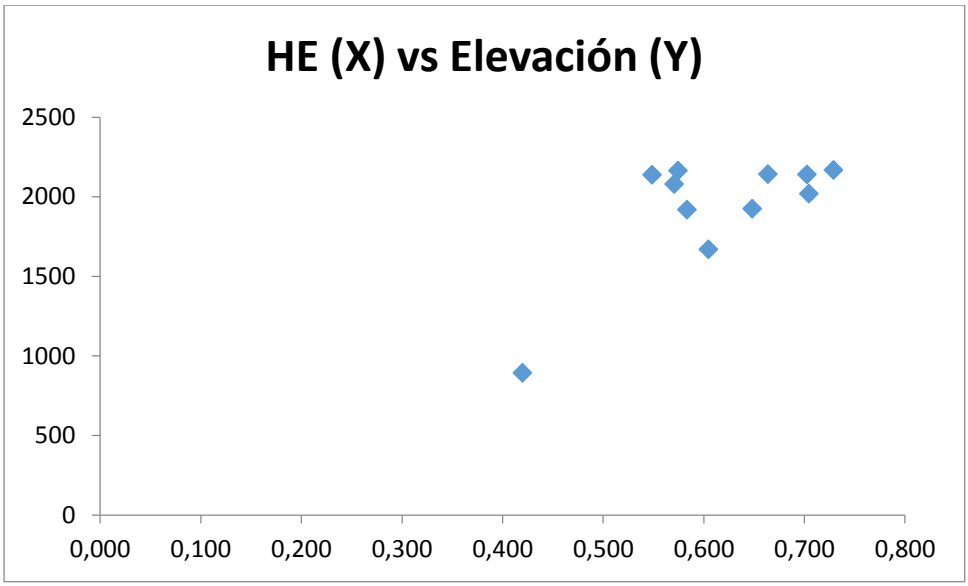


Figura 3- 19. Correlación de Pearson entre la heterocigosidad esperada y el promedio de la elevación de cada municipio muestreado del departamento de Antioquia.



3.6. Discusión.

Los árboles de aguacate criollo son producto de múltiples hibridaciones entre las tres razas de aguacate conocidas hoy en día y por ello el uso de caracteres morfológicos para su clasificación dificulta el establecimiento de diferencias marcadas entre sus individuos y poblaciones (Alcaraz y Hormaza 2007). Por ello, el uso de marcadores moleculares se hace indispensable ya que adicionan información que mejora la identificación y clasificación de sus poblaciones (Alcaraz y Hormaza 2007, Gross German y Viruel 2013).

Con relación a los caracteres morfológicos de tipo continuo evaluados para los 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia seleccionados para este estudio, presentaron coeficientes de variación en un rango del 12,05% a 49,42%, indicando que existe una variación de media a alta elevada de los arboles analizados para la gran mayoría de las características medidas; esto teniendo en cuenta el criterio de varios investigadores que han considerado que los coeficientes de variación superiores al 20% indican la presencia de variación elevada dentro de las poblaciones vegetales (Montes-Hernández et al. 2017).

Uno de los principales caracteres que diferencian las razas botánicas del aguacate son el clima y la altitud a las que se adaptan; sin embargo existen también algunos caracteres morfológicos que las distinguen, principalmente del fruto. Durante la ejecución de este estudio no fue posible medir variables del fruto en los aguacates criollos antioqueños, lo que posiblemente nos hubiera suministrado más información para llegar a determina o tener una aproximación de la identificación racial de los aguacates estudiados, pero existen otros caracteres morfológicos de tallo y hoja que están asociados con las razas botánicas, como por ejemplo el tamaño de las hojas. Según Barrientos – Priego y López –López (2000) la raza Mexicana presenta hojas de tamaño pequeño, la raza Guatemalteca hojas de tamaño intermedio y la raza Antillana hojas de tamaño grande. El promedio en la longitud de la hoja de los arboles analizados en el presente capitulo fue de 18,58 cm con un valor mínimo de 9,80 cm y máximo de 30,80 cm y de ancho de la hoja el promedio fue de 8,78 cm con un valor mínimo de 4,70 cm y máximo de 14, 50 cm. El árbol con el código 176 ubicado en el municipio de Rionegro fue el que presento el mayor tamaño de hoja de todos los arboles evaluados con una longitud de 30,8 cm y ancho de 14,1 cm; lo que indicaría que de acuerdo a esta característica morfológica se podría asociar con la raza

Antillana; sin embargo este árbol se encontraba ubicado a una altitud de 2.179 m.s.n.m la cual es característica de adaptación para aguacates de la raza Mexicana.

Otro de los caracteres morfológicos reportados por Barrientos – Priego y López –López (2000) diferente al fruto para distinguir entre razas botánicas es la superficie del tronco; en donde para las razas Mexicana y Guatemalteca esta es lisa y para la raza Antillana es rugosa. El 58,2% de los aguacates criollos analizados presento la superficie del tronco rugosa y el 25,3% muy rugosa, es decir, el 83,5% de los aguacates criollos analizados presento la superficie del tronco rugosa como los aguacates de la raza Antillana; sin embargo el rango de altitud de la ubicación de los árboles que presentaron el tronco rugoso estuvo entre los 864 m.s.n.m hasta 2.281 m.s.n.m, abarcando las altitudes de adaptación para las tres razas botánicas del aguacate.

Los resultados encontrados en los árboles de aguacate criollo de Antioquia con referencia a los caracteres morfológicos tamaño de la hoja y superficie del tronco, corroboran lo dicho por Alcaraz y Hormaza (2007) quienes afirman que los árboles de aguacate criollo son producto de múltiples hibridaciones entre las tres razas de aguacate conocidas hoy en día y por ello el uso de caracteres morfológicos para su clasificación dificulta el establecimiento de diferencias marcadas entre sus individuos y poblaciones.

En el presente capítulo se realizaron análisis de componentes principales (PCA), de clusters o dendrogramas con algoritmos de Ward o distancias euclideanas y correlaciones vs (heterocigocidad esperada vs topografía o elevación) con el fin de poder elucidar la raza botánica a la cual pertenecen los aguacates criollos del departamento de Antioquia candidatos para su uso como portainjertos, mediante las relaciones existentes entre las variables del paisaje medidas (i. e. elevación, topografía) respecto a las variables morfológicas (i.e altura del árbol, diámetro del tronco, color de las hojas en el haz y envés, ancho de la copa, entre otras) y las variables moleculares (14 microsatélites).

Un primer análisis de componentes principales fue realizado teniendo en cuenta variables morfológicas del paisaje como topografía y altitud, encontrándose que la variable altitud fue la que dio mayor pesosa este análisis; por lo tanto esta variable fue determinante para los posteriores análisis de componentes principales que comprendieron adicionalmente variables moleculares.

Los resultados generales obtenidos mostraron que al tener en cuenta las variables de elevación (altitud) junto con los datos morfológicos y moleculares (microsatélites), se produjeron tres agrupaciones las cuales estuvieron conformadas por árboles muestreados en tres tipos de altitudes diferentes: 800 a 1900, 2000 a 2100 y 2200 a 2300 m. s. n. m. Estas tres agrupaciones coinciden más con las altitudes de adaptación de aguacates de las razas Guatemalteca y Mexicana (entre los 1000 a 2000 m. s. n. m para la raza Guatemalteca y 2000 m.s.n.m en adelante para la raza Mexicana (Barrientos y López-López 2002)); aunque algunos de los árboles de aguacate del grupo altitudinal de 800 a 1900 estuvieron localizados en la altitud de adaptación de la raza Antillana (por debajo de los 1000 m.s.n.m), lo que indica que posiblemente sean un híbrido entre la raza Guatemalteca y Antillana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez et al. (2000) y Rodríguez – Medina y colaboradores (2003) quienes realizaron la caracterización morfológica y bioquímica y morfológica, bioquímica y molecular respectivamente de cultivares de aguacate en Cuba, donde demostraron la efectividad de la combinación de estos marcadores para el agrupamiento de los cultivares de aguacate estudiados de acuerdo a su grupo ecológico.

Adicionalmente, cuando los datos de las elevaciones fueron retirados de los datos moleculares y morfológicos, se produjeron dos agrupaciones. Un primer grupo conformado principalmente por árboles de aguacate colectados en los municipios de Santa Bárbara, Caramanta, San Vicente, Marinilla y La Ceja y con un rango de altitud entre los 864 a 2268 m.s.n.m. Cabe anotar, que el rango amplio de altitud está dado por los cultivares de Santa Bárbara que fueron colectados entre los 864 y 894 m.s.n.m, el cual es característico de la raza Antillana; si no se tienen en cuenta estos dos árboles en este grupo el rango de altitud estaría entre los 1.820 a 2.268 m.s.n.m. El segundo grupo estuvo conformado por árboles de aguacate colectados principalmente de los municipios de Sonsón, Rionegro y Montebello y rangos de altitud entre 1.735 a 2.281 m.s.n.m. Estas agrupaciones hacen asumir que los árboles del grupo 1 pueden ser resultado de la hibridación entre las tres razas botánicas, mientras que los árboles del grupo 2 pueden ser el resultado de hibridaciones entre las razas Guatemalteca y Mexicana.

Finalmente, los análisis de correlación de Pearson fueron negativos y no significativos con la variable de topografía de la zona de muestreos, pero fueron positivos y significativos respecto a la elevación, sugiriendo que la heterocigosidad de la especie aumenta en la medida que aumenta la altitud. Esto indica que las poblaciones de aguacate antioqueño que se encuentran a mayor altitud, presentan más variabilidad genética. Estas poblaciones pueden ser una buena fuente de portainjertos en especial para el cultivar Hass; ya que fuera de su variabilidad genética se encuentran adaptados a condiciones de altitud y clima similares a las óptimas para el cultivo de el cultivar Hass que es predominantemente guatemalteco, pero con algunos genes mexicanos (Bernal et al. 2014). En Colombia su rango altitudinal óptimo va desde los 1.800 hasta los 2.000 m.s.n.m, que corresponden al clima frío moderado, y si las condiciones microclimáticas son buenas, se puede establecer hasta los 2.500 msnm (ICA, 2012).

Los resultados encontrados en este trabajo corroboran lo encontrado para el departamento de Antioquia en 111 árboles de aguacate genotipificados con 49 marcadores AFLP (Cañas-Gutiérrez et al. 2015) y los 14 microsatélites usados en el capítulos I y II de este estudio dado que ambos estudios demostraron con una análisis de varianza molecular (AMOVA) que las poblaciones de aguacate del departamento de Antioquia estaban genéticamente diferenciadas y que esta estructuración era significativa ya que a pesar de que los valores de F_{ST} estimados eran bajos los valores de significancia altos. Los análisis de AMOVA generaron tres agrupaciones genéticas que coinciden con las agrupaciones encontradas en los análisis realizados en este capítulo ya que se encontraron 3 grupos que estuvieron relacionados con diferentes zonas agro - climáticas de Antioquia dadas las diferencias en su elevación.

3.7. Conclusiones.

- Los arboles criollos del departamento de Antioquia evaluados en este estudio presentaron variación elevada en cuanto a caracteres morfológicos de árbol, rama y hoja de acuerdo a los coeficientes de variación de cada una de las variables estudiadas.

- Caracteres morfológicos del árbol y la hoja que han sido establecidos para distinguir entre razas botánicas, no fueron útiles en la identificación racial de los aguacates criollos de Antioquia.

- A pesar de la cercanía en las altitudes en que se encuentran los aguacates criollos evaluados en el presente capitulo; tanto los caracteres morfológicos como los moleculares diferenciaron los 90 árboles criollos de aguacate en tres poblaciones.

- Las poblaciones de aguacate de Antioquia que se encuentran ubicadas en mayores altitudes, presentaron mayor variabilidad genética; lo cual los hace candidatos a portainjertos del aguacate Hass, ya que se encuentran adaptados a las condiciones óptimas de clima y altitud de esta variedad.

3.8. Bibliografía.

Alcaraz, M. L. and Hormaza, J. I. (2007). Molecular Characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. Hereditas. 144: 244-253.

Ashworth, V.E. and Clegg, M.T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. Journal Heredity. 94:407–415.

Avalos, C.O. Quijada, J.L. Beltrán, M. (2006). Caracterización de los Aguacates Criollos (*Persea americana* Mill.) del Campus de la Universidad de el Salvador y la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agronómicas. Tesis de Pregrado. Facultad de ciencias Agronómicas, Universidad de el Salvador. San Salvador.

Avilán, L. (1980). El "índice de fructificación" en frutales perennes. Agronomía Tropical. Maracay, Venezuela 30(1-6): 147-157.

Barrientos-Priego, A.F. y López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate, en D. Téliz, H. González, J. Rodríguez y R. Dromundo (eds.), El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, México, pp. 19-31.

Barrientos, P. A. F. y López, L. L. (2002). Historia y genética del aguacate. Memoria 2002 de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. Coatepec de Harinas, México. 100-121 pp.

Bernal, J.A. y Díaz, C. (2014). Manejo del cultivo. En: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica; Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Cultivo de Aguacate. 2ª. Ed. Medellín, Colombia. pp. 10-151.

Bergh, B. O. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. California Avocado Society Yearbook. 76: 61-75.

Bergh, B. O. (1995). Avocado. In: Smartt, J. and Simmonds, N. W. (Eds). Evolution of crop plants. Longman Scientific and Technical. 240-245 pp.

Cañas-Gutiérrez, G.P. Galindo-López, L.F. Arango- Isaza, R.E. Saldamando-Benjumea, C.I. (2015). Diversidad genética de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Antioquia. Colombia. Agronomía Mesoamericana 26:129-143.

Chanderbali, A. S. Albert, V. A. Ashworth, V. E. T. M. Clegg, M. T. Litz, R. E. Soltis, D. E. Soltis, P. S. (2008). *Persea Americana* Mill. (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. BioEssays 30: 386-396

Chen, H. Morrell, P.L. Ashworth, V.E., De la Cruz, M. Clegg, M.T. (2009). Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. Journal of Heredity. 100: 56-65.

Engels, J.1979, L a documentación en centros de recursos fitogenéticos turrialba, Costa Rica, CATIE .12 P.

Galindo, M.E. Arzate, A.M. (2010). Consideraciones sobre el origen y primeras dispersiones del aguacate (*Persea americana* Mill, Lauraceae). Cuadernos de Biodiversidad 33: 11-15.

Garrido-Garduño, T. Vázquez- Domínguez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. Revista Mexicana de Biodiversidad. 84, 1031–1054.

Gross-German, E. Viruel, M.A. (2013). Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity population structure and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. Tree Genetics Genomes 9:539- 555.

Gutiérrez-Diez, A. Martínez de la Cerda, J. García-Zambrano, E.A. Iracheta-Donjuan, L. Ocampo-Morales, J.D. Cerda-Hurtado, I. (2009). Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 32: 9-18.

Hammer, O.D. Harper, A.T. Ryan, P.D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Paleontology. Electric. 4:1-9

Holderegger, R. Wagner, H. H. (2008). Landscape genetics. BioScience 58:199-207.

Holdridge, L.R. (1967). Life zone ecology. Tropical Science Center, San José, Costa Rica.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del guacate Hass (*Persea americana* Mill). Medidas para la temporada invernal. (http://www.ica.gov.co/getattachment/4b5b9b6f-ecfc-46e1-b9cab35cc1cefee2/-nbsp; Manejo-fitosanitario-del-cultivode-Aguacate.aspx) (Consulta 30 de mayo de 2018)

IPGRI. S/f. Diversidad, Conservación y uso sostenible de los recursos fitogenéticos de frutales nativos de América tropical informe final #ATN/SF4356.RG. Cali, Colombia .23 P.

IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). (1995). Descriptors for avocado (*Persea* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 58 p.

Knight, R.J. (2007). Historia, distribución y usos. En Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (Eds.). El Palto. Botánica, Producción y Usos. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Valparaíso, Chile. pp. 13-24.

López-Guzmán, G. Medina-Torres, R. Guillén-Andrade, H. Ramírez-Guerrero, L. Juárez-López, P. Ruelas-Hernández, P. (2015). Caracterización morfológica en genotipos nativos de aguacate (*Persea americana* Mill.) de clima tropical en Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Publicación especial número 11: 2157-2163.

Manel, S. Schwartz, M. Luikart, G. Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. - Trends in Ecology and Evolution. 18:189-197.

Matamoro-Castro, J.M. Rodríguez-Medina, N.N. Fuentes-Fiallo, V.R. Velázquez-Palenzuela, J.B. Vargas-Rodríguez, S.E. (2012). Caracterización de la colección cubana de aguacatero (*Persea americana* Mill.) del instituto de investigaciones en fruticultura tropical. Parte III. Hojas y brotes jóvenes. CitriFrut 29(2):12-20.

Mijares, P. López, L. (1998). Variedades de aguacate y su producción en México. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C., México.

Montes-Hernández, S. de la Torre-Vizcaino, J. Diego. Heredia-García, E. Hernández-Martínez, M. Camarena- Hernández, M. G. (2017). Caracterización morfológica de germoplasma de aguacate MEXICANO (*Persea americana* Mill. var. drymifolia, LAURACEAE). Interciencia, vol. 42, núm. 3, marzo, 2017, pp. 175-180.

Morales - Palacio, M. Morales, A. Artiles, A. Milián, Y. Espinosa López, G. (2016). Caracterización Fenotípica Y Genética DE Cuatro Especies Silvestres del Género *Solanum*, Sección *Lycopersicon* Cultivos Tropicales, vol. 37, núm. 3, pp. 109-119.

Reyes-Alemán, J.C. Ramírez-Mendoza, M. Flores-Ayala, F. Serrano-Hernández, M. Vázquez-García, L.M. Mejía-Carranza, J. Aguilar-Medel, S. Berdeja-Abreu, R. Espíndola-Barquera, M. (2015). Caracterización morfológica y molecular de germoplasma de aguacate en el centro de México. En: Actas. Recursos genéticos y manejo de viveros. VIII Congreso Mundial de la Palta 2015. Lima Perú. 115-120 pp.

Rodríguez, N. N., González, G. Simón, A. Lima, H. González, C. Jiménez, R. Mas, O. Morenza, M. (2000). Recursos genéticos del aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. II. Agrupación de cultivares en sus grupos ecológicos a través de marcadores morfológicos y bioquímicos. Citrifrut18 (1, 2 y 3): 23-32

Rodríguez-Medina, N. N. Rohde, W. González-Arencibia, C. Ramírez-Pérez, I. M. Fuentes-Lorenzo, J. L. Román-Gutiérrez, M. A. Xiqués-Martín, X. Becker, D. Velázquez-Palenzuela, J. B. (2003). Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. Actas V Congreso Mundial del Aguacate 2003. pp. 47-53.

Sork, V. L. Waits, L. (2010). Contributions of landscape genetics approaches, insights, and future potential. Molecular Ecology 19:3489-3495.

Soto, E. Avilán, l. Pérez, M. Rodríguez, M. Ruiz, J. (2007). Evaluación de aguacates criollos de aguacate (*Persea* spp) en la colección del INIA-CENIAP en Venezuela. En: Memorias VI congreso Mundial de Aguacate, Viña del Mar Chile, 2007.

Storey, W. B. Bergh; B. Zentmyer, G. A. (1986). The Origin, indigenous range and dissemination of the avocado. California Avocado Society Yearbook Vol. 70: 127-143.

Storfer, A. Murphy, M. A. Evans, J. S. Goldberg, C. S. Robinson, S. Spear, S. F. Dezzani, R. Delmelle, E. Vierling, L. Waits, L. P. (2007). Putting the landscape in landscape genetics. Heredity 98:129-142.

Storfer, A. Murphy, M. A Spear, S. F. Holderegger, R. Waits, L. (2010). Landscape genetics: where are we now? Molecular Ecology 19:3496-3514.

Wang, I. J. (2010). Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. Molecular Ecology 19:2605-2608.

Weising, K. Betermann, B. Ramser, J. Kahl, G. (1991). Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide proves complementary to simple VI-45repetitive DNA sequences. Electrophoresis 12:159- 169.

Whiley A.W. Schaffer, B. (1994). Avocado. In: Schaffer B, Andersen PC, eds. Handbook of environmental physiology of fruit crops, Volume 2. Subtropical and tropical crops. Boca Raton, Florida: CRC Press, 3–35.

Capitulo IV.

Búsqueda del origen y diversidad genética de aguacates criollos del departamento de Antioquia candidatos a portainjertos, mediante la secuenciación de genes nucleares.

4.1. Resumen.

El éxito de un cultivo comercial de aguacate (*Persea americana* Mill.) radica en la injertación de variedades comerciales de aceptación en el mercado, que sean seleccionadas del mismo huerto, zona o región, sobre portainjertos locales. Uno de los aspectos más importantes para formar una unión funcional entre la copa y el portainjerto, es que ambos estén lo suficientemente relacionados taxonómicamente, es decir, genéticamente. El aguacate exhibe tres razas hortícolas adaptadas a diferentes condiciones climáticas que han sido tradicionalmente reconocidas como *P. americana* "var. Drymifolia" (Schlecht. Y Cham)], *P. americana* "var. Guatemalensis" L. Wms.), *P. americana* "var. americana" Mill. Con el fin de determinar la diversidad genética presente en los aguacates criollos de zonas productoras de Antioquia, estimar la similitud genética existente con variedades comerciales de aguacate y tratar de identificar su origen; para estimar su potencial uso como portainjertos, se realizó la secuenciación directa de tres genes nucleares (endo-1-4-D-glucanasa (Celulasa), Chalcona sintasa (*CHS*) y serina-treonina-quinasa (*STK*) en aguacates criollos del departamento de Antioquia y su comparación con secuencias de estos mismos genes almacenadas en el GenBank de variedades comerciales y cultivares silvestres de diferentes orígenes en América. Las secuencias fueron utilizadas para hacer análisis de haplotipos, análisis de asignación bayesiana con STRUCTURE y filogenias con árboles de Máxima verosimilitud y bayesianos. Los resultados de haplotipos y análisis Bayesianos con STRUCTURE mostraron que los aguacates de Antioquia son genéticamente similares a las razas Guatemalteca y Mexicana, sugiriendo que se originaron a partir de estas razas. Los valores K obtenidos fueron K= 6 para Celulasa y *CHS* y K= 2 para *STK*. Una filogenia realizada con Mr. Bayes con 43 secuencias concatenadas, es decir, la unión de las secuencias obtenidas para los tres locus, produjo dos grupos: el primero estaba compuesto por haplotipos del GenBank y el segundo por haplotipos de cultivares de Antioquia. Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que los aguacates criollos de Antioquia presentan similitud genética con las razas botánicas Mexicana y Guatemalteca y su adaptación a altitudes entre los 1.700 a 2.200 m.s.n.m. los convierte en candidatos con potencial para uso como portainjertos del cultivar Hass

4.2. Introducción.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un importante cultivo subtropical originario de América central y México (Ashworth and Clegg, 2003). Esta especie pertenece al sub-genero *Persea* sp. la cual contiene otras dos especies, *P. schiedeana* (Nees) y *P. parviflora* (Williams) (Bergh and Ellstrand, 1986). En México, los primeros movimientos del aguacate nativo se produjeron desde Sierra Nevada en California (origen) hasta Mesoamérica por la dispersión de grandes mamíferos (Galindo y Arzate, 2010). Cuando el aguacate llegó al centro de México, se produjo una especie de radiación desde que un primer grupo de mamíferos migró a Guatemala, un segundo grupo al oeste de México, el cual llega al valle de Tehuacán y un tercer grupo a América del Norte y del Sur (Corona-Jacome et al. 2016). Esta radiación originó las tres principales razas de aguacate a través de la intervención humana, que son tradicionalmente conocidas como: mexicana [*P. americana* "var. drymifolia" (Schlecht. y Cham)], guatemalteca (*P. americana* "var. guatemalensis" L. Wms.), y antillana (*P. americana* "var. americana" Mill.) donde, esta última se originó en las Tierras Bajas Mayas cerca de Nuevo León, Zaragoza, Chocolá y Yucatán en México (Corona-Jacome et al. 2016). En las razas botánicas de aguacate se distinguen diferentes niveles como: morfológico, fisiológico y en sus características hortícolas (Bergh y Lahav, 1996) y se han adaptado a diferentes condiciones ecológicas, donde las dos primeras están adaptadas a condiciones más frías como climas mediterráneos y subtropicales, mientras que la antillana requiere de climas más cálidos o tropicales para su óptimo desarrollo (Schaffer et al. 2013). La mayoría de cultivares de aguacate de importancia económica son el resultado de la hibridación entre varias razas (Kinght, 2007 reportado por Bernal et al. 2014). Esta hibridación libre entre las razas ha generado un aumento en la diversidad genética en esta especie (Whiley y Shaffer, 1994 reportado por Bernal et al. 2014).

Las relaciones genéticas de los cultivares de aguacate han sido analizadas con diversos marcadores moleculares que incluyen isoenzimas (Torres and Bergh, 1978), minisatélites (Mhameed et al. 1997), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Fiedler et al. 1998), Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) (Davis et al. 1998), secuencias simples repetidas (SSRs) (Schnell et al. 2003; Ashworth and Clegg, 2003; Alcaraz and Hormaza, 2007; Gross-German and Viruel, 2013), polimorfismo de la longitud

del fragmento amplificado (AFLP) (Douhan et al. 2011; Cañas-Gutiérrez et al. 2015) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Chen et al. 2008, 2009). Estos estudios han mostrado una complejidad genética, debido a que el aguacate al ser una especie con polinización abierta facilita la segregación genética y por ende una gran variabilidad (Sánchez, 1999).

Una alternativa al uso de los marcadores moleculares tradicionales como los AFLP, RFLP, microsatélites, es la secuenciación de genes para realizar estudios de su diversidad nucleotídica ya que pueden proporcionar mayor información de lo que lo hacen los otros marcadores (Nei y Kummar, 2000); en el caso de las plantas, el marcador de elección ha sido el ADN del cloroplasto, ya que es haploide, se hereda por vía materna en las angiospermas y es estructuralmente estable (Freeland, 2005); sin embargo, en plantas, la tasa de mutación en el cloroplasto es baja comparada con el ADN nuclear, por lo cual los genes de cloroplastos han sido usados principalmente para inferir filogenias (Freeland 2005). La secuenciación del ADN nuclear es otra alternativa para analizar la diversidad nucleotidica y el grado de similitud genética al interior de una especie, como es el caso del aguacate (Chen et al. 2008, 2009). Los genes nucleares presentan ciertas ventajas respecto a los marcadores de cloroplasto como es la elevada tasa relativa de evolución en su secuencia (Freeland 2005). Varios estudios han revelado que las tasas de sustitución sinónimas de los genes nucleares son hasta cinco veces mayores que en los genes de cloroplasto (Wolfe et al. 1987; Gaut, 1998); esta ventaja se hace particularmente aguda a bajos niveles taxonómicos o entre linajes creados por eventos de rápida divergencia (Small et al. 1998; Cronn et al. 2002; Malcomber, 2002). Otra característica que presentan los genes nucleares es su herencia Mendeliana explícitamente biparental; a diferencia del genoma de cloroplasto el cual es usualmente de herencia uniparental, datos obtenidos de ADN de cloroplasto pueden decir solo la mitad de la historia en casos de hibridación puesto que no se recombina, por lo tanto los genes nucleares son candidatos ideales para la identificación de donantes parentales de híbridos o poliploides sospechosos (Wendel, 2003).

Estudios genéticos con genes nucleares han sido realizados en varias especies vegetales, como por ejemplo *Arabidopsis thaliana* (Aguade 2001; Nordborg et al. 2005 reportado por Chen et al. 2008), camelia (*Camellia flavida* Therace) (Wei et al. 2017), especies de manglar del género *Rhizophora* (Chen et al. 2015), en *Lumnitzera racemosa* y *Lumnitzera*

littorea otras dos especies de manglar (Guo et al. 2011), cebada silvestre (Lin et al. 2002; Morrell et al. 2003, 2005 reportado por Chen et al. 2008) y maíz (Gaut et al. 2000; Tiffin and Gaut, 2001a, 2001b reportado por Chen et al. 2008). Para el caso específico del aguacate (*P. americana* Mill), Chen y et al. (2008), estudiaron la diversidad nucleotídica y el desequilibrio de ligamiento en cultivares nativos de aguacate procedentes de México, Costa Rica, Ecuador y República Dominicana mediante la secuenciación de los genes Chalcona sintasa (*CHS),* Flavanona -3-Hidrolasa (*F3H),* Celulasa (endo-1,4-D-Glucanasa) y Serina-Treonona-Quinasa (*STK*). El gen *CHS* es uno de los genes regulatorios de la vía biosintética de los flavonoides y codifica para la enzima Chalcona sintasa, se cree que comparte un origen común con las sintasas de ácidos grasos del metabolismo primario (Verwoert et al. 1992); el gen *F3H* también pertenece a la familia de genes que intervienen en la vía biosintética de los flavonoides y su función es convertir la flavonona (2S) a dihidroflavonoles (2R, 3R), el cual es un intermediario directo en la biosíntesis de antocianidinas y flavonoles (Forkmann and Dangelmayr, 1980; Britsch et al. 1992, reportados por Chen et al. 2008); el gen celulasa está relacionado con la maduración de los frutos (Tucker et al. 1987) y el gen *STK* el cual está relacionado con resistencia a enfermedades en plantas (DiGaspero y Cipriani, 2003). Posteriormente en el 2009 Chen y colaboradores utilizaron nuevamente la secuenciación de estos cuatro genes con el fin de inferir la historia genética de 21 cultivares nativos de aguacate, usando un modelo basado en el programa STRUCTURE y el polimorfismo de nucleótidos y la comparación de las secuencias con 33 cultivares de aguacate de origen conocido, observando una diferenciación genética de 3 grupos geográficos en los cultivares nativos, los cuales correspondieron a las razas botánicas clásicas definidas para aguacate. Los estudios realizados en aguacate por Chen y colaboradores (2008 y 2009) se llevaron a cabo mediante la secuenciación del ADN utilizando “cebadores” alelo específicos (AS) posterior al hallazgo de alelos homocigotos y heterocigotos en cultivares de aguacate, donde los individuos heterocigotos produjeron un alto número de haplotipos (Clark, 1990) mientras que Wei et al. (2017), Chen et al. (2015) y Guo et al. (2011) realizaron secuenciación y detectaron heterocigosis en cromatogramas al observar picos dobles en sitios polimórficos (Wei et al. 2017; Guo et al. 2011) o utilizaron programas para el análisis de hibridación (FASE en Dnasp) (Chen et al. 2015).

Como ya se ha recalcado en los anteriores capítulos de este estudio, el éxito de un cultivo comercial de aguacate radica en la injertación de variedades comerciales de aceptación en el mercado, que sean seleccionadas del mismo huerto, zona o región, sobre portainjertos locales y que uno de los aspectos más importantes para formar una unión funcional entre la copa y el portainjerto, es que ambos estén lo suficientemente relacionados taxonómicamente, es decir, genéticamente. Por lo tanto el presente capitulo tiene como objetivo determinar la diversidad genética presente en los aguacates criollos de zonas productoras de Antioquia, estimar la similitud genética existente entre los aguacates criollos y variedades comerciales de aguacate y tratar de identificar el origen del aguacate criollo de Antioquia como aporte para el eventual mejoramiento genético de la especie en el departamento de Antioquia; mediante la secuenciación de tres genes nucleares (Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D- Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*); como una alternativa a la caracterización realizada con marcadores microsatélites.

4.3. Objetivos.

A. Estimar el número de subpoblaciones existentes de los aguacates criollos procedentes del departamento de Antioquia, y los cultivares de aguacate de diferentes variedades y orígenes reportados en el GenBank mediante un análisis bayesiano, basado en las secuencias nucléotidicas de los genes nucleares: Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D- Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*).

B. Establecer las relaciones ancestro-descendientes entre aguacates criollos del departamento de Antioquia y cultivares de aguacate de diferentes variedades y orígenes reportados en el GenBank, mediante la realización de filogenias de máxima verosimilitud y Bayesianas de secuencias de los genes nucleares Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D- Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*).

C. Evaluar la similitud genética existente entre aguacates criollos del departamento de Antioquia y cultivares de aguacate de diferentes variedades y orígenes reportados en el GenBank, a través de la identificación de haplotipos generados para cada uno de los genes nucleares evaluados (Chalcona sintasa (*CHS*), Celulasa (endo-1,4-D-Glucanasa) y Serina – Treonina – Kinasa (*STK*))

4.4. Materiales y métodos.

4.4.1. Material vegetal y extracción de ADN.

Para la secuenciación de los tres genes nucleares se utilizaron los aguacates criollos de Antioquia colectados entre los años 2009 a 2011. La información de estos cultivares puede observarse en la tabla 1-1 del capítulo I. El ADN genómico total de cada uno de los árboles de aguacate fue obtenido a partir de hojas jóvenes con el método de extracción estandarizado por Cañas-Gutiérrez et al. (2015).

4.4.2. Amplificación de ADN y secuenciación de genes nucleares.

Los cebadores para la amplificación de los genes nucleares Celulasa, Chalcona Sintasa y Serina –Treonina-kinasa fueron diseñados de acuerdo a regiones conservadas de las secuencias de estos genes en aguacate publicadas en el GenBank; y con la ayuda del programa Primer 3 Plus (http://primer3plus.com/). Las secuencias de cebadores para cada uno de los genes nucleares se muestran en la tabla 4-1. Las reacciones de amplificación contenían buffer 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM 150 KCl), 1.5 mM de cloruro de magnesio, 0.2 mM de cada dNTP (Thermo Scientific, Waltham, MA), 2 µM de cada primer, 1.5U de Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific), 50 ng del DNA blanco y la reacción fue completada con agua hasta un volumen de 25 µL. Lo ciclos de temperatura se realizaron en un Termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA), con una temperatura inicial de 95°C durante 3 min, seguido de 95°C durante 45 s, una temperatura de anillamiento de 57°C para los cebadores que amplifican el gen de la Celulasa y 58°C para los cebadores que amplifican Chalcona sintasa y Serina-Treonina-Kinasa durante 1 min, una temperatura de extensión de 72°C durante 5 min. La amplificación incluyo 35 ciclos con una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de amplificación (3µl) fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa del 1% tenido con GelRedTM y visualizado en un transiluminador UV. Las amplificaciones fueron purificadas y secuenciadas en Macrogen Inc., (Corea del sur) con un secuenciador ABI 168 3730XL (Perkin Elmer/Applied Biosystem, Foster City, CA) y usando los mismos cebadores que en las reacciones de PCR.

Tabla 4- 1. Secuencias de cebadores diseñados para la amplificación de los genes nucleares Celulasa, Chalcona Sintasa (CHS) y Serina –Treonina-kinasa (STK).

Gen nuclear	Primer	Secuencia
CHS	CHS1F	5'TGTGAAAGCGAGATCATCCA3'
	CHS1R	5'GTGCGCGATCCAAAACAAG3'
	CHS2F	5'TGTGAAAGCGAGATCATCCA3'
	CHS2R	5'TGCGCGATCCAAAACAAG3'
STK	STK1F	5'TAAAGGGGGAATTTTGATGC3'
	STK1R	5'TCTTGTTGTTGCTGCTGGTC3'
	STK2F	5'TAAAGGGGGAATTTTGATGC3'
	STK2R	5'AAATTTGAATTAGAGCGACTGTCC3'
Celulasa	CELLULASE 1F	5'TGAATTCAATCGGGACTCAG3'
	CELLULASE 1R	5'TGTTCCGGTCATCTGAGAAA3'
	2CELLULASE F	5'GTGAATTCAATCAGGACTCAGAAA3'
	2CELLULASE R	5'TGTTCCGGTCATCTGAGAAA3'

4.4.3. Edición de las secuencias obtenidas.

Las secuencias obtenidas (forward y reverse) para cada uno de los aguacates criollos antioqueños y los tres genes nucleares, fueron examinadas de forma visual con el fin de detectar la presencia de dobles picos en el mismo sitio polimórfico de acuerdo a lo reportado por Wei et al. (2017). Debido a que las secuencias analizadas son nucleares y la especie de estudio es diploide, las secuencias obtenidas pueden generar variaciones nucletodíticas de tal forma que producen genotipos homocigotos (nucleótido con un solo pico en el cromatograma) y genotipos heterocigotos (nucleótido con más de dos picos en el cromoatograma) (Clark 1990, Chen et al. 2008, Wei et al. 2017). Por esta razón, estas secuencias deben ser analizadas con cautela durante la realización del alineamiento (Wei et al. 2017; Chen et al. 2015). Estos análisis pueden ser llevadas a cabo manualmente como lo efectuaron Wei et al. (2017), Chen et al. (2015) en unas especies de manglar que son diploides, o pueden ser llevados a cabo en el programa Poliphred (Chen et al. 2008). En este trabajo, se evaluaron manualmente para poder dilucidar en qué lugar de la secuencia (posición del nucleótido) ocurría la heterocigosidad y si ésta se repetía entre secuencias. Esta evaluación fue preliminar a los estudios de polimorfismos de secuencias que se realizaron con posterioridad. Adicionalmente, puesto que Chen et al. (2008, 2009) solo reportan un solo haplotipo por secuencia de las variedades de aguacate que ellos analizaron con los tres genes nucleares *STK*; Celulasa y *CHS*, en este trabajo se tuvo en

cuenta un solo haplotipo por cada individuo (árbol de aguacate) analizado en Antioquia. Estos haplotipos consistieron en secuencias individuales que poseían los picos más altos en las posiciones donde se encontraron genotipos heterocigotos (doble pico), ya que si un individuo presenta heterocigosidad en varios nucleótidos, daría origen a varios haplotipos, puesto que consistirían en combinaciones de heterocigotos por posición como lo explica Clark (1990) por ejemplo: $AT^{G/C}G^{C/T}AC$, este caso dado puesto que hay dos sitios ambiguos, esta secuencia origina cuatro haplotipos. Posterior a esta observación, las secuencias fueron visualizadas y ajustadas manualmente usando el programa bioinformático Geneious 5.3.6 (Biomatters disponible en http://www.geneious.com).

El ajuste manual consistió en la eliminación de los extremos de las secuencias nucleotídicas y en la resolución de posiciones ambiguas con base en los cromatogramas. La integridad e identidad de las secuencias fue evaluada por individuo y por gen mediante un Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Una vez que ambas secuencias fueron ajustadas por individuo, estas fueron alineadas mediante el algoritmo Clustal W (Larkin et al. 2007). Las otras secuencias de *P. americana* que también fueron analizadas, fueron tomadas del GenBank con el fin de comparar la composición genética y variabilidad del aguacate antioqueño con cultivares silvestres de países como Costa Rica, Chile, Ecuador, Estados Unidos (variedades comerciales originadas de México), Guatemala, México y República Dominicana, los cuales fueron obtenidos por Chen et al. (2008) de colecciones de germoplasma de aguacate ubicadas en el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate, en Coatepec de Harinas e Ixtapan de la Sal en el Estado de México, México, y en el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Ganadera y algunos recolectados en el estado de Guanajuato, México. El material silvestre era originario de varios estados dentro de México, desde los estados centrales montañosos de Guanajuato y Querétaro hasta el estado costero oriental de Veracruz, y desde los estados del sur de Chiapas y Yucátan. También se obtuvieron accesiones de América Central (Costa Rica), América del Sur (Ecuador) y la República Dominicana (RD) en la isla caribeña de la Española (las muestras de RD fueron proporcionadas amablemente por J. Núñez). También variedades comerciales de raza botánica conocida. Las accesiones del GenBank de las secuencias correspondientes a los tres genes nucleares para los cultivares de aguacate de diversos orígenes y variedades comerciales utilizados en este estudio se pueden observar en la tabla 4- 2.

4.4.4. Análisis de secuencias.

La variación en la secuencia de ADN (Polimorfismo en la secuencia de ADN) para cada uno de los tres genes fue estimada con los siguientes parámetros: polimorfismo nucleotídico (θ), el cual está relacionado con la proporción de nucleótidos que se espera que sean polimórficos en cualquier muestra tomada del genoma de un organismo. Siendo θ= S/a1; donde a1= S 1/i y de igual forma i es n-1, donde n es el tamaño de la muestra (número de marcadores utilizados para el análisis y S es el número de fragmentos polimórficos generados por cada marcador (Hartl y Clark, 1997). También se calculó el grado de divergencia nucleotídica (π), el cual determina el promedio de la proporción de diferencias nucleotídicas entre todos los pares de secuencias, definido como Π = N/(p = N/(N-1)Σpipj pij, donde N es el número de secuencias analizadas; pi es la frecuencia de la secuencia "i", pj es la frecuencia de la secuencia "j"y pij es la proporción de nucleótidos que difieren entre las secuencias de ADN comparadas ith y jth (Nei y Kumar, 2000; Hedrick, 2004). Adicional a estos parámetros también se realizó el cálculo de los sitios segregantes (s), número de haplotipos (H) y Diversidad haplotipica (Hd) (Nei and Kummar, 2000). Todos los parámetros fueron obtenidos usando el programa DNAsp V5 (Librado y Rozas, 2009).

El análisis basado en el test de asignamiento poblacional STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) fue usado para evaluar la pertenencia más probable del grupo para cada cultivar de aguacate de todas las poblaciones para las secuencias concatenadas de los tres genes nucleares. Este programa se ejecutó para 150.000 pasos de la cadena Markov Monte Carlo con un periodo de burnin de 15.000 y replicas desde K=1 hasta K=10 considerando a) modelo de no mezcla, b) modelo de frecuencia alélica independiente; estos modelos fueron escogidos con el fin de seguir el procedimiento dado por Chen et al. (2009). Cada valor K fue calculado a partir de 10 corridas independientes. Cada nucleótido fue numéricamente codificado de la siguiente forma: A = 1, T = 2, C = 3 and G = 4 y los datos perdidos como -9. Se aplicó un filtro para la secuencia concatenadfa de los tres genes, de manera que se consideraron como SNPs el número total de sitios segregantes estimados en el programa DNAsp para cada locus. Un filtro similar fue utilizado por Chen et al. (2009). Esto se debió a que los SNPs únicos no fueron geográficamente informativos para estos autores.

Tabla 4- 2. Accesiones del GenBank correspondientes a cultivares de aguacate de México, Ecuador, Costa Rica, República Dominicana y Variedades comerciales utilizadas en este estudio y su asignación de raza de acuerdo a Chen et al (2009).

Nombre del Cultivar	Raza botánica	Procedencia	Número de la accesión en el GenBank		
			Celulasa	*STK*	*CHS*
Anaheim	G (99%)	USA	EU335565.1	EU335697.1	EU335611.1
Andes 4	G (95%)	Chile	EU335596.1	EU335738.1	
Arue	WI (99%)	Society Islands	EU335567.1	EU335739.1	EU335613.1
Bacon	G (94%)	Usa	EU335569.1	EU335699.1	EU335615.1
Daily 11	G (96%)	Usa	EU335597.1	EU335702.1	EU335617.1
Duke 6	M (100%)	México	EU335571.**1**	EU335740.1	EU335647.
Duke 7	M (99%)	México	EU335573.**1**	EU335704.1	EU335619.1
Esther	G (99%)	Guatemala	EU335575.**1**	EU335741.1	EU335621.1
Fuerte	M (99%)	México	EU335577.**1**	EU335705.1	
Gwen	G (99%)	M × G	EU335579.**1**	EU335707.1	EU335648.1
H287	M x G (57%, 43%)	M × G	EU335598.1	EU335743.1	EU335649.1
H670	M x G (50%, 50%)	M × G	EU335599.1	EU335744.1	EU335623.1
Hass	M x G (42%, 58%)	Usa	EU335600.1	EU335745.1	EU335625.1
HX48	M x G (53%, 47%)	M × G	EU335601.1	EU335746.1	EU335628.1
Khan	M (100%)	México	EU335602.1	EU335709.1	EU335650.1
Linda	G (99%)	Guatemala	EU335604.1	EU335711.1	EU335630.1
Lyon	M (99%)	Usa	EU335605.1	EU335713.1	EU335631.1
Mexicola	M (99%)	México	EU335581.1	EU335716.1	EU335632.1
Nabal	G (99%)	Guatemala	EU335606.1	EU335717.1	EU335651.1
Nimlioh	G (100%)	Guatemala	EU335607.1	EU335748.1	EU335635.1
Noga	M x G (71%, 29%)	M × G	EU335583.1	EU335720.1	EU335637.1
Pinkerton	G (98%)	M × G	EU335585.1	EU335722.1	EU335652.1
Puebla	M x G x WI (6%, 82%, 12%)	México	EU335587.1	EU335723.1	

Tabla 4-2: Continuación.

Nombre del Cultivar	Raza botánica	Procedencia	Número de la accesión en el GenBank		
			Celulasa	*STK*	*CHS*
Reed	G (100%)	Usa	EU335608.1	EU335749.1	EU335653.1
Thille	G (100%)	Usa	EU335589.1	EU335727.1	EU335639.1
Thomas	M (100%)	México	EU335591.1	EU335729.1	EU335654.1
Topa Topa	M (100%)	Usa	EU335609.1	EU335731.1	EU335642.1
Zutano	M x G (43%, 56%)	Usa	EU335593.1	EU335736.1	EU335645.1
Ch35	G	México	EU335462.1		EU335489.1
229	G	México	EU335454.1	EU335539.1	EU335482.1
46	M	México	EU335456.1	EU335556.1	
63	M	México	EU335458.1	EU335557.1	EU335486.1
65	M	México	EU335460.1	EU335539.1	
139	M	México	EU335470.1	EU335535.1	EU335506.1
244	M	México	EU335471.1	EU335555.1	EU335507.1
QRO1	M	México	EU335478.1	EU335562.1	EU335510.1
VER3	M	México	EU335480.1	EU335563.1	
VER16	M	México	EU335468.1	EU335551.1	EU335501.1
VER22	M	México	EU335479.1	EU335554.1	EU335502.1
Yu60	G	México	EU335481.1	EU335564.1	EU335504.1
Costa Rica	WI	Costa Rica	EU335474.1	EU335558.1	EU335491.1
Ecuador	M	Ecuador	EU335475.1	EU335547.1	EU335492.1
41	M	Ecuador	EU335472.1	EU335541.1	EU335484.1
JM1	WI	República Dominicana	EU335464.1	EU335559.1	EU335494.1
MB1	WI	República Dominicana	EU335476.1	EU335550.1	EU335509.1
MC1	WI	República Dominicana	EU335466.1	EU335560.1	EU335496.1
Ch3B	WI	República Dominicana	EU335473.1	EU335545.1	EU335508.1
MG1	WI	República Dominicana	EU335477.1	EU335561.1	EU335498.1

M: Mexicana, G: Guatemalteca, WI: Antillana

La probabilidad estimada de K (delta K) (Evanno et al. 2005) fue usada para estimar el número más probable de poblaciones (K) basado en la tasa de cambio de la probabilidad logarítmica de los datos [Ln Pr (X/K)]. Esta fue estimada con STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012). La gráfica fue obtenida con CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg 2007) and Distruct 1.1 (Rosenberg, 2004).

Finalmente, basados en las distancias de las secuencias concatenadas de los tres genes nucleares de 43 aguacates criollos antioqueños y cultivares nativos de Costa Rica, Chile, Ecuador, Estados Unidos (variedades comerciales originadas de México), Guatemala, México y República Dominicana y variedades comerciales de raza botánica conocida se construyó un dendograma de Máxima Verosimilitud (ML), con el programa Mega 7.0 (Kummar et al. 2016). Este árbol fue estimado después de obtener un modelo de sustitución nucleotidica (Nei and Kummar, 2000) con Jmodeltest (Posada, 2008) y boostrapping (500 réplicas) los cuales también fueron estimados con Mega 7.0 (Kummar et al. 2016) y también un árbol filogenético utilizando el progmama MrBayes v 3.2.0 (Ronquist et al. 2012) y técnica de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). Los análisis se realizaron con 10 millones de generaciones utilizando cuatro cadenas con muestreo cada 1000 generaciones. El árbol generado a través de este proceso se visualizó utilizando FigTree v1.4.0. Para la obtención de estos dos últimos árboles, no se pudo colocar un outgroup ya que no existen secuencias para estos tres genes en otras especies de plantas.

4.5. Resultados.

4.5.1. ADNs y secuencias de genes nucleares obtenidas.

Se obtuvo ADN de los 87 cultivares colectados en las subregiones Oriente antioqueño subregión paramo y altiplano y Suroeste antioqueño. Dentro de los 87 cultivares también se encontraban algunos cultivares de variedades comerciales como Hass, Reed y Fuerte. No todos los 87 cultivares pudieron ser amplificados y secuenciados para los tres genes nucleares (*Celulasa*, *STK* y *CHS*). El gen *Celulasa* fue amplificado y secuenciado en 50 de los 87 cultivares seleccionados, para el gen *CHS* se lograron amplificar y secuenciar 72 cultivares de los 87 seleccionados y para el gen *STK* 57 cultivares. En la tabla 4-3 (a, b y

c) se relacionan los cultivares de aguacate criollos del departamento de Antioquia que fueron obtenidos y analizados para cada gen.

La amplificación y edición final de las secuencias produjo para el gen Celulasa un fragmento de 995 pb, para el gen *CHS* un fragmento de 830 pb y para el gen *STK* un fragmento de 1115 pb. Los tamaños de los fragmentos obtenidos para cada gen y analizados en este capítulo fue de menor tamaño a los obtenidos por Chen et al (2008, 2009) en donde para el gen Celulasa obtuvieron y analizaron un fragmento de 1540 pb, para el gen *CHS* un fragmento de 1210 pb y para el gen *STK* un fragmento de 1398 pb.

4.5.2. Determinación de genotipos homocigotos y heterocigotos.

Como se mencionó con anterioridad, el análisis de secuencias en este capítulo se realizó con una especie diploide y los genes nucleares pueden presentar dos alelos por locus (Clark, 1990), se llevó a cabo la identificación de genotipos homocigotos y heterocigotos, para cada uno de los tres loci estudiados en los aguacates criollos provenientes del departamento de Antioquia de forma visual, analizando con detenimiento los cromatogramas resultantes de la secuenciación de cada locus, identificando la presencia de doble pico (heterocigoto) y los sitios variables que estos representan. En la figura 4-1 se muestra como ejemplo algunos heterocigotos encontrados en el gen *STK.*

De acuerdo al análisis visual realizado a los cromatogramas se encontró que para el locus *STK*, 28 de los 57 cultivares fueron heterocigotos, encontrándose variaciones en 12 posiciones de la secuencia (Tabla 4-4a y b); para el locus *CHS,* 31 de los 72 cultivares fueron heterocigotos con variaciones en 14 posiciones de la secuencia (Tabla 4-5) y para el locus *Celulasa* solo 10 de los 50 cultivares fueron heterocigotos con variaciones en 3 posiciones de la secuencia (Tabla 4-6), siendo este el que presentó el menor número de heterocigotos; este resultado es concordante con lo reportado por Chen et al (2008) quienes por la metodología de PCR alelo-especifica (AS) amplificaron e identificaron haplotipos para estos mismos loci en cultivares de México, Ecuador, Costa Rica y República Dominicana, encontrando que las dos terceras partes de los cultivares resultaron ser heterocigotos para estos mismos loci.

Figura 4- 1. Ejemplos de visualización de heterocigotos en cromatogramas.La figura A corresponde al locus STK del cultivar 446F-MARI y la figura B al locus STK del cultivar 176-RIO.

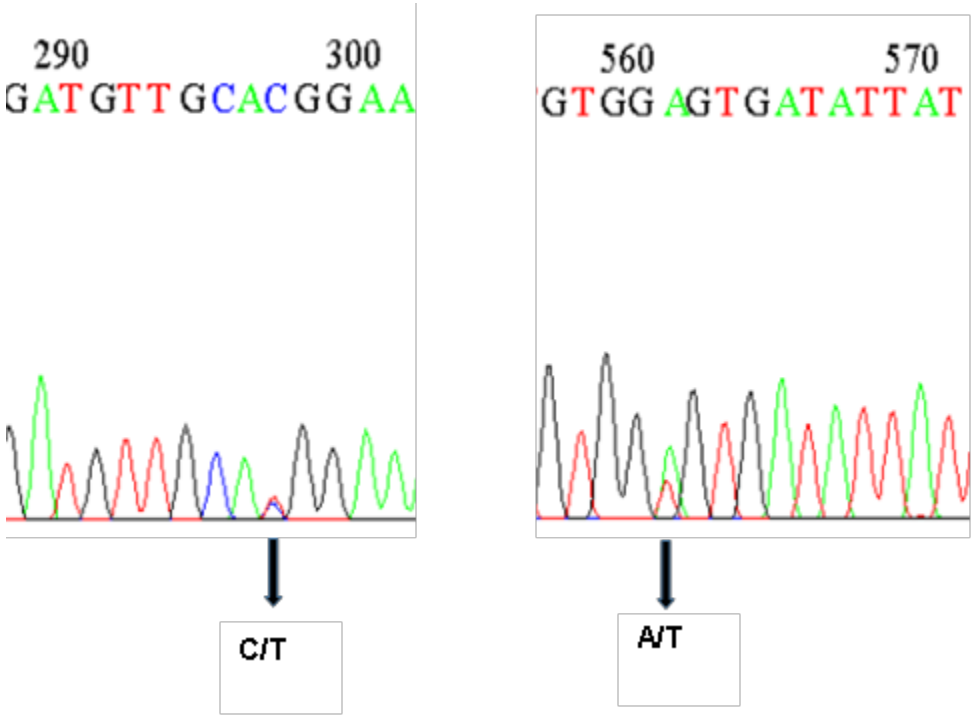


Tabla 4- 3. (a). Aguacates criollos del departamento de Antioquia analizados para el gen Celulasa.

Código cultivar	Localidad	Código cultivar	Código cultivar
CE-17-SON	Sonsón	CE-38-SV	San Vicente
CE-24-SON	Sonsón	CE-40-SV	San Vicente
CE-25-SON	Sonsón	CE-04-SB	Santa Bárbara
CE-33-SON	Sonsón	CE-44-MAR	Marinilla
CE-317-SON	Sonsón	CE-46-MAR	Marinilla
CE-322-SON	Sonsón	CE-47-MAR	Marinilla
CE-330-SON	Sonsón	CE-445-R-MAR	Marinilla
CE-360-SON	Sonsón	CE-446-F-MAR	Marinilla
CE-362-SON	Sonsón	CE-170-RIO	Rionegro
CE-19-R-SON	Sonsón	CE-171-RIO	Rionegro
CE-21-H-SON	Sonsón	CE-175-RIO	Rionegro
CE-29-H-SON	Sonsón	CE-176-RIO	Rionegro
CE-388-ABE	Abejorral	CE-428-H-RIO	Rionegro
CE-390-ABE	Abejorral	CE-257-MON	Montebello
CE-400-ABE	Abejorral	CE-264-MON	Montebello
CE-411-ABE	Abejorral	CE-265-MON	Montebello
CE-412-ABE	Abejorral	CE-258-MON	Montebello
CE-404-ABE	Abejorral	CE-263-MON	Montebello
CE-145-CEJ	La Ceja	CE-276-MON	Montebello
CE-147-CEJ	La Ceja	CE-256-MON	Montebello
CE-152-CEJ	La Ceja	CE-193-RET	El Retiro
CE-157-CEJ	La Ceja	CE-194-RET	El Retiro
CE-12-RCEJ	La Ceja	CE-100-VAL	Valparaiso
CE-35-SV	San Vicente	CE-118-CAR	Caramanta
CE-37-SV	San Vicente	CE-307-H-CAR	Caramanta

Tabla 4-3. (b): Aguacates criollos del departamento de Antioquia analizados para el gen *CHS*.

Código cultivar	Localidad	Código cultivar	Localidad
CH-19-R-SON	Sonsón	CH-44-MAR	Marinilla
CH-21-H-SON	Sonsón	CH-45-MAR	Marinilla
CH-29-H-SON	Sonsón	CH-46-MAR	Marinilla
CH-354-SON	Sonsón	CH-47-MAR	Marinilla
CH-354-SON	Sonsón	CH-64-MAR	Marinilla
CH-356-SON	Sonsón	CH-445-R-MAR	Marinilla
CH-331-SON	Sonsón	CH-446-F-MAR	Marinilla
CH-25-SON	Sonsón	CH-170-RIO	Rionegro
CH-27-SON	Sonsón	CH-175-RIO	Rionegro
CH-317-SON	Sonsón	CH-176-RIO	Rionegro
CH-322-SON	Sonsón	CH-201-RIO	Rionegro
CH-329-SON	Sonsón	CH-202-RIO	Rionegro
CH-330-SON	Sonsón	CH-204-RIO	Rionegro
CH-33-SON	Sonsón	CH-256-MONT	Montebello
CH-359-SON	Sonsón	CH-258-MONT	Montebello
CH-360-SON	Sonsón	CH-276-MONT	Montebello
CH-362-SON	Sonsón	CH-262-MONT	Montebello
CH-374-SON	Sonsón	CH-280-MONT	Montebello
CH-388-ABEJ	Abejorral	CH-263-MONT	Montebello
CH-399-ABEJ	Abejorral	CH-279-MONT	Montebello
CH-412-ABEJ	Abejorral	CH-259-MONT	Montebello
CH-390-ABEJ	Abejorral	CH-264-MONT	Montebello
CH-400-ABEJ	Abejorral	CH-179-RET	El Retiro
CH-404-ABEJ	Abejorral	CH-193-RET	El Retiro
CH-11-R-CEJ	La Ceja	CH-194-RET	El Retiro
CH-12-R-CEJ	La Ceja	CH-99-VAL	Valparaiso
CH-145-CEJ	La Ceja	CH-100-VAL	Valparaiso
CH-147-CEJ	La Ceja	CH-101-VAL	Valparaiso
CH-150-CEJ	La Ceja	CH-109-CAR	Caramanta
CH-152-CEJ	La Ceja	CH-117-CAR	Caramanta
CH-156-CEJ	La Ceja	CH-118-CAR	Caramanta
CH-157-CEJ	La Ceja	CH-119-CAR	Caramanta
CH-35-SV	San Vicente	CH-293-CAR	Caramanta
CH-37-SV	San Vicente	CH-307-H-CAR	Caramanta
CH-38-SV	San Vicente	CH-O4-SB	Santa Bárbara
CH-40-SV	San Vicente	CH-05-SB	Santa Bárbara

Tabla 4-3. (c): Aguacates criollos del departamento de Antioquia analizados para el gen *STK*.

Código cultivar	Localidad	Código cultivar	Localidad
STK-19RSON	Sonsón	STK-35-SV	San Vicente
STK-21H-SON	Sonsón	STK-37-SV	San Vicente
STK-24-SON	Sonsón	STK-38-SV	San Vicente
STK-25-SON	Sonsón	STK-40-SV	San Vicente
STK-27-SON	Sonsón	STK-44-MARI	Marinilla
STK-317-SON	Sonsón	STK-445-R-MARI	Marinilla
STK-322-SON	Sonsón	STK-446F-MARI	Marinilla
STK-329-SON	Sonsón	STK-170-RIO	Rionegro
STK-330-SON	Sonsón	STK-175-RIO	Rionegro
STK-331-SON	Sonsón	STK-176-RIO	Rionegro
STK-33-SON	Sonsón	STK-201-RIO	Rionegro
STK-354-SON	Sonsón	STK-202-RIO	Rionegro
STK-356-SON	Sonsón	STK-204-RIO	Rionegro
STK-359-SON	Sonsón	STK-428H-RIO	Rionegro
STK-360-SON	Sonsón	STK-256-MONT	Montebello
STK-362-SON	Sonsón	STK-259-MONT	Montebello
STK-388-ABE	Abejorral	STK-264-MONT	Montebello
STK-390-ABE	Abejorral	STK-266-MONT	Montebello
STK-399-ABE	Abejorral	STK-276-MONT	Montebello
STK-400-ABE	Abejorral	STK-279-MONT	Montebello
STK-404-ABE	Abejorral	STK-280-MONT	Montebello
STK-411-ABE	Abejorral	STK-179-RET	El Retiro
STK-412-ABE	Abejorral	STK-193-RET	El Retiro
STK-11R-CEJ	La Ceja	STK-100-VAL	Valparaiso
STK-12R-CEJ	La Ceja	STK-117-CARA	Caramanta
STK-150-CEJ	La Ceja	STK-118-CARA	Caramanta
STK-152-CEJ	La Ceja	STK-119-CARA	Caramanta
STK-157-CEJ	La Ceja	STK-293-CARA	Caramanta
		STK-05-SB	Santa Bárbara

Tabla 4- 4. Descripción de las posiciones de heterocigotos para el locus STK.

Posición locus	17	47	88	89	104	193	194	209	215	229	297	307
Código cultivar												
STK-05-SB			C/A						A/G	G/A		
STK-12R-CEJ												
STK-19RSON			C/A								G/A	
STK-24-SON										G/A		
STK-25-SON						T/C	C/T	C/T		G/A		
STK-37-SV												
STK-44-MARI										G/A		
STK-100-VAL										G/A		
STK-119-CARA												
STK-157-CEJ									A/G			
STK-170-RIO			C/A							G/A		
STK-176-RIO	C/A					T/C	C/T	C/T		G/A		
STK-201-RIO			C/A									
STK-202-RIO										G/A		
STK-204-RIO										G/A		
STK-256-MONT										G/A		
STK-259-MONT										G/A		
STK-266-MONT									A/G	G/A		
STK-317-SON										G/A		
STK-329-SON										G/A		
STK-330-SON												
STK-354-SON			C/A	T/A	G/A							
STK-362-SON										G/A		
STK-400-ABE										G/A		
STK-412-ABE			C/A									
STK-428H-RIO		T/C				T/C	C/T	C/T				G/T
STK-445-R-MARI			C/A									
STK-446F-MARI			C/A			C/T	C/T	C/T				

Tabla 4- 5. Descripción de las posiciones de heterocigotos para el locus *CHS*.

Posición locus	9	19	58	75	96	121	126	201	214	218	257	258	302	365
Código cultivar														
CH-05-SB	T/C													
CH-11-R-CEJ													G/C	
CH-12-R-CEJ		T/G			C/T									
CH-19-R-SON		T/G				G/A								
CH-21-H-SON						G/A			T/C	G/C	T/C	A/G		
CH-25-SON								A/T						
CH-27-SON						G/A								
CH-29-H-SON						G/A								
CH-35-SV						G/A		A/T						
CH-38-SV														T/C
CH-40-SV								A/T						
CH-44-MAR						G/A		A/T						
CH-46-MAR						G/A		A/T						
CH-47-MAR						G/A		A/T						
CH-118-CAR						G/A		A/T						
CH-145-CEJ													G/C	
CH-147-CEJ									T/C	G/C				
CH-157-CEJ						G/A		A/T						
CH-175-RIO						G/A								
CH-204-RIO						G/A		A/T						
CH-256-MONT						G/A								
CH-258-MONT			T/C	G/C									G/C	
CH-259-MONT						G/A								
CH-307-H-CAR						G/A			T/C	G/C				
CH-329-SON														T/C
CH-330-SON						G/A								
CH-331-SON						G/A		A/T						
CH-362-SON						G/A		A/T						
CH-399-ABEJ						G/A		A/T						
CH-445-R-MAR		T/G				G/A								
CH-446-F-MAR							G/C							

Tabla 4- 6. Descripción de las posiciones de heterocigotos para el locus Celulasa.

Posición locus	68	75	249
Código cultivar			
CE-25-SON		C/T	
CE-29-H-SON		C/T	
CE-37-SV		C/T	
CE-145-CEJ		C/T	
CE-152-CEJ		C/T	
CE-157-CEJ	A/T	C/T	C/G
CE-257-MON		C/T	
CE-258-MON		C/T	
CE-265-MON		C/T	
CE-404-ABE	A/T	C/T	C/G

4.5.3. Polimorfismo y diversidad nucleotídica.

Para el estudio de diversidad nucleotídica y posteriores análisis realizados con las secuencias de los tres genes amplificados, se analizó un solo haplotipo por individuo (árbol analizado), tomando como criterio de selección los haplotipos que presentaban el pico más alto. Estos haplotipos, fueron comparados con los haplotipos reportados en el GenBank por Chen et al (2008) y Chen et al (2009), quienes solo almacenaron un haplotipo y en muy pocos casos dos haplotipos por cultivar de aguacate.

El polimorfismo encontrado para cada uno de los tres genes nucleares se describe con los estadísticos de diversidad genética. Estos estadísticos fueron estimados para los aguacates criollos colectados en Antioquia y estos árboles en conjunto con los cultivares silvestres y variedades comerciales reportadas en el GenBank por Chen et al (2008) y Chen et al (2009). En la tabla 4-7 se resume los valores encontrados para los diferentes estimadores de diversidad genética para los tres genes nucleares analizados. El análisis relacionado con la presencia de sitios variables en la secuencia y diversidad nucleotídica fue realizado para los aguacates criollos del departamento de Antioquia, con el fin de poder compararlos con lo encontrado en aguacates silvestres de diversos países de origen y cultivares domesticados (variedades comerciales).

Para el locus *Celulasa* los estadísticos de diversidad genética fueron estimados a partir de un fragmento de 995 pb en 50 aguacates criollos de Antioquia; el número de sitios variables

fue de 81, valor mucho mayor al reportado por Chen et al (2008, 2009) quienes encontraron un número de sitios variables de 33 en 51 cultivares de aguacate entre nativos y variedades comerciales y a partir de un fragmento de 1.540 pb. En cuanto a la diversidad nucleotídica π, los aguacates criollos de Antioquia presentaron un valor de 0.00517, el cual también fue mayor al reportado por Chen et al (2008, 2009) el cual fue de 0.00293.

Tabla 4- 7. Resumen de estadísticos de diversidad genética obtenidos para los locus Celulasa, *CHS* y *STK* en aguacates criollos de Antioquia y cultivares de diversos orígenes y cultivares comerciales de aguacate.

Gen	Segmento alineado	Tipo de muestra	N	Sitios segregantes	H	Θ x 10^{-3}	π x 10^{-3}	P
Cell	1540	Total	51	33	15	4.14	2.93	>0.10
		Wild	20	30	12	4.6	3.46	>0.10
		Cultivars	31	15	10	2.22	2.24	>0.10
	997	Total	101	89	20	4.29	4.27	<0.001
		Antioquia	49	80	11	5.89	5.43	<0.001
		Genbank	52	21	10	2.8	2.79	>0.10
CHS	1210	Total	43	35	27	6.09	4.92	>0.10
		Wild	16	27	15	5.66	4.36	>0.10
		Cultivars	27	29	19	5.67	5.02	>0.10
	827	Total	115	26	26	3.6	3.58	>0.10
		Antioquia	80	9	13	1.52	1.52	>0.10
		Genbank	35	25	15	5.47	5.43	>0.10
STK	1398	Total	53	48	22	6.56	5.51	<0.001
		Wild	20	43	16	7.23	6.18	<0.001
		Cultivars	33	27	11	4.06	4.98	>0.10
		Total	113	41	33	7.09	6.42	>0.10
		Antioquia	57	19	19	3.68	3.66	>0.10
		Genbank	56	31	15	4.87	4.89	>0.10

En el caso del locus *CHS,* los estadísticos de diversidad genética fueron estimados a partir de un fragmento de 842 pb y en 72 aguacates criollos de Antioquia; a pesar de que para este locus fueron analizadas más secuencias que para *Celulasa*, el número de sitios variables fue mucho menor con un valor de 9, igualmente este valor también fue menor al reportado por Chen et al (2008, 2009) en 43 cultivares entre nativos y variedades comerciales, en donde a partir de un fragmento de 1.210 pb se obtuvo un número de sitios variables de 35. En cuanto a la diversidad nucleotidica π, los aguacates criollos de

Antioquia presentaron un valor de 0.00152, el cual también fue menor al reportado por Chen et al (2008, 2009) el cual fue de 0.00492.

Para el locus *STK,* los estadísticos de diversidad genética fueron estimados a partir de un fragmento de 1.115 pb y en 57 aguacates criollos de Antioquia; para este caso el número de sitios variables fue de 26, valor mucho menor al obtenido para *Celulasa*, a pesar de que el fragmento analizado para este locus fue mayor, al igual que el número de secuencias analizadas. Con relación a los cultivares reportados por Chen et al (2008, 2009), el número de sitios variables de los cultivares de Antioquia también fue menor, en donde a partir de un fragmento de 1.398 pb y 53 cultivares analizados se obtuvieron 48 sitios variables. La diversidad nucleotidica π en los aguacates criollos antioqueños fue de 0.00443, menor al reportado por Chen et al (2008, 2009) el cual fue de 0.00551.

Para los tres loci analizados en los aguacates criollos colectados en Antioquia, *Celulasa* fue el que mostró mayor número de sitios variables en las secuencias y por consiguiente mayor diversidad nucleotídica, incluso mayor a lo encontrado por Chen et al (2008, 2009) en donde el analizaron cultivares silvestres colectados en países como México, Costa Rica, Ecuador y República Dominicana y variedades comerciales de aguacate, muchas de ellas producto de hibridación entre varias razas. Por el contrario el locus *CHS* fue el que mostró el menor número de sitios variables y diversidad nucleotídica, tanto a nivel de los tres loci analizados y en comparación con los cultivares analizados por Chen et al (2008, 2009).

4.5.4. Haplotipos.

Con el fin de poder identificar o tener un acercamiento a la identidad racial de los aguacates criollos con potencial como portainjertos y colectados en Antioquia se estimó la frecuencia de los haplotipos de estos árboles, en conjunto con cultivares silvestres originarios de Costa Rica, Chile, Ecuador, Estados Unidos (variedades comerciales originadas de México), Guatemala, México y República Dominicana y cultivares domesticados, comúnmente utilizados como variedades comerciales; para estos cultivares se tomó como referencia la asignación racial realizada por Chen et al (2008, 2009) mediante el modelo basado en agrupamiento a través del programa STRUCTURE y el polimorfismo

nucleotídico a partir de una secuencia de 5.960 pb de los loci nucleares *Celulasa, CHS, STK y F3H.*

El análisis del número de haplotipos y diversidad haplotípica se realizó por separado para tres de los cuatro loci nucleares secuenciados por Chen et al (2008, 2009), en conjunto entre los aguacates criollos, cultivares silvestres nativos de México, Costa Rica, Ecuador, República Dominicana y cultivares domesticados (variedades comerciales) de aguacate de raza botánica conocida puesto que el resultado del análisis de desequilibrio de ligamiento entre estos loci realizado por Chen et al (2009) demostró que estos loci no están asociados; por ello, en este capítulo los tres loci fueron analizados separadamente, además cada locus tiene una actividad fisiológica diferente en el aguacate así que su papel dentro de la especie difiere entre sí.

Para el gen *Celulasa* (Tabla 4-8), el número de haplotipos estimado para 107 cultivares de aguacate (50 cultivares Antioquia, 57 entre cultivares silvestre y variedades comerciales) fue de H=21 y una diversidad haplotípica Hd=0.813. La lista de haplotipos encontrados para el gen *Celulasa* se observa en la tabla 4-8. El haplotipo H1 fue el que agrupó más cultivares y estuvo conformado por 31, todos colectados en el departamento de Antioquia, distribuidos de la siguiente forma: Sonsón (9), Abejorral (5), Montebello (5), Marinilla (3), San Vicente (3), El Retiro (2), Rionegro (1), Santa Bárbara (1) Caramanta (1) y Valparaiso (1). El haplotipo H2, estuvo conformado por 30 cultivares, de los cuales 23 fueron nativos y variedades comerciales y 7 colectados en el departamento de Antioquia; de los 23 cultivares, de acuerdo a los resultados reportados por Chen et al (2008, 2009), 12 pertenecen a la raza guatemalteca, 5 a la raza Mexicana, 5 son híbridos entre las razas mexicana y guatemalteca y solo el cultivar nativo procedente de Costa rica pertenece a la raza Antillana.

De los 9 cultivares de aguacate colectados en Antioquia, 3 de éstos son de la variedad Reed (445R - 19R - 12R), 2 son de el cultivar Hass (21H – 307 H), y solo los cultivares 25-SON y 145CEJ son criollos. El haplotipo H13 estuvo integrado por 13 cultivares, 7 nativos de México, 2 de Ecuador y las variedades Topa – Topa, Khan, Mexicola y Puebla, de acuerdo a los estudios reportados por Chen et al (2008, 2009), todos los cultivares de este haplotipo pertenecen a la raza Mexicana; a excepción de la variedad Puebla la cual según

Chen et al (2009) es un híbrido de las tres razas M x G x WI (6%, 82%, 12%) respectivamente aunque siempre ha sido reconocida como de raza Mexicana. El haplotipo H16, estuvo conformado por 5 cultivares, de los cuales 4 son originarios de República Dominicana y la variedad Arue, de acuerdo a los resultados reportados por Chen et al (2008, 2009), los 5 cultivares pertenecen a la raza Antillana.

Otros de los haplotipos que estuvieron conformados por varios cultivares fueron, el haplotipo H15, el cual estuvo conformado por las variedades Thomas y Duke 6 y el cultivar 63 nativo de México, todas pertenecientes a la raza Mexicana, el haplotipo H14 estuvo integrado por las variedades comerciales Zutano, Thille, Gwen, Esther, Bacon y Anaheim, todas asignadas por Chen et al (2008, 2009) como de raza Guatemalteca, a excepción de la variedad zutano, la cual es un híbrido entre la raza Mexicana y Guatemalteca y el haplotipo H17 el cual estuvo conformado por cultivares nativos de República Dominicana, todos asignados a la raza Antillana. Los demás haplotipos estuvieron conformados por uno o máximo dos cultivares en su mayoría mexicanos y del departamento de Antioquia. Para el gen *CHS*, el número de haplotipos estimado fue de 26 haplotipos para /115 secuencias y Hd = 0.79 (Tabla 4-9). El haplotipo 5 integró la mayoría de los aguacates antioqueños ya que 48 árboles de 50 se incluyeron en este grupo. Además cultivares del Ecuador también hicieron parte del haplotipo 5. Estos dos cultivares fueron asignadas como de raza Mexicana por Chen et al (2008).

Los cultivares de aguacate que hicieron parte de este haplotipo fueron: Sonsón (9), Marinilla (6), Montebello (8), Rionegro (5), Caramanta (4), La Ceja (4), El Retiro (4), Valparaiso (3), Abejorral (2), San Vicente (2) y Santa Bárbara (1). H8 (N = 13) también estuvo compuesto por haplotipos de aguacate criollo de Antioquia y éstos se distribuyeron de la siguiente manera: Abejorral (4), San Vicente (2), Santa Bárbara (1), Marinilla (1), Sonsón (1), Rionegro (1), La Ceja (1), Caramanta (1) y Montebello (1). El haplotipo H16 estuvo compuesto de 8 haplotipos de Antioquia por los municipios: Sonsón (5), San Vicente (1), Abejorral (1) y Montebello (1). El haplotipo 2 estuvo compuesto por 6 cultivares: Ver 16, Khan-CA, Lyon-CA, Bacon-CA, y dos razas Mexicanas, todas estas secuencias fueron asignadas a la raza Mexicana por Chen et al. (2008). El haplotipo H7 integró 4 secuencias de México, el individuo H27 y el cultivar Gwen que son híbridos entre las razas de Guatemala y México, además incluyó un espécimen de La Ceja (Antioquia). El haplotipo H8 estuvo compuesto por 4 haplotipos, uno de ellos es un cultivar Mexicano, los otros son

variedades Mexicanas y fueron: Reed (California), Thille (California) y Duke 7 de acuerdo a los estudios realizados por Chen et al. (2008, 2009). El haplotipo H3 estuvo compuesto por 3 haplotipos: Noga una variedad Hass y un cultival llamado Pikerton que representa un híbrido entre las razas de Guatemala y México. Finalmente, los otros haplotipos encontrados para este locus estuvieron compuestos por una sola secuencia de las variedades: Nabal de Guatemala, Duke 6 de México y TopaTopa (California) de México según Chen et al. (2008, 2009).

Tabla 4- 8. Lista de haplotipos generados para el gen Celulasa en 107 cultivares de aguacate.

Haplotipo	Cultivar	Haplotipo	Cultivar
1	47-MAR -46-MAR -44-MAR -412-ABE -411-ABE -40-SV - 400-ABE -390-ABE -38-SV - 388-ABE - 362-SON -360-SON -35-SV -33-SON - 330-SON -322-SON -317-SON -29-H-SON -265-MON -264-MON -263-MON -258-MON -256-MON -24-SON -194-RET -193-RET -17-SON -170-RIO -118-CAR -100-VAL -04-SB	2	Yu60 - Reed- Pinkerton_2- Noga_2 - Nimlioh- -Nabal- Lyon- Linda-LeavenHass- -HX48 -Hass- -H670- - H287- Fuerte_2- Duke7_2 - Daily11-COSTRI - Ch35_2- 65_2 19-R-SON - 145-CEJ -12-R-CEJ21-H-SON –MEX - 46_2-MEX - 445-R-MAR -307-H-CAR - 25-SON -229_2- MEX - 229_1- MEX-
3	37-SV - 257-MON	4	147-CEJ
5	152-CEJ	6	157-CEJ
7	175-RIO -171-RIO	8	176-RIO
9	276-MON	10	404-ABE
11	428-H-RIO	12	446-F-MAR
13	Ver3-MEX -Ver22-MEX -TopaTopa-QRO1-MEX -Puebla_2- -Mexicola_2- Khan- -ECU - 65_1-MEX -63_1-MEX -46_1-MEX -41-ECU - 139-MEX	14	Zutano_1 -Thille_1-Gwen_1- Esther_1-Bacon_1- Anaheim_1
15	Thomas_1 -Duke6_1 - 63_2_-MEX	16	MG1-REPD - MC1_1-REPD - MB1-REPD JM1_1-REPD Arue_1-SI
17	MC1_2-REPD -JM1_2_-REPD – Ch3B-REPD	18	244-MEX
19	Ver16_2-MEX	20	Ch35_1-MEX

Los otros haplotipos que estuvieron conformados por más de un cultivar fueron: el haplotipo H14 estuvo compuesto por un cultivar de México de raza Guatemalteca, un cultivar procedente del municipio de La Ceja de la variedad Reed, un cultivar de la variedad

Gwen, ambos de raza Guatemalteca y la variedad H287 híbrido mexicano por guatemalteco; el haplotipo H6 integrado por un cultivar mexicano, la variedad Thille y Reed de raza Guatemalteca y la variedad Duke 7 de raza Mexicana; el haplotipo 1 conformado por 2 cultivares mexicanos de la raza Mexicana y la variedad Zutano, híbrido entre las razas Mexicana y Guatemalteca y el haplotipo H7 conformado por las variedades Noga y Hass, híbridos entre las razas Mexicana y Guatemalteca y Pikerton de raza Guatemalteca. Los demás haplotipos estuvieron conformados por uno o máximo dos cultivares en su mayoría variedades comerciales y algunos aguacates del departamento de Antioquia.

Tabla 4- 9. Lista de haplotipos generados para el gen *CHS* en 115 cultivares de aguacate.

Haplotipo	Cultivar	Haplotipo	Cultivar
1	CH-MB1-REPD CH-Ch3B-REPD CH-MG1_2-_REPD CH-JM1_2-REPD	2	CH-244-MEX CH-139-MEX CH-Ver16_2-MEX CH-KHAN-MEX CH-LYON_1-CA CH-BACON_2-CA
3	CH-Yu60_2-MEX	4	CH-Ver22_1-MEX CH-63-MEX CH-ZUTANO_1-CA
5	CH-1-ECU CH-41_1-ECU CH-262-MONT CH-256-MONT CH-193-RET CH-176-RIO CH-170-RIO CH-176-RIO(2) CH-179-RET CH-193-RET(2) CH-194-RET CH-201-RIO CH-202-RIO CH-259-MONT CH-276-MONT CH-279-MONT CH-280-MONT CH-293-CARA CH-331-SON CH-356-SON CH-359-SON CH-445-R-MARI CH-446-F-MARI CH-38-SV CH-45-MARI(2) CH-99-VAL CH-109-CARA CH-145-CEJ CH-156-CEJ CH-263-MONT CH-322-SON CH-362-SON CH-46-MARI CH-100-VAL CH-117-CARA CH-329-SON CH-374-SON CH-21-H-SON(2) CH-47-MARI CH-101-VAL CH-118-CARA CH-150-CEJ CH-390-ABEJ CH-05-SB CH-37-SV CH-44-MARI CH-64-MARI CH-152-CEJ CH-317-SON CH-399-ABEJ(2)	6	CH-2-COSTRI CH-NIMLIOH-GUAT
7	CH-Ch35_1-MEX CH-H287-MEXxGUAT CH-GWEN-MEXxGUAT CH-11-R-CEJ	8	CH-229_2-MEX CH-REED-CA CH-THILLE_1-CA CH-DUKE7-MEX
9	CH-THOMAS-MEX CH-ANHEIM_2-CA	10	CH-PIKERTON-MEXxGUAT CH-NOGA_2-MEXxGUAT CH-HASS_2-CA
11	CH-NABAL-GUAT	12	CH-DUKE6-MEX
13	CH-TOPATOPA-CA	14	CH-MEXICOLA-MEX
15	CH-LINDA-GUAT	16	CH-354-SON CH-354-SON(2) CH-27-SON CH-33-SON CH-40-SV(2) CH-256-MONT(2) CH-360-SON CH-400-ABEJ
17	CH-147-CEJ	18	CH-119-CARA CH-45-MARI CH-40-SV CH-35-SV CH-O4-SB CH-157-CEJ CH-175-RIO CH-388-ABEJ CH-399-ABEJ CH-404-ABEJ CH-412-ABEJ CH-264-MONT CH-330-SON
19	CH-12-R-CEJ	20	CH-19-SON
21	CH-21-H-SON	22	CH-25-SON
23	CH-29-H-SON CH-147-CEJ(2)	24	CH-204-RIO
25	CH-307-H-CARA	26	CH-258-MONT

De los tres genes analizados, el gen *STK* fue el que presentó el mayor número de haplotipos H=33 y diversidad haplotípica de Hd= 0.903, estimada en 113 cultivares de aguacate (57 cultivares Antioquia y 56 entre cultivares nativos y variedades comerciales) La lista de haplotipos encontrados para el gen *STK* se observa en la tabla 4-10. El haplotipo H12, fue el que presento el mayor número de cultivares, con un total de 24 de los cuales 12 fueron variedades comerciales de la raza Guatemalteca, 7 variedades comerciales hibridas entre las razas mexicana x guatemalteca y una variedad de raza Mexicana, dentro de este haplotipo también se encontró el cultivar 65 nativo de México y asignado como de la raza Mexicana por Chen et al (2008) y los cultivares de Antioquia 19RSON – 12R-CEJ -11R-CEJ, los cuales pertenecen a la variedad Reed, la cual también estuvo dentro de este haplotipo.

Con 17 cultivares, fue seguido por el haplotipo H3, el cual estuvo conformado por aguacates criollos del departamento de Antioquia distribuidos de la siguiente forma: Sonsón (5), Abejorral (3), Montebello (3), Marinilla (1), San Vicente (1), El Retiro (1), Rionegro (1), La Ceja (1) y Valparaíso (1); esta haplotipo estuvo seguido en número de cultivares por el haplotipo H2, conformado por 16 cultivares igualmente del departamento de Antioquia, distribuidos así: Abejorral (4), Sonsón (3), Rionegro (3), Montebello (2), San Vicente (1), Caramanta (1), El Retiro (1) y La Ceja (1).

Otros de los haplotipos que estuvieron conformados por varios cultivares fueron: El haplotipo H24 integrado por 9 cultivares, 4 de variedades comerciales de raza Mexicana y una variedad hibrida entre la raza Mexicana y guatemalteca y 4 cultivares nativos mexicanos asignados como de raza Mexicana por Chen et al (2008), el haplotipo H22, conformado por 8 cultivares, 2 nativos de México y 3 de República Dominicana asignados por Chen et al (2008) como Mexicanos y Antillanos respectivamente y las variedades Thomas y Khan de la raza Mexicana y la variedad Arue de raza Antillana, el haplotipo H33 conformado por las variedades Nabal, Bacon y Anaheim, todas asignadas como de raza Guatemalteca por Chen et al (2009), el haplotipo H23 conformado por los cultivares silvestres MG1 y Ch3B_1 nativos de República Dominicana y el cultivar COSTRI, originario de costa Rica, todos asignados a la raza Antillana, el haplotipo H27, conformados por dos cultivares silvestres originarios del Ecuador y la variedad Duke 6, todos de raza Mexicana y el haplotipo H4, integrado por 3 aguacates criollos de Antioquia, 2 de la localidad

Caramanta y uno de Sonsón. Los demás haplotipos estuvieron conformados por uno o máximo dos cultivares en su mayoría cultivares del departamento de Antioquia, cultivares silvestres originarios de México y algunas variedades comerciales.

Tabla 4- 10. Lista de haplotipos generados para el gen STK en 113 cultivares de aguacate.

Haplotipo	Cultivar	Haplotipo	Cultivar
1	33-SON	2	-404-ABE -399-ABE -388-ABE -360-SON -356-SON -331-SON -293-CARA -276-MONT -256-MONT -202-RIO -201-RIO -193-RET -175-RIO -152-CEJ
3	44-MARI -412-ABE -400-ABE -390-ABE -362-SON -35-SV -354-SON -322-SON -280-MONT -27-SON -279-MONT	4	359-SON - 118-CARA -117-CARA
5	329-SON - 259-MONT	6	445-R-MARI –21H-SON
7	05-SB	8	330-SON -119-CARA
9	37-SV	10	317-SON
11	38-SV	12	Zutano_2- Whitsell_1- Thille_1 - Teague_2-Reed -Pinkerton_2- Noga_2- Nimlioh -Nabal_1- Linda_1 -LHass - HX48 - Hass-H670 - H287-Gwen_1- - Esther- -Duke7_2 -Daily11_1- Andes3-65_2 -19RSON –
13	25-SON	14	157-CEJ
15	176-RIO	16	204-RIO
17	266-MONT	18	428H-RIO 411-ABE -40-SV
19	446F-MARI	20	Yu60
21	Ver3	22	Ver16_2- -Thomas_2- QRO1- MC1-MB1_2-Khan_2-JM1- Arue-SI
23	MG1 – COSTRI - Ch3B_1	24	Noga_1- Mexicola_1-Lyon_1 - Ganter-Fuerte_1 - 63- 46-244 - 139_1
25	Ver22_2	26	Ver16_1
27	ECUA - Duke6 - 41_1	27	ECUA - Duke6 - 41_1
28	184_1	29	TopaTopa_2
30	Puebla_1	31	Ver22_1
32	229_2	33	Nabal_2 - Bacon_2 Anaheim_2

Para los tres loci nucleares analizados, se observa que la asociación de los haplotipos se da principalmente por razas botánicas, aunque hay algunas excepciones como el caso del cultivar silvestre originario de Costa Rica, el cual fue asignado por Chen et al (2008) como de raza Antillana, pero para el locus *Celulasa* tuvo el mismo haplotipo que cultivares de

raza Mexicana, Guatemalteca e híbridos entre estas dos razas y para el locus *CHS* tuvo el mismo haplotipo que la variedad Nimlioh de raza Guatemalteca; sin embargo para el locus *STK,* tuvo el mismo haplotipo que dos cultivares silvestres procedentes de República Dominicana, asignados como de raza Antillana por Chen et al (2008); posiblemente este cultivar sea el producto de una hibridación entre razas. Muchos de los aguacates criollos del departamento de Antioquia tuvieron haplotipos comunes con cultivares del mismo departamento, aunque de diferentes localidades y los cultivares restantes tuvieron haplotipos únicos; este comportamiento fue general para los tres loci analizados, sin embargo hubo algunos cultivares que tuvieron haplotipos comunes con cultivares diferentes a los colectados en Antioquia, como fue el caso de los cultivares 25 y 145 de Sonsón y la Ceja respectivamente, los cuales para el locus *Celulasa* tuvieron el mismo haplotipo que cultivares de las razas Mexicana, Guatemalteca e híbridos entre estas dos razas y 47 cultivares de Antioquia de diferentes localidades, los cuales para el locus *CHS* compartieron haplotipo con los dos cultivares silvestres de origen ecuatoriano y asignados con la raza Mexicana (Tabla 4-6). Este resultado indica que los aguacates criollos de Antioquia analizados en este capítulo son posiblemente el resultado de hibridaciones entre las razas guatemalteca y mexicana; otro indicativo de esta hipótesis son las zonas agroecológicas de donde fueron colectados, ya que estuvieron en un rango altitudinal entre 1.375 y 2.475 m.s.n.m, coincidente con las zonas de adaptabilidad de las razas Guatemalteca y Mexicana, que se encuentran entre los 1.000 a 2000 m.s.n.m y por encima de los 2000 m.s.n.m respectivamente (Bergh and Ellstrand 1986).

Dentro de los cultivares colectados en el departamento de Antioquia analizados en el presente capítulo, también se tuvieron en cuenta algunas variedades comerciales como Reed, Hass y Fuerte. Para el locus *Celulasa* se incluyeron dos cultivares de la variedad Reed (19R -445R), cuatro cultivares de el cultivar Hass (21H – 29H – 307H – 428H) y un cultivar de la variedad Fuerte (446F); los dos cultivares de la variedad Reed compartieron el mismo haplotipo con el cultivar Reed analizado por Chen et al (2009); de los cuatro cultivares de el cultivar Hass, el 21H y 307 H compartieron haplotipo con el cultivar Hass analizada por Chen et al (2009); tanto cultivares Reed como Hass a la vez compartieron el mismo haplotipo, el 428H tuvo un haplotipo único y el 29H compartió el haplotipo con aguacates criollos de Antioquia, el cultivar de la variedad Fuerte, no compartió haplotipo con la variedad Fuerte analizada Chen et al (2009) y tuvo un haplotipo único.

En el caso del locus *CHS* se incluyeron cuatro cultivares de la variedad Reed (11R – 12R – 19R – 445R), tres cultivares de el cultivar Hass (21H – 29H- 307H) y un cultivar de la variedad Fuerte (446F); ninguno de los cultivares de la variedad Reed compartió haplotipo con esta variedad, igual ocurrió para los cultivares de el cultivar Hass y Fuerte, algunas de ellas compartieron haplotipo con aguacates criollos de Antioquia y otras tuvieron un haplotipo único.

Para el locus *STK* se incluyeron cuatro cultivares de la variedad Reed (11R – 12R – 19R – 445R), dos de el cultivar Hass (21H– 428H) y un cultivar de la variedad Fuerte (446F); de los cuatro cultivares Reed, tres de ellos (11R – 12R – 19R) compartieron haplotipo con la variedad Reed analizada por Chen et al (2009), a diferencia el cultivar 445R el cual compartió haplotipo con el cultivar Hass 21H, teniendo en cuenta que la variedad Reed es de raza Guatemalteca y el cultivar Hass un híbrido entre raza Mexicana y Guatemalteca; el cultivar Hass 428H tuvo un haplotipo único al igual que el cultivar de la variedad Fuerte. Lo hallado con estas variedades comerciales nos indica que no existe una similitud genética total en cuento a los loci analizados, y este es un aspecto que se debe contemplar si se piensa en ofertar material vegetal de aguacate certificado; no solo se debe garantizar la calidad genética del patrón, también se debe garantizar la calidad genética de la copa.

4.5.5. Análisis de agrupamiento bayesiano.

Usando el método de asignación genética implementado en STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), se estimó una probabilidad posterior (PP) que depende de una probabilidad anterior (PA) designado y una probabilidad condicional (PC = A/D = asigna dado un genotipo/ PT = probabilidad total) en la que se asigna un individuo genotipificado a una subpoblación dependiendo de su composición genética por lo que asigna la pertenencia de cada uno de los cultivares analizados en este capítulo (criollos Antioquia, silvestres de México, Ecuador, Costa Rica y República dominicana y cultivares domesticados) a un grupo genético determinado según su similitud estimada con una probabilidad Bayesiana o posterior, esta asignación se realizó para los tres locus secuenciados en una secuencia concatenada.

Los resultados obtenidos con STRUCTURE HARVESTER produjeron K = 2 para los tres loci concatenados de acuerdo con los valores: media Ln P (D) = -1445.81, stdev = 18.08 y

Δ K = 7.79 estimados por el test de Evanno implementada en STRUCTURE HARVESTER (Figura 4-2, Tabla 4-11). El primer grupo estuvo conformado por la mayoría de los aguacates criollos Antioqueños de los que se obtuvo la secuencia concatenada para los tres genes (30 aguacates criollos) y el segundo grupo conformado por cultivares cuyas secuencias fueron obtenidas en el GenBank (31 cultivares) en los cuales se encontraban cultivares pertenecientes a las tres razas botánicas. Sin embargo, la mayoría de aguacates criollos analizados tuvieron un porcentaje de asignación al grupo 2. A excepción de los cultivares 157 de La Ceja y 400 de Abejorral. Adicionalmente, las variedades Bacon y Anaheim tuvieron algún porcentaje de asignación al grupo 1. Estos cultivares fueron asignados por Chen et al. (2009) como de raza Guatemalteca.

Figura 4- 2. Resultado del análisis de agrupamiento bayesiano con el software STRUCTURE para las secuencias concatenadas de los tres loci nucleares: Celulasa, CHS, STK.

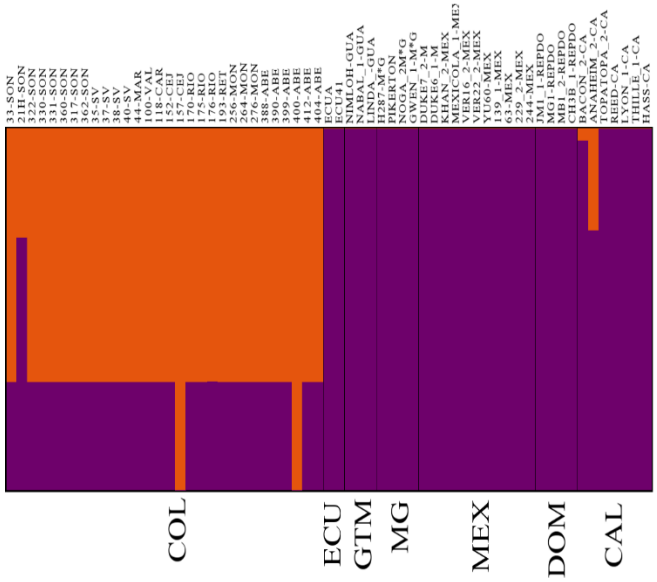


Tabla 4- 11. Test de Evano realizado para aguacates criollos de Antioquia, silvestres diferentes orígenes y variedades comerciales, con las secuencias concatenadas de los tres loci nucleares: Celulasa, *CHS*, *STK,* para determinar el número de K grupos. LnP = función de verosimilitud, Var = varianza; L´k = L.

K	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	lLn''(K)l	Delta K
1	-1.624.950.000	0.108012	—	—	—
2	**-1.445.810.000**	**18.088.760**	**179.140.000**	**140.980.000**	**7.793.790**
3	-1.407.650.000	116.497.232	38.160.000	130.870.000	1.123.374
4	-1.500.360.000	152.297.824	-92.710.000	75.500.000	0.495739
5	-1.517.570.000	281.120.749	-17.210.000	166.610.000	0.592663
6	-1.368.170.000	67.878.160	149.400.000	177.560.000	2.615.863
7	-1.396.330.000	61.852.873	-28.160.000	42.990.000	0.695036
8	-1.467.480.000	209.558.588	-71.150.000	156.040.000	0.744613
9	-1.382.590.000	59.060.053	84.890.000	171.920.000	2.910.935
10	-1.469.620.000	152.487.827	-87.030.000	96.280.000	0.631395
11	-1.460.370.000	263.951.582	9.250.000	1.850.000	0.007009
12	-1.452.970.000	77.817.408	7.400.000	34.450.000	0.442703
13	-1.411.120.000	60.652.156	41.850.000	25.270.000	0.416638
14	-1.394.540.000	86.160.834	16.580.000	93.340.000	1.083.323
15	-1.471.300.000	221.056.101	-76.760.000	—	—

4.5.6. Filogenias con árboles de máxima verosimilitud y bayesianos.

Basados en el análisis de desequilibrio de ligamiento para los locus Celulasa, *CHS* y *STK* realizado por Chen et al (2008) quienes encontraron que los tres loci se encontraban en equilibrio de ligamiento, se optó por concatenar las secuencias de los tres loci nucleares en 43 aguacates criollos de Antioquia, estas secuencias fueron comparadas con las secuencias concatenadas de 32 cultivares entre silvestres y domesticados. Los resultados obtenidos con los tres genes nucleares para el árbol de Máxima Verosimilitud (ML) y distancia T92 (BIC = 12805.25, LnL = -5658.84), y en el árbol Bayesiano (con probabilidades posteriores de 1 y 0.95, con una distancia GTR) se produjeron dos grupos principales (Figuras. 4-3,4-4). En ambos árboles, el primer grupo estuvo conformado por cultivares domesticados (variedades comerciales) y cultivares silvestres originarios de México, Ecuador y República Dominicana, el segundo grupo lo conformaron los aguacates

criollos colectados en Antioquia. Las secuencias que estuvieron más cercanas a las secuencias de los aguacates criollos de Antioquia fueron en primer lugar las de las variedades comerciales Anaheim y Bacon, ambas de raza Guatemalteca. En el árbol de ML las secuencias siguientes fueron Lyon, Duke 6, Topa Topa, Mexicola, todas de raza Mexicana y el cultivar silvestre Ver22. En el árbol bayesiano le siguen, las secuencias de Ecuador, TopaTopa, Mexicola, Mex (Ver22), Duke 6 entre otros, todas éstas de origen Mexicano e igualmente de raza Mexicana. Estos resultados indican la cercanía de los aguacates criollos antioqueños seleccionados en este estudio con las razas botánicas Guatemalteca y Mexicana; este resultado se soporta además por las zonas agroecológicas de donde fueron colectados estos cultivares, las cuales comprendieron un rango altitudinal entre 1.375 y 2.475 m.s.n.m, coincidente con las zonas de adaptabilidad de las razas guatemalteca y mexicana, que se encuentran entre los 1.000 a 2000 m.s.n.m y por encima de los 2000 m.s.n.m respectivamente (Bergh y Ellstrand 1986).

Figura 4- 3. Árbol ML basado en la distancia T92 construido a partir de secuencias concatenadas de los genes nucleares Celulasa, CHS y STK, en cultivares de aguacate criollos de Antioquia, cultivares silvestres de México, Ecuador, República Dominicana y cultivares. Los valores Bootstrap se encuentran en negro.

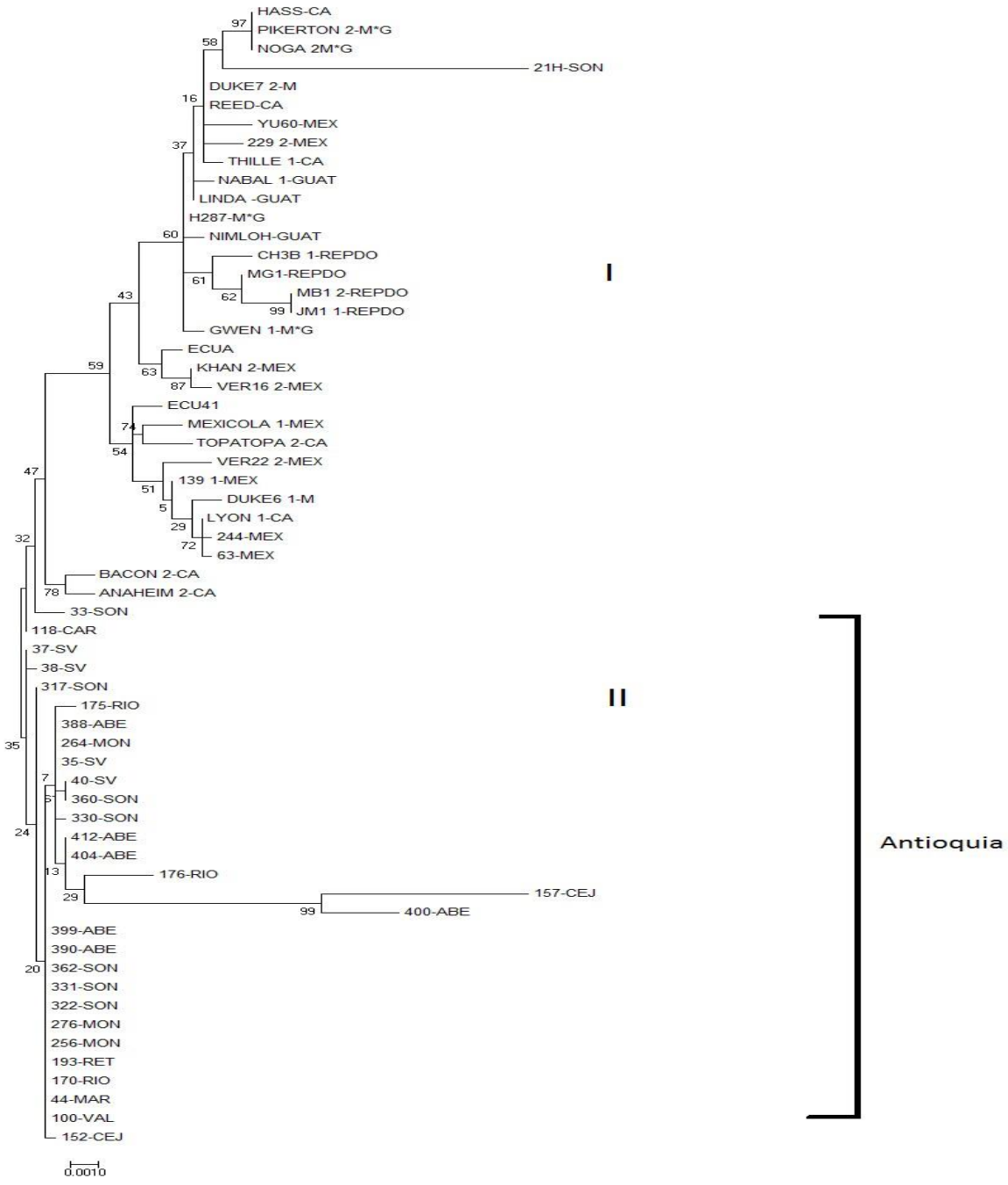
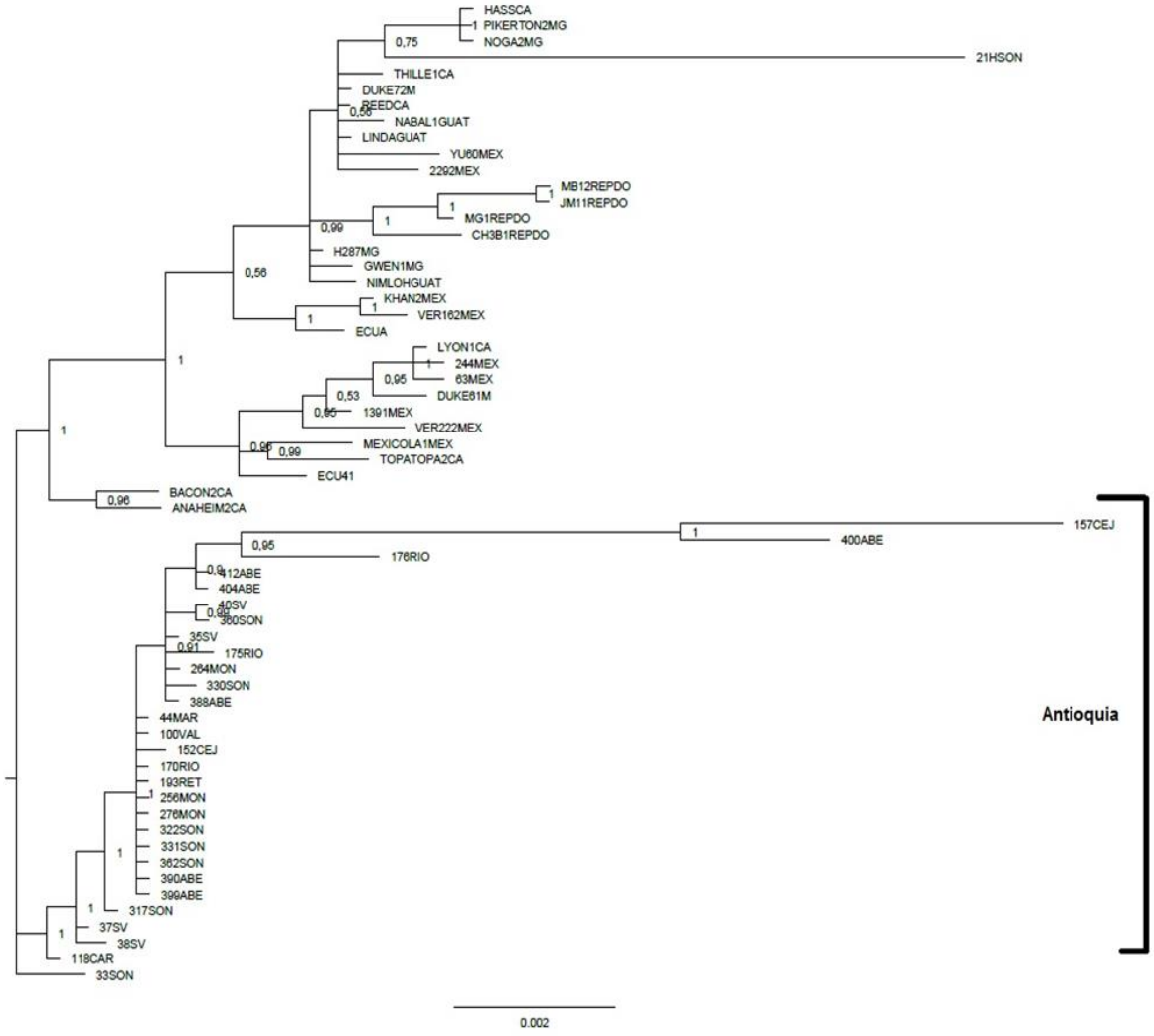


Figura 4- 4. Árbol Bayesiano basado en la distancia de evolución General time reversal construido a partir de secuencias concatenadas de los genes nucleares Celulasa, CHS y STK, en aguacates criollos de Antioquia, cultivares silvestres de México, Ecuador. Los valores de probabilidad bayesiana se encuentran en negro.



4.6. Discusión.

En el presente capítulo, se realizó la caracterizaron molecular de aguacates criollos, colectados en diferentes sub regiones de Antioquia con diversas altitudes y de los cuales regularmente se obtiene semilla para la obtención de portainjertos, especialmente para copas de el cultivar Hass. El objetivo de la caracterización de estos cultivares fue tratar de determinar su identidad racial buscar su origen, diversidad genética y similitud genética con variedades comerciales de aguacate; para lo que se requería realizar una comparación con cultivares de origen y raza botánica conocida, y para ello se seleccionaron tres genes nucleares (*Celulasa, Chalcona sintasa and Serina treonina kinasa*) de los cuatro loci (*Celulasa, Chalcona sintasa and Serina treonina kinasa y Flavonona – 3- hidroxilasa)*, que habían sido previamente secuenciados por Chen et al. (2008) en 21 cultivares silvestres de aguacate con origen en México, Ecuador, Costa Rica y República Dominicana y por Chen et al. (2009) en 33 cultivares domesticados en los cuales se infirió su origen racial a través de un método basado en agrupamiento con el programa STRUCTURE, relacionando los cultivares silvestres con los domesticados.

Persea americana Mill. es una especie diploide con 24 cromosomas (2n = 2x = 24) (García 1975; Ibarra-Laclette et al. 2015 reportados por Boza et al 2018); por lo tanto sus genes nucleares tienen la presencia de dos alelos por locus. Los estudios realizados por Chen et al (2008,2009) mediante la resecuenciación de 4 loci nucleares en cultivares silvestres y domesticados fue realizado mediante la técnica de PCR alelo específica, la cual permitió obtener las secuencia de cada uno de los haplotipos existentes en cultivares heterocigotos. En el caso de los aguacates criollos de Antioquia los tres loci nucleares fueron secuenciados de forma directa obteniendo la secuencia de un solo haplotipo; no obstante, mediante el análisis visual de los cromatogramas se lograron identificar aquellos cultivares heterocigotos y su posición en la secuencia, encontrando un 20% de heterocigotos para el locus *Celulasa,* 43% para el locus *CHS* y 49% para el locus *STK,* porcentajes más bajos a los encontrados por Chen et al (2008) en donde para los loci *Celulasa*, *CHS* y *STK* la heterocigosidad observada en cultivares silvestres fue de 40%, 70.6% y 50% respectivamente, y en cultivares domesticados 48.4%, 69,2% y 68% (Chen et al. 2009). Los análisis realizados en el presente estudio con las secuencias de los tres loci nucleares, se llevaron a cabo con un solo haplotipo; estos haplotipos antioqueños fueron comparados con los haplotipos de aguacate reportados en el GenBank por Chen et al 2008 y Chen et

al., 2009, quienes a pesar de haber obtenido las secuencias de todos los haplotipos encontrados en los cultivares heretocigotos, solo almacenaron en el GenBank la secuencia de un haplotipo y en algunos cultivares dos haplotipos.

El uso de estas secuencias en el presente capitulo resultó de mayor utilidad al estudio reportado en los anteriores capítulos con los marcadores microsatélites, ya que se pudieron comparar los aguacates criollos antioqueños con cultivares de raza botánica conocida y cultivares silvestres procedentes de Meso y América Central, zonas de origen de los progenitores de los aguacates cultivados actualmente (Bergh and Ellstrand, 1986). Una de las ventajas del análisis de secuencias es que producen más estimadores de diversidad genética, como: diversidad nucleotídica, polimorfismo nucleotídico, sitios segregantes, número de haplotipos entre otros. Además permiten la realización de redes haplotípicas o arboles multifurcados que pueden ser utilizados en casos de hibridación, a diferencia de un árbol bifurcado como los dendrogramas que no aceptan la reticulación (Freeland, 2005).

El análisis de desequilibrio de ligamiento de los tres loci analizados en el presente capitulo (*Celulasa, CHS* y *STK*), fue realizado previamente por Chen et al (2009), en donde demostraron que estos loci no están asociados; motivo por el cual en el presente estudio los tres loci fueron analizados de forma independiente, sin embargo para los estudios de asignación bayesiana y filogenias con árboles de máxima verosimilitud y bayesianos se concatenaron las secuencias, con el fin de tener la información de los tres loci en este estudio; lo que permitió comparar 43 aguacates criollos de Antioquia con 32 cultivares entre silvestres y domesticados. La secuenciación de los tres loci nucleares en los aguacates criollos de aguacate provenientes del departamento de Antioquia, mostró en general que estos cultivares son genéticamente similares a cultivares de aguacate de las razas botánicas Mexicana, Guatemalteca e híbridos entre estas dos razas, lo cual es congruente con las zonas agroecológicas de donde fueron colectados los aguacates criollos de Antioquia; ya que estos fueron colectados en un rango altitudinal entre 1.375 y 2.475 m.s.n.m, lo que coinciden con las condiciones de adaptación de las razas Guatemalteca y Mexicana, las cuales presentan adaptación a condiciones sub tropicales con alturas sobre el nivel del mar entre 1.000 y 2000 m en condiciones semitropicales a

templadas con alturas sobre el nivel del mar superiores a los 2.000 m respectivamente (Berg y Ellstrand, 1986). Sin embargo en algunos de los análisis realizados se presentó similitud genética entre algunos aguacates criollos de Antioquia y cultivares silvestres provenientes de República Dominicana y Costa Rica, clasificados como de raza botánica Antillana.

La identificación de haplotipos realizada por el programa DNAsp en general agrupó a la mayoría de las secuencias del aguacate criollo antioqueño dentro del mismo haplotipo para cada uno de los loci estudiados en este capítulo. Además, estos haplotipos antioqueños estuvieron compuestos por un gran número de secuencias. Adicionalmente, los haplotipos de Antioquia estuvieron casi siempre conectados a secuencias de aguacates silvestres o domesticados de las razas Guatemalteca y Mexicana de esta especie, según la nomenclatura de asignación proporcionada por Chen et al. (2008) y (2009). Por el contrario, las secuencias de aguacate de Antioquia no se agruparon en su gran mayoría con las secuencias de Costa Rica y República Dominicana, las cuales representan a la raza Antillana según Chen et al. (2008, 2009). Adicionalmente, en este análisis el cultivar 25 de Sonsón y el cultivar 145 de La Ceja no se agruparon a las otras secuencias del departamento de Antioquia puesto que produjeron otros haplotipos que se asociaron a las secuencias del aguacate silvestre y domesticado de las razas Guatemalteca y Mexicana del aguacate y con secuencias del Ecuador que según Chen et al. (2008, 2009) pertenecen a razas Mexicanas (Chen et al., 2008, 2009).

Con relación a los resultados obtenidos con STRUCTURE de los tres loci concatenados mostraron la formación de K=2 grupos en donde se separan los aguacates criollos de Antioquia de los cultivares domesticados y silvestres de raza botánica identificada estudiados por Chen et al (2008, 2009); sin embargo, los aguacates criollos de Antioquia presentaron algún porcentaje de asignación con respecto al grupo de los cultivares de raza asignada; indicando que los aguactes criollos son el producto de la hibridación entre las tres Razas, con una mayor proximidad a las razas Mexicana y Guatemalteca, ya que ha estas razas o hibridos entre ellas pertenecían la mayoría de los cultivares domesticados y silvestres con las que fueron comparadas. Además las variedades comerciales que tuvieron algún porcentaje de asignación al grupo de los aguacates criollos fueron Bacon y Anaheim que son de raza Guatemalteca.

Las filogenias resultantes de árboles de máxima verosimilitud y bayesianos realizados con las secuencias concatenadas de los tres loci nucleares arrojaron prácticamente los mismos resultados, indicando la formación de dos grupos principales, uno conformado por los cultivares silvestres y domesticados estudiados por Chen et al (2008 y 2009) y el otro por los aguacates criollos de Antioquia. Para ambos árboles los cultivares que estuvieron más cercanos a los aguacates criollos de Antioquia fueron las variedades comerciales Bacon y Anaheim ambas de raza Guatemalteca y seguidas por otras variedades de raza Mexicana; el modelo evolutivo utilizado fue el General Reversal Model (GRM) más gamma, este fue el mejor modelo de evolución, ya que es flexible y se acoplo muy bien a los datos, ya que analizamos tres genes diferentes (Nei y Kumar, 2000), además la topología del árbol, nos da la seguridad que las variedades Bacon y Anaheim fueron las más cercanas a los aguacates criollos antioqueños. En estas filogenias no se pudieron colocar secuencias de un grupo ajeno o outgroup pues no existen secuencias de especies cercanas de plantas con estos mismos tres loci para realizarlas.

El aguacate denominado “criollo” en el departamento de Antioquia y en general en Colombia, es el más conocido y consumido en el país; de acuerdo a las creencias populares ha sido considerado típico de la raza Antillana principalmente por las características morfológicas de sus frutos (Amortegui - Ferro, 2001); sin embargo los resultados obtenidos en este capítulo indican que estos cultivares son más cercanos a las razas botánicas Mexicana y Guatemalteca que a la Antillana. Adicional a su uso como consumo, otra de las utilidades de estos cultivares es como portainjertos en especial para el cultivar Hass, ya sea como clones o donadores de semilla. El cultivar Hass se originó a partir de una semilla de raza Guatemalteca en un huerto de Rudolph Hass en California en el año de 1926, pero de acuerdo al estudio realizado por Chet et al., 2009, esta variedad es un híbrido entre las razas mexicana y guatemalteca en porcentajes de 42% y 58% respectivamente, por lo tanto la posibilidad de compatibilidad entre estos cultivares utilizándolos como portainjerto sobre copas Hass es muy probable.

Estudios previamente realizados sobre la caracterización genética de aguacates criollos de aguacate de Antioquia por Cañas – Gutiérrez et al. (2015), mostraron que estos cultivares están genéticamente diferenciados según su ubicación. Este estudio se basó en

la genotipificación de 111 cultivares de esta zona de Colombia con marcadores moleculares AFLP. Este análisis también fue apoyado por un análisis de componentes principales en rasgos morfológicos en 90 árboles de aguacate, demostrando que la diferenciación genética se produjo en tres subregiones de Antioquia con diferentes condiciones agroecológicas (capitulo III). Estos mismos cultivares fueron los analizados en el presente capítulo mediante la secuenciación de tres loci nucleares. Adicionalmente, estos mismos cultivares fueron caracterizados con 14 marcadores moleculares microsatélites previamente estandarizados por Alcaraz y Hormaza (2007), los cuales fueron comparados con una colección de germoplasma *ex situ* ubicada en la Estación Experimental La Mayora en Málaga España (capitulo II), encontrando estructuración genética entre los cultivares antioqueños, soportando los resultados previamente observados por Cañas et al (2015) con 49 marcadores AFLP. En este estudio mediante el análisis de varianza molecular AMOVA, distancias pareadas Fst, arboles UPGMA y análisis bayesiano, se observó que los cultivares de Antioquia formaban un grupo separado a las accesiones de la colección de La Mayora y eran genéticamente similares a las pocas accesiones de la raza Mexicana y guatemalteca que formaban parte de esta colección.

4.7. Conclusiones.

- El uso de las secuencias de los genes nucleares Celulasa, *CHS* y *STK*, fueron de gran utilidad para estudiar la identidad racial de los aguacates criollos de Antioquia y su similitud genetica con variadeades comerciales y cultivares silvestres de diferentes origenes.

- Las frecuencias haplotipicas y los resultados de aproximaciones bayesianas sugieren que los aguacates criollos de Antioquia particularmente de las zonas de donde fueron colectados son genéticamente similares a cultivares de las razas botánicas Mexicana y Guatemalteca.

- La similitud genética de los aguacates criollos de Antioquia con las razas botánicas Mexicana y Guatemalteca y su adaptación a altitudes entre los 1.700 a 2.200 m.s.n.m. los convierte en candidatos con potencial para uso como portainjertos de el cultivar Hass

- Los resultados obtenidos en el presente capitulo mediante la secuenciación de tres loci nucleares, en los aguacates criollos de Antioquia fue concordante con los resultados obtenidos en la caracteriación molecular con 14 marcadores microsatelites en los mismos individuos.

- La secuenciación de los locus nucleares Celulasa, *CHS* y *STK* realizada en este capítulo fue útil para mejorar el conocimiento de la genética de este cultivo en Colombia.

4.8. Bibliografia.

Aguade, M. (2001). Nucleotide sequence variation at two genes of the phenylpropanoid pathway, the FAH1 and F3H genes, in Arabidopsis thaliana. *Molecular Biology and Evolution*. 18:1–9.

Alcaraz, M. L. Hormaza, J. I. (2007). Molecular Characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*. 144: 244-253.

Álvarez, I. Wendel, J.F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 417-434.

Amortegui - Ferro, I. (2001). El cultivo del aguacate. Modulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. El poira impresiones y editores, S.A. Colombia: Ibagué. 49 pp.

Ashworth, V.E. Clegg, M.T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal Heredity*. 94:407–415.

Bergh, B. Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the avocado. California Avocado Society Yearbook. 70: 135 – 145.

Bergh, B.O. Lahav, E. (1996) Avocados. In: J. Janick and J.N. Moore (Eds.), *Fruit Breeding, Vol I: Tree and Tropical Fruits*. John Wiley and Sons, Inc., West Lafayette. pp. 113–166.

Bernal E., J.A. y Díaz D., C. 2014. Manejo del cultivo. En: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica; Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Cultivo de Aguacate. 2ª. Ed. Medellín, Colombia. pp. 10-151.

Britsch, L. Ruhnau-Brich, B. Forkmann, G. (1992). Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from Petunia hybrida. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 5380–5387.

Boza, E.J. Tondo, C.L. Ledesma, N. Campbell, R.J. Bost, J. Schnell, R.J. A. Gutierrez, O.A. (2018). Genetic differentiation, races and interracial admixture in avocado (*Persea americana* Mill.), and *Persea* spp. evaluated using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 65: 195–1215.

Cañas-Gutiérrez, G.P. Galindo-López, L.F. Arango- Isaza, R.E. Saldamando-Benjumea, C.I. (2015). Diversidad genética de aguacate (*Persea americana Mill.*) en Antioquia. Colombia. *Agronomía Mesoamericana* 26: 129-143.

Chen, H. Morrell, P.L. De la Cruz, M. Clegg, M.T. (2008). Nucleotide Diversity and Linkage Disequilibrium in Wild Avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Heredity* 99: 382-389.

Chen, H. Morrell, P.L. Ashworth, V.E., De la Cruz, M. Clegg, M.T. (2009). Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. *Journal of Heredity*. 100: 56-65.

Chen Y, Hou Y, Guo Z, Wang W, Zhong C, Zhou R, et al. (2015) Applications of Multiple Nuclear Genes to the Molecular Phylogeny, Population Genetics and Hybrid Identification in the Mangrove Genus Rhizophora. PLoS ONE 10 (12): e0145058. doi:10.1371/journal.pone.0145058

Clark, A.G. (1990). Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution* 7: 111–122.

Clegg, M.T. Cummings, M.P. Durbin, M.L. (1997). The evolution of plant nuclear genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 7791–7798.

Cronn, R.C. Small, R.L. Haselkorn, T. Wendel, J.F. (2002). Rapid diversification of the cotton genus (Gossypium: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *American Journal of Botany.* 89: 707-725.

Corona-Jácome, E.C. Galindo-Tovar, M.E. Lee-Espinosa, H.E. Landero-Torres, I. (2016). Diversidad genética del aguacate (*Persea americana* Mill.) en cuatro zonas de su área de dispersión natural. Agroproductividad. 9: 80 -85

Douhan, G.W. Fuller, E. McKee, B. Pond, E. (2011). Genetic diversity analysis of avocado (*Persea americana* Mill.) rootstocks selected under greenhouse conditions for tolerance to phytophthora root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Euphytica* 182:209.

Earl, D.A. vonHoldt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4:359-361.

Evanno, G. Regnaut, S. Goudet. J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620

Fiedler, J. Bufler, G. Bangerth, F. (1998). Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica* 101:249–255

Freeland, J. (2005). Molecular Ecology. Ed. John Wiley and Sons. West Sussex. England.

Forkmann, G. Dangelmayr, B. (1980). Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of Dianthus caryophyllus. *Biochemical Genetics*. 18: 519–527.

Di Gaspero, G. Cipriani, G. (2003). Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Molecular Genetics Genomics.* 269: 612–623.

Galindo, M.E. Arzate, A.M. (2010). Consideraciones sobre el origen y primeras dispersiones del aguacate (*Persea americana* Mill, Lauraceae). Cuadernos de Biodiversidad 33: 11-15

Galindo, M. Milagro, P. (2011). Genetic relationships within avocado (*Persea Americana* Mill.) in seven municipalities of central Veracruz characterized using microsatellites markers. *Tropical and subtropical agroecosystems.* California. USA.

Garcia, A. (1975) Cytogenetic studies in the genus *Persea* (Lauraceae). I. Karyology of seven species. *Canadian Journal Genetic Cytology* 17: 173–180

German, E. Viruel, M.A. (2013). Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity, population structure, and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. *Tree Genetic and Genomic.* 9:539–555

Gaut, B.S. (1998). Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Evolutionary Biology*. 30: 93-120

Gaut, B. Tredway, L. Kubik, C. Gaut, R. Meyer. W. (2000). Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of theFestuca-Lolium complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Plant Systematics and Evolution*. 224: 33–53.

Guo, M. Zhou, R. Huang, Y. Ouyang, J. Shi, S. (2011). Molecular confirmation of natural hybridization between *Lumnitzera racemosa* and *Lumnitzera littorea*. *Aquatic Botany*. 95: 59-64.

Hartl, D.L. Clark, A.G. (1997). Principles of Population Genetics, 3rd. Ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusets.

Hedrick, P. W. (2004). Genetics of Populations. Jones and Barlett Publishers. Sudbury, Massachusets.

Huttley, G. A. Durbin, M. L. Glover, D. E. Clegg, M. T. (1997). Molecular Ecology., in press.

Ibarra-laclette, E. Méndez-Bravo, A. Pérez-Torres, C.A. Albert, V.A. Mockaitis, K. Lopez-Gómez, R. Cervantes-Luevano, J.I. Herrera-Estrella, L. (2015). Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics.* 16: 599

Jakobsson, M. Rosenberg, N.A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics. 23: 1801-1806

Knight, R.J. (2007). Historia, distribución y usos. En: Whinley, A.W. Shaffer, B. Wolstenholme, B.N.(Eds.). El Palto. Botanica, Producción y Usos. Ediciones Universitarias Valparaiso. Chile. Pp. 13-24.

Kumar, S. Stecher, G. Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.

Larkin, M.A. Blackshields, G. Brown, N.P. Chenna, R. McGettigan, P.A. McWilliam, H. Valentin, F. Wallace, I.M. Wilm, A. Lopez, R. Thompson, J.D. Gibson, T.J. Higgins, D.G. (2007)**.** Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Librado, P. Rozas, J. (2009). dnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451-1452.

Lin, J.Z. Morrell, P.L. Clegg, M.T. (2002). The influence of linkage and inbreeding on patterns of nucleotide sequence diversity at duplicate alcohol dehydrogenase loci in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. spontaneum). *Genetics*. 162: 2007–2015

Malcomber, S.T. (2002) Phylogeny of Gaertnera Lam. (Rubiaceae) based on multiple DNA markers: evidence of a rapid radiation in a widespread, morphologically diverse genus. *Evolution* 56: 42–57.

Mhameed, S. Sharon, D. Kaufman, D. Lahav, E. Hillel, J. Degani, C. Lavi, U. (1997) Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between Persea species. *Theoretical and Applied Genetics*. 94:279–286.

Morrell, P.L. Lundy, KE. Clegg, M.T. (2003). Distinct geographic patterns of genetic diversity are maintained in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. spontaneum) despite migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA. 100: 10812–10817.

Morrell, P.L. et al. (2005). Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp spontaneum) despite high rates of self-fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA, 102: 2442–2447.

Nei, M. Kummar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford, Oxford University Press, 333p.

Nordborg, M. Hu, T.T. Ishino, Y. Jhaveri, J, Toomajian, C. Zheng, H. Bakker, E. Calabrese, P. Gladstone, J. Goyal, R. et al. (2005) The pattern of polymorphism in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biology*. 3:e196.

Posada. D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*. 25:1253–1256.

Pritchard, J.K. Stephens, M. Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Rodríguez, M. Jaramillo, J. Orozco, J. (2009). Colecta de aguacates criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su competitividad. In: III Congreso Latinoamericano de Aguacate. Medellín, Colombia, pp. 14-27. Internet Resource: http://corpoaguacate.com/pdf/conferencias/pdf/Colecta%20de%20aguacates%20criollos%20colombianos.pdf (consultado enero 10 de 2017).

Ronquist, F. Teslenko, M. van der Mark, P. Ayres, D. L. Darling, A. Höhna, S., … Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. Systematic Biology, 6: 539–542.

Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: A program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Notes. 4: 137–138.

Sánchez-Pérez, J. 1999. Recursos Genéticos de Aguacate (*Persea americana* Mill.) Y Especies Afines en México 1999. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 7-18

Schaffer, B. Gil, P.M. Mickelbart, M.V. Whiley, A.W. (2013) Ecophysiology the Avocado: Botany. Production and Uses. 2nd Edition (eds B. Schaffer et al.) CAB International pp. 168-199.

Schnell, R.J. Brown, J.S. Olano, C.T. Power, E.J. Krol, C.A. Kuhn, D.N. Motamayor, J.C. (2003) Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *Journal of the American Society Horticultural Science.* 128: 881–889.

Small, R. Ryburn, J. Cronn, R. Seelanan, T. Wendel, J. (1998). The Tortoise and the Hare: Choosing between Noncoding Plastome and Nuclear Adh Sequences for Phylogeny Reconstruction in a Recently Diverged Plant Group. *American Journal of Botany, 85:* 1301-1315.

Tiffin, P. Gaut, B.S. (2001a). Sequence diversity in the tetraploid Zea perennis and the closely related diploid Z. diploperennis: insights from four nuclear loci. *Genetics.* 158:401–412.

Tiffin, P. Gaut, B.S. (2001b). Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in Zea and related genera. *Molecular Biology and Evolution*. 18:2092–2101

Torres, A.M. Bergh, B.O. (1978). Isozymes as indicators of out-crossing among 'Pinkerton' seedlings. *California Avocado Society Yearbook* 62: 103–110.

Tucker, M.L. Durbin, M.L. Clegg, M.T. Lewis, L.N. (1987). Avocado cellulase: nucleotide sequence of a putative full-length cDNA clone and evidence for a small gene family. *Plant Molecular Biology.* 9: 197–203.

Vemoert, G. Vebree, E.C. Van der Linden, K.H. Nijkamp, H.J.J., Stuitje, A.R. (1992). Cloning, nucleotide sequence and expression of the Escherichia coli fabD gene, encoding malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. Jounal. Bacteriology. 174: 2851-2857.

Wei, S.J. Lu, Y.B. Ye, Q.Q. Tang, S.Q. (2017). Population Genetic Structure and Phylogeography of *Camellia flavida* (Theaceae) Based on Chloroplast and Nuclear DNA Sequences. *Frontiers in Plant Science*. 8: 718.

Wendel, J.F. Cronn, R.C. (2003). Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Advances in Agronomy*. 78**,** 139–186.

Whiley, A.W. Schaffer, B. (1994). Avocado. In: Schaffer, B., Anderson, P. (eds.). Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops, Vol 2. Subtropical and Tropical Crops. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 3-35.

Wolfe, K.H. Li, W.H. Sharp, P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 9054-9058.

5. Recomendaciones.

- Se recomienda ampliar el número de muestras de aguacate del departamento de Antioquia y de otros departamentos de Colombia teniéndose en cuenta aguacates silvestres colectados en zonas con poca intervención y a su vez aguacates cultivados con el fin de tener un mejor entendimiento de la genética de poblaciones de la especie en el país y de la manera como se originaron los aguacates criollos por el proceso de las hibridaciones ya que es posible que los aguacates silvestres muestren una composición genética de alelos o secuencias diferente a los aguacates cultivados.

- Se recomienda utilizar nuevos métodos moleculares y de secuenciación para la caracterización molecular del banco de germoplasma de aguacate de Colombia y de las muestras de aguacates silvestres y cultivados de los departamentos de Colombia en los que se cultive esta especie para tener una mayor cobertura del genoma de la especie. Un ejemplo de ello puede ser la técnica Genotyping by Sequencing que es muy parecida a los AFLP ya que se amplifican regiones escogidas por unos adaptadores que se encuentran en todo el genoma de la especie y posteriormente son pirosecuenciados generando información de SNP (single nucletide polymorphisms) de miles de secuencias que podrían ser evaluadas en cuanto a la variabilidad genética de la especie, genética de poblaciones y efecto de la selección natural sobre algunos genes que pueden ser identificados con diferentes programas como Bayescan.

- Se recomienda hacer evaluaciones a condiciones edaficas, climáticas y a enfermedades limitantes como las pudriciones de raíz causadas por patógenos como *P. cinnamomi* y *Verticillium* sp. A aquellos aaguacates criollos que presentaron similitud genetica con accesiones de la Colección Colombiana de aguacate como el cultivar Tumaco y el portainjerto G-755, los cuales presentan características deseables como patrones de injertación. En caso de que los aguacates criollos seleccionados presenten características deseables como portainjertos, se recomienda evaluar su crecimiento y desarrollo a nivel de vivero; para su posible uso como portainjertos. Tambien se recomienda tener en cuenta

para las evaluaciones mencionadaambien a aquellos cultivares que presentaron similitud genetica con cultivares de aguacate de el cultivar Hass; ya que pueden ser una buena opción como portainjertos para esta variedad.

- De igual forma se recomienda realizar evaluaciones de compatibilidad copa / patrón a aquellos aguacates criollos potenciales como portainjertos de acuerdo a su similitud genetica con patrones de injertación o con variedades comerciales como por ejemplo el cultivar Hass; teneiendo en cuenta aspectos como efecto del portainjerto sobre la reducción de altura del árbol, efectos sobre la productividad, sobre la calidad del fruto, incompatibilidad entre otros.

- Con el fin de poder sugerir que material criollos de los analizaods en elpresente estudio s epuede propagar, de acuerdo a sus atributos morfológicos deseables de alta heredabilidad, se recomienda incorporar índice de selección acoplado a la heredabilidad estimada para los distintos caracteres a partir de los datos de SSRs.

Anexos.

A- Descriptores morfológicos del árbol y paisaje

Código ecotipo	Municipio	A.S.N.M	Topografía	Altura del árbol	Ancho copa N-S (m)	Ancho de copa (m) N-S x Or-Oc	Forma del árbol	Superficie del tronco	Circunferencia del tronco cm
1	6	1975	8	14	7.5	6.7	5	7	200
2	6	1920	5	15	14	14	8	7	126
4	8	894	8	15.42	13.6	11.2	6	7	150
5	8	864	8	19.45	14.4	15.4	6	7	160
24	9	1949	7	18.65	16	22	8	7	53
25	9	1880	7	14.95	10	12	2	7	96
27	9	1918	7	17.15	16	18	2	7	60
33	9	1820	8	21.65	20	18	8	9	210
35	10	2084	5	9.63	6.7	7	3	9	90
37	10	2173	5	20	15.4	16.1	5	7	150
38	10	2175	5	17.23	13.3	13	3	7	180
39	10	2176	5	17.93	7.8	8.8	2	7	130
40	10	2197	1	19.93	17.7	16.7	3	7	200
41	10	2194	1	18.33	12	11.7	3	3	148
44	5	2049	8	13.19	14	13.4	6	7	170
45	5	2100	8	11.79	13.9	13.6	5	7	190
46	5	2124	8	14	8.90	6	3	3	94
47	5	2183	2	10.26	11.6	10.3	8	7	170
48	5	2155	3	18.2	11.6	12.2	5	7	175
62	5	2177	6	14	10	10	5	7	175
64	5	2200	2	9	7	7	5	7	110
99	11	1920	8	14	6	6	8	7	89
100	11	1920	8	9	6	7	5	9	90
101	11	1920	8	13	7	6	5	3	90,5
107	2	1900	8	6	4	4	3	3	59
109	2	1900	8	7	3	3	8	7	150
117	2	2000	8	7	6	6	5	9	109
118	2	2000	8	7	6	5	5	9	93
119	2	2000	8	9	9	8	5	9	209
145	3	2110	5	11	7	9	5	7	132
147	3	2065	3	12	8	8	6	9	125
150	3	2149	5	10	7	9	8	7	129
152	3	2162	5	10	8	9	8	7	157
156	3	2182	5	14	8	9	3	7	99
157	3	2182	5	12	6	7	5	7	103
170	7	2172	3	12.65	6	7	5	7	80
171	7	2172	3	12.5	6	6	5	7	159
175	7	2179	3	7	5	4	8	7	110
176	7	2179	3	8	4	4	6	7	69
179	6	2209	6	21.65	14	17	8	9	234
193	6	2150	4	13.85	6	4	8	7	124
194	6	2150	4	10.65	4	5	8	7	101
201	7	2149	2	12	7	7	5	7	120
202	7	2149	2	9	2	2	8	7	96
203	7	2180	2	14	12	10	8	9	198
204	7	2180	2	10	7	7	8	9	112

A- Continuación

Código ecotipo	Municipio	A.S.N.M	Topografía	Altura del árbol	Ancho copa N-S (m)	Ancho de copa (m) N-S x Or-Oc	Forma del árbol	Superficie del tronco	Circunferencia del tronco cm
256	13	1965	6	13	9	10	8	9	96
257	13	1960	6	6	5	4	8	7	78
258	13	1970	6	14	3	3	1	9	103
259	13	1952	6	16	9	8	8	7	126
263	13	1932	6	17	8	8	8	7	60
264	13	1931	6	16	6	9	8	3	83
265	13	1930	6	16	9	9	5	7	99
266	13	1926	6	12	7	8	5	7	78
273	13	1915	6	14	8	8	8	9	111
276	13	1890	6	16	7	7	3	3	92
277	13	1872	6	13	10	8	2	7	109
279	13	1867	6	13	7	8	3	3	86
280	13	1868	6	12	8	8	2	3	104
293	2	2050	8	2	1	1	8	3	34
294	2	2050	8	2	1.8	1.8	8	3	19
295	2	2050	8	2	2	2	8	3	22
297	2	2050	8	3	2	1	8	3	21
298	2	2050	8	1.8	1.5	1.5	5	3	60
312	2	2060	6	13	7	7	3	7	114
314	2	2060	6	13	7	7	5	3	140
315	2	2100	6	7	5	5	3	3	88
316	9	2222	6	13.95	6	7	5	7	86
317	9	2223	6	14.65	8	8	8	9	132
320	9	2230	6	14	12	13	8	9	169
322	9	2224	6	16	14	14	5	7	156
329	9	2134	4	15.85	9	9	5	7	115
330	9	2130	4	16.65	9	9	8	7	132
331	9	2141	4	13.55	5	4	3	7	87
354	9	2267	7	22.65	10	8	8	9	140
355	9	2281	7	9.95	4	4	3	7	55,4
356	9	2281	7	16.66	9	12	8	7	122
359	9	2280	7	12.65	8	8	3	7	70,7
360	9	2277	6	16.15	9	7	7	9	139
362	9	2271	7	18.45	14	12	8	7	106
374	9	2170	3	11.65	9	7	3	7	130
388	1	1735	8	14	12	12	8	7	126
390	1	1735	8	10	6	7	8	7	82
399	1	1626	4	10	8	8	3	7	78
400	1	1632	4	13	6	7	8	9	120
404	1	1662	4	14	9	10	2	7	77,3
411	1	1660	3	18.95	12	12	8	9	157
412	1	1666	3	15	12	12	5	9	138
413	1	1660	3	17	11	14	8	9	178
417	1	1666	3	13	14	12	8	9	113

B- Descriptores morfológicos de ramas

Código ecotipo	Municipio	Patrón de ramificación	Distribución de las ramas	Angulo inserción ramas	Color rama joven	Longitud entrenudos vástagos(cm)	Diámetro vástagos(cm)
1	6	1	2	1	2	0,434	0,628
2	6	2	2	1	2	0,668	0,462
4	8	2	2	1	2	0,534	0,342
5	8	2	2	1	2	0,494	0,384
24	9	1	2	1	2	0,518	0,542
25	9	2	2	1	2	0,918	0,608
27	9	2	2	1	2	0,556	0,51
33	9	2	2	1	2	0,786	0,372
35	10	2	2	1	2	0,286	0,326
37	10	2	1	1	2	0,788	0,306
38	10	2	1	1	2	0,4908	0,47
39	10	2	1	1	2	0,51	0,384
40	10	2	3	1	2	0,542	0,402
41	10	2	4	1	2	0,856	0,286
44	5	2	2	1	2	0,726	0,344
45	5	2	2	1	2	0,404	0,56
46	5	2	4	1	2	0,936	0,508
47	5	2	2	1	2	0,494	0,508
48	5	2	2	1	2	0,414	0,444
62	5	3	2	1	2	0,328	0,512
64	5	3	2	1	2	0,39	0,434
99	11	3	2	1	3	0,574	0,478
100	11	3	2	1	2	1,054	0,470
101	11	3	2	1	2	1,106	0,440
107	2	3	1	1	2	0,604	0,458
109	2	3	2	1	2	1,168	0,544
117	2	3	2	1	2	0,560	0,536
118	2	3	2	1	2	0,730	0,542
119	2	3	2	1	2	0,772	0,57
145	3	3	2	1	2	0,888	0,466
147	3	3	2	1	2	0,678	0,392
150	3	3	2	1	2	0,576	0,456
152	3	3	2	1	2	0,456	0,476
156	3	3	2	1	2	0,802	0,444
157	3	3	2	1	2	0,478	0,41
170	7	2	2	1	2	0,594	0,528
171	7	3	2	1	2	0,448	0,386
175	7	3	2	1	2	0,294	0,472
176	7	1	2	1	2	0,722	0,614
179	6	3	1	1	1	0,616	0,53
193	6	3	1	1	2	1,024	0,45
194	6	3	2	1	2	0,634	0,56
201	7	3	2	1	2	0,368	0,554
202	7	3	2	1	2	0,65	0,384
203	7	3	2	1	2	0,75	0,496
204	7	3	2	1	2	0,31	0,472

B- Continuación

Código ecotipo	Municipio	Patrón de ramificación	Distribución de las ramas	Angulo inserción ramas	Color rama joven	Longitud entrenudos vástagos(cm)	Diámetro vástagos(cm)
256	13	3	2	1	2	0,464	0,448
257	13	3	2	1	2	0,578	0,462
258	13	1	2	1	2	0,554	0,478
259	13	3	2	1	2	0,382	0,564
263	13	3	2	1	2	0,632	0,4
264	13	3	2	1	2	0,582	0,49
265	13	3	2	1	2	0,442	0,508
266	13	3	2	1	2	0,564	0,468
273	13	3	2	1	2	0,382	0,4
276	13	3	1	1	2	0,416	0,384
277	13	3	3	1	2	0,66	0,616
279	13	3	2	1	2	0,306	0,508
280	13	3	2	1	2	0,446	0,482
293	2	1	2	1	2	0,756	0,462
294	2	1	2	1	2	0,580	0,752
295	2	1	2	1	2	0,706	0,498
297	2	1	1	1	2	1,126	0,590
298	2	3	2	2	3	0,996	0,484
312	2	3	1	1	2	0,478	0,602
314	2	3	2	1	2	0,410	0,608
315	2	3	2	1	2	0,492	0,442
316	9	1	2	1	2	0,636	0,462
317	9	3	2	1	2	1,428	1,044
320	9	3	2	1	2	0,46	0,436
322	9	3	2	1	2	0,7	0,354
329	9	3	2	1	2	0,514	0,496
330	9	3	2	1	2	0,848	0,494
331	9	1	2	1	2	0,696	0,418
354	9	3	2	1	2	0,762	0,43
355	9	3	2	1	2	0,456	0,492
356	9	1	2	1	2	0,678	0,51
359	9	2	2	1	2	0,604	0,38
360	9	3	2	1	2	0,58	0,436
362	9	2	2	1	2	0,406	0,504
374	9	2	2	1	2	0,432	0,438
388	1	3	2	1	2	0,878	0,544
390	1	3	2	1	2	0,976	0,512
399	1	2	2	1	2	0,234	0,39
400	1	3	2	1	2	0,364	0,384
404	1	3	2	1	2	0,39	0,508
411	1	3	2	1	2	0,338	0,448
412	1	3	2	1	2	0,46	0,366
413	1	3	2	1	2	1,096	0,418
417	1	3	2	2	2	0,252	0,358

C- Descriptores morfológicos de hoja

Código ecotipo	Municipio	Color haz hojas maduras	Color envés hojas maduras	Margen hojas	Textura hojas	Superficie rama joven	Forma hoja	Longitud hoja cm	Ancho max cm
1	6	12	18	2	5	2	2	16,9	9,6
2	6	12	18	1	5	2	4	23,1	9,1
4	8	25	26	2	5	1	4	19,7	11
5	8	10	17	2	5	1	3	26,6	11,8
24	9	11	23	1	3	1	8	19,8	10,3
25	9	10	18	1	5	1	2	17,8	9,8
27	9	11	18	1	5	1	2	18,6	9,5
33	9	11	18	1	5	1	2	20,8	10,8
35	10	1	8	2	5	2	4	12,1	6,8
37	10	4	6	1	3	1	5	18,6	10,6
38	10	2	6	1	5	2	4	14,6	7,2
39	10	3	5	1	7	2	4	15,3	6,4
40	10	2	5	1	5	2	4	17,9	8,6
41	10	11	13	1	5	2	4	18,7	8,2
44	5	3	7	1	3	2	4	17,8	8
45	5	3	6	1	5	2	4	14,3	7,16
46	5	9	5	1	7	2	4	21,7	9,6
47	5	27	5	2	5	2	4	17,4	7,4
48	5	28	5	1	5	2	9	19,1	8,3
62	5	11	18	2	5	1	4	17,1	7,6
64	5	11	18	2	5	1	4	20	10,2
99	11	11	23	1	5	2	3	22,2	13,2
100	11	14	23	1	5	2	9	18,7	6,7
101	11	11	23	1	5	1	9	23,1	9,9
107	2	12	20	2	5	2	4	20,3	8,7
109	2	10	18	1	5	2	9	21,3	9,7
117	2	10	18	1	5	2	2	13,9	8,1
118	2	10	13	1	5	2	2	22	10
119	2	10	18	1	3	2	9	23	10,3
145	3	10	13	2	5	2	4	25,6	9,5
147	3	10	18	2	5	2	9	18,9	7,4
150	3	11	17	2	5	2	4	16,8	6,9
152	3	14	20	2	5	2	3	16,5	9,5
156	3	12	23	1	3	2	3	18,8	9,3
157	3	11	17	1	5	2	4	16,5	7,8
170	7	12	23	1	3	2	4	29,4	13,7
171	7	10	17	1	3	2	9	24,1	13
175	7	14	23	1	5	2	4	10,1	4,7
176	7	11	17	2	5	1	3	30,8	14,1
179	6	10	18	1	5	2	4	16,8	8,3
193	6	12	20	1	3	2	3	27,6	14,5
194	6	11	18	1	5	2	2	18,2	9
201	7	12	18	1	5	2	8	15,3	6,6
202	7	11	18	1	5	2	4	16,7	8,5
203	7	12	20	1	5	1	4	17,1	8,3
204	7	11	18	1	5	1	4	14,9	7,2

C- Continuación

Código ecotipo	Municipio	Color haz hojas maduras	Color envés hojas maduras	Margen hojas	Textura hojas	Superficie rama joven	Forma hoja	Longitud hoja cm	Ancho max cm
256	13	11	18	2	5	2	4	13,4	7,2
257	13	11	18	1	5	2	2	21,8	9,5
258	13	12	20	2	5	2	4	18,5	9,7
259	13	11	18	1	5	1	2	23,4	12,2
263	13	11	17	1	3	1	9	21,2	8,4
264	13	11	22	2	5	2	3	19,3	9,9
265	13	14	24	2	5	2	3	19,6	11,4
266	13	10	13	1	5	1	9	16,7	7,4
273	13	12	18	2	5	1	3	17,1	7,9
276	13	14	18	1	7	1	4	9,8	5,8
277	13	11	13	1	5	2	9	21,8	11,5
279	13	15	24	1	5	2	4	14,8	6
280	13	11	20	2	5	2	4	16,2	8,3
293	2	10	24	1	5	2	4	19	8,7
294	2	12	24	2	5	1	2	25	8,7
295	2	10	22	2	5	1	4	20,8	10,1
297	2	10	18	1	5	2	4	20,4	8,7
298	2	11	18	2	5	2	7	19,7	6,7
312	2	10	18	1	5	2	2	18,9	10,9
314	2	10	20	1	5	2	2	20,8	10
315	2	11	18	1	5	2	2	16,2	8,2
316	9	14	18	2	5	1	2	13	6,4
317	9	12	23	1	7	1	2	27,7	14,5
320	9	10	18	1	7	2	4	17,1	8,2
322	9	10	18	1	5	2	2	14,2	6
329	9	15	23	1	7	2	2	15,5	8,6
330	9	10	18	1	3	2	7	13,7	5,4
331	9	12	23	1	3	1	9	26,2	10,9
354	9	14	18	2	5	1	4	14,5	6,3
355	9	13	18	2	5	1	2	16,8	6,6
356	9	11	18	1	5	1	4	16,6	7
359	9	14	18	1	5	1	4	16,6	7,2
360	9	1	30	2	3	2	2	14,6	6,6
362	9	11	18	1	5	2	3	15	7,4
374	9	21	23	2	3	2	2	12,8	6,8
388	1	10	18	1	5	2	2	21,8	11
390	1	11	19	2	5	2	4	20,8	9
399	1	14	24	2	3	2	4	12,2	6,3
400	1	16	18	1	5	2	2	12,3	7
404	1	10	13	1	5	2	4	18,8	8,4
411	1	12	18	2	3	2	2	20,8	9
412	1	11	19	1	5	2	4	16,1	7,8
413	1	29	18	2	3	2	4	17	7,8
417	1	11	19	2	5	2	4	15,4	8,4

C- Continuación

Código ecotipo	Municipio	Pubescencia haz	Pubescencia envés	Angulo inserción peciolo foliar	Numero venas primarias (Pares)	Divergencia venas secundarias	Relieve nervadura en el haz	Forma ápice hoja	Forma base hoja
1	6	1	1	1	5	40°	3	3	1
2	6	1	1	1	9	40°	3	5	1
4	8	1	1	1	9	40°	3	7	2
5	8	1	1	1	13	40°	3	3	1
24	9	1	1	1	5	40°	3	3	1
25	9	1	1	1	8	40°	3	5	2
27	9	1	1	1	8	40°	3	3	1
33	9	1	1	1	4	45°	3	7	1
35	10	1	1	1	8	43.3°	3	3	1
37	10	1	1	1	5	50°	3	7	1
38	10	1	1	1	9	37.5°	3	7	1
39	10	1	1	1	5	47.5°	3	3	1
40	10	1	1	1	5	46.6°	3	7	1
41	10	1	1	1	9	50°	3	5	1
44	5	1	1	1	2	51.6°	3	5	1
45	5	1	1	1	1	55°	3	5	1
46	5	1	1	1	1	50°	3	3	1
47	5	1	1	1	4	50°	3	7	1
48	5	1	1	1	8	56.6°	3	5	1
62	5	1	1	1	5	40°	3	3	1
64	5	1	2	1	9	40°	3	3	1
99	11	1	1	1	7	60°	3	7	2
100	11	1	1	1	6	40°	3	3	1
101	11	1	1	1	4	40°	3	3	1
107	2	1	1	1	1	40°	3	3	1
109	2	1	1	1	5	40°	3	3	1
117	2	1	1	1	4	40°	3	5	2
118	2	1	1	1	4	40°	3	3	1
119	2	1	1	1	5	50°	3	3	1
145	3	1	1	1	9	45°	2	3	1
147	3	1	1	1	11	40°	3	3	1
150	3	2	2	1	9	40°	3	5	1
152	3	1	1	1	6	45°	3	7	1
156	3	1	1	1	9	45°	3	5	1
157	3	1	1	1	13	50°	3	3	1
170	7	1	1	1	13	40°	3	3	1
171	7	1	2	1	9	40°	3	5	1
175	7	1	2	1	8	30°	3	3	1
176	7	1	1	1	16	50°	3	3	1
179	6	1	2	1	9	35°	3	5	1
193	6	1	1	1	12	35°	3	3	1
194	6	1	1	1	11	40°	3	5	1
201	7	1	1	1	9	50°	3	3	1
202	7	1	1	1	4	40°	3	3	1
203	7	1	1	1	15	50°	3	3	1
204	7	1	1	1	10	30°	3	3	1

C- Continuación

Código ecotipo	Municipio	Pubescencia haz	Pubescencia envés	Angulo inserción peciolo foliar	Numero venas primarias (Pares)	Divergencia venas secundarias	Relieve nervadura en el haz	Forma ápice hoja	Forma base hoja
256	13	1	1	1	2	35°	3	5	2
257	13	1	1	1	9	40°	3	5	1
258	13	1	1	1	14	50°	3	5	2
259	13	1	1	1	9	40°	3	7	1
263	13	1	1	1	13	35°	3	3	1
264	13	1	1	1	9	45°	3	3	1
265	13	1	1	1	9	50°	3	7	1
266	13	1	1	1	9	45°	3	3	1
273	13	1	1	1	9	40°	3	7	1
276	13	1	1	1	9	45°	3	7	1
277	13	1	1	1	16	40°	3	3	1
279	13	1	1	1	9	40°	3	3	1
280	13	1	1	1	9	40°	3	5	1
293	2	1	1	1	9	40°	3	3	1
294	2	1	1	1	6	35°	3	3	1
295	2	1	1	1	9	40°	3	3	1
297	2	1	2	1	5	30°	3	3	1
298	2	1	1	1	10	40°	3	3	1
312	2	1	1	1	4	40°	3	3	1
314	2	1	1	1	3	35°	3	5	1
315	2	1	1	1	8	40°	3	3	1
316	9	1	1	1	1	30°	3	3	1
317	9	1	1	1	8	45°	3	5	1
320	9	1	1	1	5	30°	3	3	1
322	9	1	1	1	5	40°	3	3	1
329	9	1	1	1	8	40°	3	3	1
330	9	1	1	1	1	40°	3	3	1
331	9	1	1	1	2	40°	3	3	1
354	9	1	1	1	10	40°	3	3	1
355	9	1	1	1	2	30°	3	3	1
356	9	1	1	1	2	35°	3	3	1
359	9	1	1	1	13-15 pares	40°	3	3	1
360	9	1	1	1	1	50°	3	5	1
362	9	1	1	1	9	40°	3	5	1
374	9	1	1	1	4	40°	3	3	1
388	1	1	1	1	9	45°	3	5	1
390	1	1	1	1	9	45°	3	3	1
399	1	2	2	1	4	40°	3	3	1
400	1	1	1	1	8	40°	3	7	1
404	1	1	1	1	5	30°	3	1	1
411	1	1	1	1	13	40°	3	3	1
412	1	1	1	1	5	40°	3	3	1
413	1	1	1	1	9	40°	3	3	1
417	1	1	1	1	9	40°	3	3	1

D. Datos de frecuencias caracteres morfológicos categorizados

Resultados arrojados por el programa IBM® SPSS Statistics® con relación a las frecuencias de las variables morfológicas de los 90 aguacates criollos del departamento de Antioquia categorizadas.

Forma.del.árbol

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	1	1,1	1,1	1,1
	2	6	6,6	6,6	7,7
	3	16	17,6	17,6	25,3
	5	24	26,4	26,4	51,6
	6	5	5,5	5,5	57,1
	7	1	1,1	1,1	58,2
	8	38	41,8	41,8	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Superficie.del.tronco

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	3	15	16,5	16,5	16,5
	7	53	58,2	58,2	74,7
	9	23	25,3	25,3	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Patrón.de.ramificación

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	11	12,1	12,1	12,1
	2	23	25,3	25,3	37,4
	3	57	62,6	62,6	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Distribución.de.las.ramas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	9	9,9	9,9	9,9
	2	78	85,7	85,7	95,6
	3	2	2,2	2,2	97,8
	4	2	2,2	2,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Angulo.inserción.ramas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	89	97,8	97,8	97,8
	2	2	2,2	2,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Color.rama.joven

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	1	1,1	1,1	1,1
	2	88	96,7	96,7	97,8
	3	2	2,2	2,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Margen.hojas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	59	64,8	64,8	64,8
	2	32	35,2	35,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Textura.hojas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	3	16	17,6	17,6	17,6
	5	69	75,8	75,8	93,4
	7	6	6,6	6,6	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Superficie.rama.joven

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	28	30,8	30,8	30,8
	2	63	69,2	69,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Forma.hoja

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	2	23	25,3	25,3	25,3
	3	10	11,0	11,0	36,3
	4	41	45,1	45,1	81,3
	5	1	1,1	1,1	82,4
	7	2	2,2	2,2	84,6
	8	2	2,2	2,2	86,8
	9	12	13,2	13,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Pubescencia.haz

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	89	97,8	97,8	97,8
	2	2	2,2	2,2	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Pubescencia.envés

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	84	92,3	92,3	92,3
	2	7	7,7	7,7	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Angulo.inserción.peciolo.foliar

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	91	100,0	100,0	100,0

Relieve,nervadura,en,el,haz

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	2	1	1,1	1,1	1,1
	3	90	98,9	98,9	100,0
	Total	91	100,0	100,0	

Forma.ápice.hoja

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	2	2,2	2,2	2,2
	3	55	60,4	60,4	62,6
	5	21	23,1	23,1	85,7
	7	13	14,3	14,3	100,0
	Total	91	100,0	100,0	