



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES (SSR)
ASOCIADOS A QTL DE INTERÉS PARA EL
MEJORAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES
MOLECULARES EN *Psidium guajava* L.**

Tesis que presenta

GERARDO CAMPOS RIVERO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2015



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES (SSR) ASOCIADOS A QTL DE INTERÉS PARA EL MEJORAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES EN *Psidium guajava* L.** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer y el Dr. J. Saúl Padilla Ramírez, dentro de la opción de Biotecnología de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia.

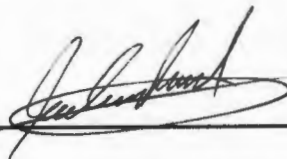
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México, Marzo 2015.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Ing. GERARDO CAMPOS RIVERO

AGRADECIMIENTOS

Al centro de Investigación Científica de Yucatán, en especial a la unidad de Biotecnología por proporcionar los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A COFUPRO y al CYCY por los recursos asignados del proyecto titulado "Caracterización, mantenimiento, conservación y aprovechamiento de los recursos genéticos de guayaba (*Psidium spp*) en México con el numero 7014000002.

Al INIFAP- sitio experimental "Los Cañones" por el material vegetal otorgado para este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada No. 355736.

A mi asesor el Dr. L. Felipe Sánchez Teyer por la formación académica brindada, que sin su asesoría este trabajo no se hubiese realizado.

A mi coasesor Dr. J. Saúl Padilla Ramírez por su contribución en el trabajo con los temas de agronomía y mejoramiento vegetal.

A la técnica M.C. Adriana Quiroz Moreno por el apoyo y asesoramiento en las técnicas de marcadores moleculares microsatélites y en el manejo del equipo de secuenciador automático.

A mi comité tutorial la Dra. Renata Rivera Madrid, el Dr. J. Saúl Padilla Ramírez y el Dr. L. Felipe Sánchez Teyer por las observaciones a este trabajo durante los cuatro exámenes tutorales.

Al comité evaluador, la Dra. Renata Rivera Madrid, el Dr. J. Saúl Padilla Ramírez y el Dr. L. Felipe Sánchez Teyer, el Dr. Luis Sáenz Carbonel y el Dr. Jorge M. Santamaría Fernández por las valiosas observaciones en la redacción del trabajo.

DEDICATORIAS

Agradezco a Dios por la oportunidad de concluir uno más de mis objetivos y por haberme guiado en el camino.

A mis padres Ofelia Ma. Rivero y Efraín Campos, que con su ejemplo, amor, dedicación y apoyo incondicional ayudaron a concluir este proyecto.

Agradezco a mis hermanos Efraín y Gibran que estuvieron junto a mí durante todo el proceso apoyando en todo momento.

A mi novia Sammantha por su apoyo, comprensión y ayuda durante todo el proceso.

A mi familia un especial agradecimiento, pues siempre estuvieron pendientes de mí.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO.....	3
1.1.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁRBOL	4
1.1.2. DESCRIPCIÓN DEL FRUTO	5
1.2. PRODUCCIÓN DE GUAYABA.....	5
1.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE GUAYABA.....	6
1.4. COLECCIONES DEL INIFAP	8
1.5. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DE PLANTAS.	13
1.6. QTL (LOCI DE CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS).....	15
1.7. ESTUDIOS PREVIOS RELACIONADOS CON MÁS EN OTRAS PLANTAS.	16
1.7.1. ESTUDIOS EN GUAYABA.....	17
HIPÓTESIS	27
1.9. OBJETIVOS	27
1.9.1. OBJETIVO GENERAL.	27
1.9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	27
1.10. JUSTIFICACIÓN.	27
1.11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28

1.12. BIBLIOGRAFÍA	30
CAPÍTULO II	37
ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y LAS CONDICIONES DE PCR PARA LOS CEBADORES MICROSATÉLITES ASOCIADOS A QTL DE INTERÉS.	37
2.1. INTRODUCCIÓN.	37
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	37
2.2.1. MATERIAL VEGETAL	37
2.2.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN	43
2.2.3. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES MICROSATÉLITES.....	43
2.3. RESULTADOS.	44
2.4. DISCUSIÓN.	47
2.5. BIBLIOGRAFÍA	49
CAPÍTULO III	51
SELECCIÓN DE LOS SRR ASOCIADOS A QTLS DE INTERÉS EN GUAYABO MEXICANO	51
3.1. INTRODUCCION	51
3.2. MATERIALES Y METODOS	52
3.2.1. MATERIAL VEGETAL	52
3.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	55
3.2.3. ESCRUTINIO Y SELECCIÓN DE LOS CEBADORES SSR ASOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS.	55

3.3. RESULTADOS	57
3.3.1. SELECCIÓN DE CEBADORES INFORMATIVOS.....	62
3.4. DISCUSIÓN	69
3.5. BIBLIOGRAFÍA	71
CAPÍTULO IV	73
VALIDACIÓN DE LOS MARCADORES SSR COMO HERRAMIENTA DE SELECCIÓN TEMPRANA PARA GUAYABA MEXICANA.....	73
4.1. INTRODUCCIÓN.	73
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	74
4.2.1. MATERIAL VEGETAL.	74
4.2.2. ALELOTIPIFICACIÓN CON LOS MARCADORES MPgCIR161, 136 Y 131.	74
4.2.3. ANÁLISIS DE DATOS.	74
4.3. RESULTADOS.....	75
4.3.1. VALIDACIÓN DEL MICROSATÉLITE MPgCIR131 PARA INDIVIDUOS DE MENOR GROSOR DE PULPA INTERNA.....	75
4.3.2. VALIDACIÓN DEL MICROSATÉLITE MPgCIR136 PARA INDIVIDUOS DE MENOR GROSOR DE PULPA EXTERNA.....	77
4.3.3. VALIDACIÓN DEL MICROSATÉLITE MPgCIR161 PARA INDIVIDUOS DE COLOR DE PULPA BLANCA Y MENOR CONTENIDO DE °BRIX.	80
4.4. DISCUSIÓN.	83
4.5. BIBLIOGRAFÍA	86
CAPÍTULO V	89

DISCUSIÓN GENERAL	89
5.1. CONCLUSIONES.	93
5.2. PERSPECTIVAS.....	93
5.3. BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	99

LISTADO DE ABREVIATURAS.

\$.t⁻¹ Precio por tonelada

°BRX Grados Brix (g/ml)

Ac Ácido

AFLP Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados.

AND Ácido desoxirribonucleico.

CICY Centro de Investigación Científica de Yucatán

CIRAD Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

cM Centimorgans.

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EtBr Bromuro de etidio.

Ha Hectárea

INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

MAPS Selección asistida de parentales por marcadores.

MAS Selección asistida por marcadores.

MASS Selección asistida de plántulas por marcadores.

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PVPP Polivinilpolipirrolidona

QTL Loci de características cuantitativas.

RAPD amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

SSR Secuencias simples repetidas, también llamados microsatélites

t Toneladas

t.ha⁻¹ Tonelada por hectárea

UPOV La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las principales especies del género <i>Psidium</i> presentes en México.	4
Figura 2. Producción y valor de la producción del cultivo de guayaba en México..	8
Figura 3. Características de las selecciones 126, 10, 20 y 106 del banco de germoplasma del INIFAP.	10
Figura 4. Características de las selecciones de pulpa rosa.....	11
Figura 5. Características de selecciones de fruto de forma aperada	12
Figura 6. Dendograma de la diversidad de guayaba Mexicana, construido en base de SSR	13
Figura 7. Ejemplo de la asociación de QTL con marcadores SSR en un grupo de ligamiento de Guayaba	23
Figura 8. Mapa de ligamiento para la población de mapeo MP1.....	26
Figura 9. Estrategia experimental general del proyecto.	29
Figura 10. Coloración de las extracciones obtenidas por medio del Kit Chargeswitch.	45
Figura 11. ADNg extraído con el kit Chargeswicht modificado. Primera y segunda elusión	46
Figura 12. Amplificación de fragmentos de ADNr 18s a partir de hojas guayaba extraídas por el kit de chargeswitch modificado.	46
Figura 13. Estandarización de las condiciones de PCR para los cebadores asociados a QTLs.....	47
Figura 14. Criterios de selección de los cebadores asociados a características de interés.	57

Figura 15. ADN de Bulks en concentraciones de 10ng/μl..	58
Figura 16. Amplificación de dos Bulks (B1 y B2) y del ADN de dos individuos con cebadores 18s	59
Figura 17. Amplificación de fragmentos de ADRr 18s, con la muestra L10A3, a diferentes diluciones.....	60
Figura 18. Amplificación de los individuos de los bulks 1 y 2 a una concentración de 1 ng/μl con el cebador mPgCIR 254	60
Figura 19. Selección de los microsatélites asociados a °BRIX.....	62
Figura 20. Selección de los microsatélites asociados al grosor interno de pulpa.	63
Figura 21. Selección de los microsatélites asociados a Grosor externo de pulpa.	64
Figura 22. Selección de los microsatélites asociados al color de pulpa.....	65
Figura 23. Amplificación con el cebador asociado a Índice de madurez	66
Figura 24. Amplificación con los cebadores asociado a contenido de vitamina C.	67
Figura 25. Formas alélicas obtenidas con el marcador mPgCIR131.....	76
Figura 26. Promedio de los grosores de pulpa interna para los distintos tipos alélicos. ...	77
Figura 27. Formas alélicas obtenidas con el marcador mPgCIR136.....	78
Figura 28. Promedio de los grosores de pulpa externa para los distintos tipos alélicos .	80
Figura 29. Formas alélicas obtenidas con el marcador mPgCIR161.....	81
Figura 30. Proporción de individuos de pulpa blanca y de pulpa rosa por cada tipo alélico.	82
Figura 31. Proporción de individuos de menor y mayor contenido de ° Brix por cada tipo alélico	83

Figura 32. Esquema de la aplicación de MAS para un programa de mejora en guayaba mexicana.	94
---	----

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Cultivos de importancia económica en México	6
Cuadro 2. Características de las variedades cultivadas en México	8
Cuadro 3. Descriptores mínimos a emplear para la caracterización de accesiones en el guayabo.....	17
Cuadro 4. Asociación de QTL con SSR	21
Cuadro 5. Características de las accesiones colectadas	39
Cuadro 6. Individuos seleccionados para el escrutinio de los cebadores asociados a características de interés.	52
Cuadro 7. SSR asociados a QTLs	56
Cuadro 8. Características y asociaciones de los cebadores evaluados	68

RESUMEN

Las guayabas (*Psidium* spp.) son un género de la familia Myrtaceae, provenientes de zonas tropicales y subtropicales, los frutos dependiendo de la variedad y región donde se cultiven, pueden tener características morfológicas diferentes. El cultivo de guayaba es uno de los de mayor importancia económica en México. Los microsatélites (SSR) asociados a QTL de interés agronómico, los cuales fueron desarrollados para poblaciones cubanas (Ritter *et al.*, 2010; Risterucci *et al.*, 2005;), podrían ser empleados para la selección asistida por marcadores (MAS) en variedades mexicanas. Por lo que el objetivo de esta investigación es la validación de la aplicación de estos marcadores SSR para la selección temprana por medio de MAS en variedades mexicanas. Para la investigación el material vegetal fue otorgado por el sitio experimental "Los cañones" del INIFAP en Huanusco, Zacatecas. El cual cuenta con una colección *ex situ* de cerca de 250 accesiones colectadas de todo el país. Se evaluaron 16 microstélites asociados a características de interés agronómico como: número de semilla; grosor de pulpa; contenido de vitamina C; color de pulpa contenido de °Brx. Se determinó el polimorfismo obtenido por cada microsatélites y se seleccionaron los más informativos en base a su polimorfismo, es decir, aquellos que solo amplificaron para una de las característica antes mencionadas, ya sea para alto o bajo número de semillas, alto o bajo contenido de Vitamina C y °Brx, mayor o menor grosor de pulpa y color crema o rosa de pulpa. Para el análisis de fragmentos, el amplificado fue visualizado en un secuenciador automático ABIS 310 por electroforesis capilar. De los dieciséis microsatélites evaluados, cuatro fueron seleccionados por su carácter polimórfico. Para la selección de individuos con alto contenido °Brx e individuos de color de pulpa crema el cebador mPgCIR161, para grosor de pulpa delgada el mPgCIR136, el mPgCIR131 para individuos de grosor de pulpa interna gruesa y el mPgCIR007 para la selección de individuos con alto contenido de vitamina

C.

ABSTRACT

Guavas (*Psidium* spp.) are a genus of *Myrtaceae* family, from tropical and subtropical areas. Fruits may have different morphological characteristics depending on variety and region they are grown. Economically, Guava crop is one of the most important in Mexico. Microsatellites (SSR) associated with QTL for agronomic interest, which were developed for Cuban populations (Ritter *et al*, 2010; Risterucci *et al*, 2005), could be used for marker-assisted selection (MAS) in Mexican varieties. The objective of this research is to validate the application of these SSR markers for early selection by MAS in Mexican varieties. The plant material was provided by experimental site "Cañones" of INIFAP at Huanusco, Zacatecas. Which has an ex situ collection of nearly 250 accessions collected from around the country. 16 microsatellites partners were evaluated with agronomic characteristics of interest as number of seeds; pulp thickness; vitamin C; flesh color °Brx content. Polymorphism obtained by each microsatellite was determined, and was selected the most informative based on their polymorphism. It means that only those who was amplified to one of the above characteristics, even if they have high or low number of seeds, high or low in Vitamin C and ° Brx, varying thickness pulp and cream or pink pulp color. For analysis of fragments the amplified was visualized on an automatic sequencer 310 ABIS by capillary electrophoresis. Of the sixteen microsatellite assessed, four were selected because of their polymorphic character, for individuals selecting with high ° Brx and individuals with cream pulp the primer mPgCIR161, to thickness of thin pulp the mPgCIR136, the mPgCIR131 for individuals thickness inner thick pulp and mPgCIR007 for individuals with high vitamin C.

INTRODUCCIÓN

Los árboles de guayabo (*Psidium spp.*) pertenecen a la familia Myrtaceae, son provenientes de zonas tropicales y subtropicales, los frutos dependiendo de la variedad de guayaba, tienen características morfológicas (forma, tamaño, color de pulpa, número de semilla, contenido de pulpa) y contenido nutricional diferente.

El cultivo del guayabo (*Psidium guajava*), constituye uno de los frutales tropicales de mayor valor nutricional, presenta un alto contenido de Vitamina A y C, además de hierro, fósforo, calcio, entre otros. También se le reconoce sus altos niveles de antioxidantes (Fundación produce, 2012). El mercado mundial de la guayaba en fresco es pequeño, en comparación a otros frutales, sin embargo el comercio de productos procesados de guayaba está en crecimiento, sobre todo en Europa y Estados Unidos (Fundación Produce de Guerrero, 2012). México ocupa el tercer lugar de exportación de fruta fresca, solo por debajo de India y Pakistán; para el 2012 dentro del país este cultivo se encontraba dentro de los primeros 21 lugares de los frutales con importancia económica. Por lo anterior la posibilidad de exportar guayabas de calidad y con las características ideales, es una gran oportunidad de mercado que permitirá generar mayores ingresos para los agricultores, aprovechando la variedad de frutos de guayaba. Dentro de las principales características que busca la industria para la selección de guayabas destacan: altos contenidos de sólidos solubles (°Brix), altos contenidos de vitamina C, bajo número de semillas, mayor grosor de pulpa, el color de la pulpa, entre otras. Es aquí donde las herramientas biotecnológicas toman mayor importancia para el mejoramiento de plantas, mediante el mapeo de QTL (Loci de Carácter Cuantitativo) y por medio del uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR) y AFLP es que se desarrolló una estrategia de selección del material vegetal a través de la selección asistida por marcadores ligados a características de interés, conocida como MAS (Selección asistida por marcadores); esta estrategia permite seleccionar de forma temprana los individuos con las características deseadas y por medio de la selección específica de la progenie permite fijar las características deseadas en un menor tiempo en comparación con el mejoramiento tradicional (Olmos, 2004). Para el caso específico de guayaba existen mapas de ligamiento, con la asociación de algunos marcadores del tipo SSR y AFLP a QTLs relacionados a características de importancia agronómica para el fruto (Ritter *et al.*,

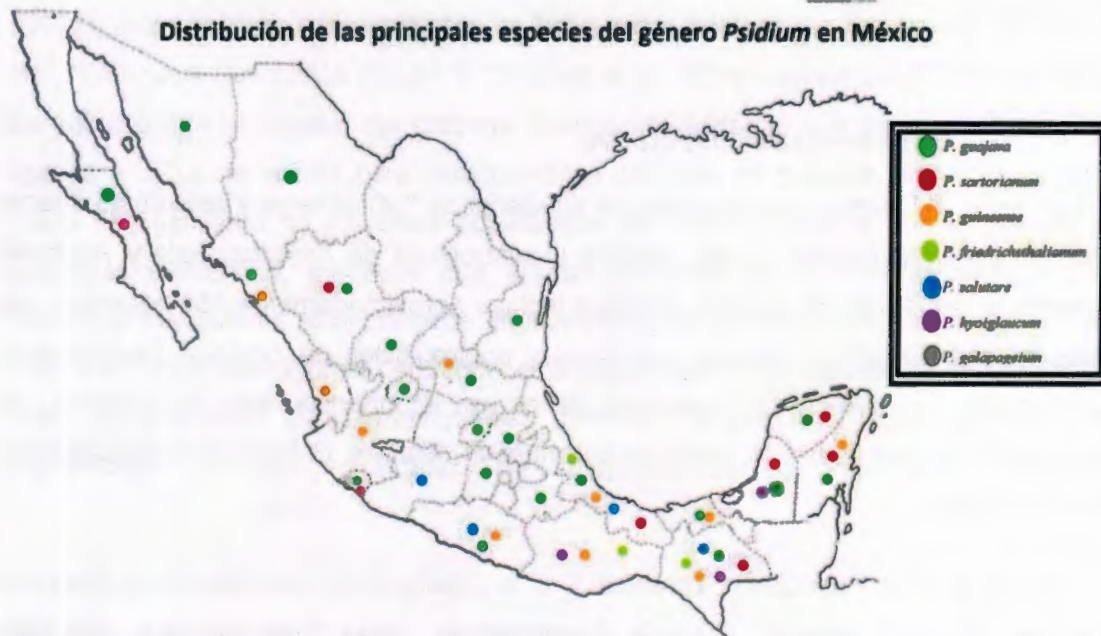


Figura 1. Distribución de las principales especies del género *Psidium* presentes en México. (CONABIO, 2013)

1.1.1. Descripción del árbol.

Los árboles pertenecientes a este género son perennifolio o caducifolio, de 3 a 10 m de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 60 cm; de copa irregular, hojas decusadas simples, láminas de 3 a 13.5 cm de largo por 1.5 a 6 cm de ancho, oblanceoladas, oblongas o elípticas, abundantes puntos granulosos transparentes en la lámina; hojas fragantes cuando se estrujan; el tronco generalmente es torcido y muy ramificado, de ramas gruesas, ascendentes y retorcidas; la corteza del árbol es escamosa, en piezas lisas, delgadas e irregulares, pardo rojiza, las escamas son grisáceas. La corteza interna es fibrosa, ligeramente amarga, de color crema a pardo oscuro; flores de hasta 8 cm, actinomorfas, tienen de 4 a 5 sépalos verdes en el exterior y blancos en el interior, de pétalos blancos; el sistema radical es superficial, de sexualidad hermafrodita y número cromosómico $2n=2x=22$, aunque existen algunos cultivares $2n=3X=33$ pero no producen semilla (http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdf).

1.1.2. Descripción del Fruto

El fruto del guayabo conocido como guayaba, dependiendo de la variedad y ubicación geográfica donde se cultive, el fruto presenta diferentes características fenotípicas y químicas. Se ha descrito que éste puede ser de forma esférica, globulosa, elipsoidal o periforme de tamaño variable, color crema amarillento a rosado, de olor fragante y sabor agridulce, contenido abundante en semillas, color de la pulpa variable. El peso se encuentra entre 60 y 500 g por pieza, un pH ácido entre 3.4 – 4.2, una concentración de sólidos solubles entre 5 y 15 °Brix y una resistencia a la compresión entre 9 y 16 lb/pulg². La composición química de la guayaba varía según los cultivares y su grado de maduración en promedio se calcula que contiene 77% de agua, 0.95 % de proteína, 0.45% de grasas, 8.85% de azúcares, 2.85% de carbohidratos y 8.15 % de fibras; al igual se calcula el contenido de Calcio de 9.5 a 10 mg, Fósforo de 17.8 a 30 mg, Hierro de 0.30 a 0.70, vitamina A 200 a 400 I.U., Tiamina 0.046 mg, Riboflavina 0.03 a 0.04 mg, vitamina B3 40 U.I., vitamina C de 200 a 500 mg por cada porción comestible de 100 g (Padilla *et al.*, 2005).

1.2. Producción de guayaba

La cosecha del fruto se da una vez al año, y puede darse en 3 periodos, el temprano que se presenta entre los meses de julio – agosto; el periodo normal que es en los meses de septiembre – diciembre y el tardío que es de enero – marzo. En México la mayoría de las huertas o plantaciones se establecieron inicialmente con plantas provenientes de semilla, razón por la cual los frutos presentan una gran heterogeneidad. La propagación del frutal se puede hacer de forma sexual, mediante el uso de semillas; esta técnica de propagación es empleada principalmente para el material que será usado como porta injerto o bien para el establecimiento de los huertos. La propagación asexual se hace mediante distintas técnicas de las cuales destacan las siguientes: Propagación por acodo aéreo, el cual consiste en el uso de ramas aéreas para la producción de raíces por medio del amarre de sustrato en las ramas, una vez obtenida las raíces, se corta la rama y se trasplanta para que termine su desarrollo; propagación por estaca, la técnica consiste en la inserción de un fragmento de rama que, enterrado parcialmente es capaz de producir una planta igual a la planta madre; propagación por injerto, esta técnica consiste en unir dos partes de diferentes plantas, de tal forma que continúen su crecimiento como una sola

planta, en el caso de guayaba el porta injerto más usado es *Psidium friedrichsthalianum*; otra técnica de propagación asexual es la micropropagación, que consiste en la multiplicación *in vitro* de un organismo, usando tejido u órganos bajo condiciones contraladas. Los tejidos más usados para la propagación *in vitro* de guayaba son las yemas axilares en medio MS con BA (bencil-adenina) como regulador de crecimiento vegetal (Perales *et al.*, 2005).

1.3. Importancia económica del cultivo de Guayaba

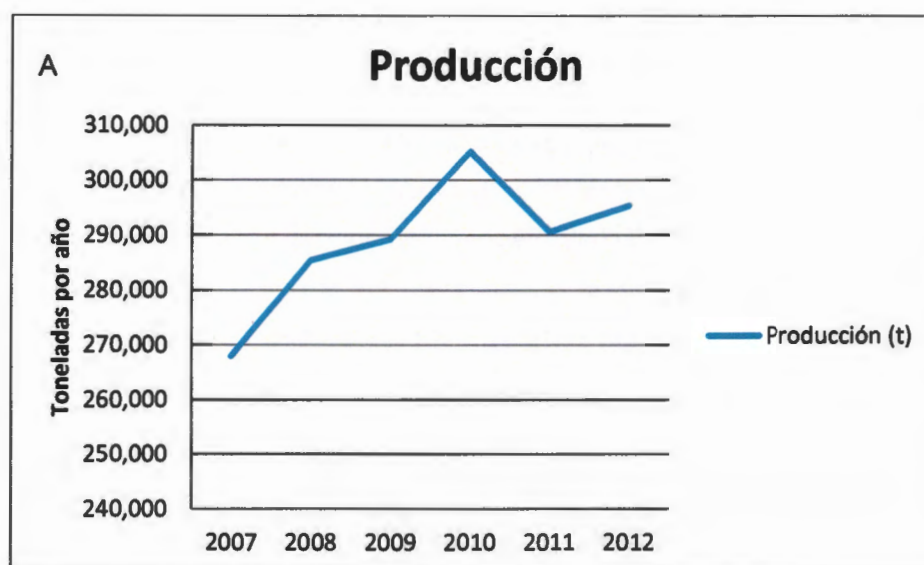
México se encuentra entre los principales países productores de Guayaba, solo por debajo de India y Brasil. En el país la producción de guayaba por su importancia económica se encuentra dentro de los 21 frutales económicamente importantes de México (cuadro 1).

Cuadro 1. Cultivos de importancia económica en México (SAGARPA 2013)

Cultivo	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)	Precio medio rural (\$.t ⁻¹)	Valor de la producción (miles de pesos)
Caña de azúcar	774,243.18	713,824.00	49,735,273.26	69.67	610.63	30,369,914.67
Aguacate	142,146.10	126,597.89	1,264,141.46	9.98	14,346.82	18,136,404.25
Pastos	2,518,587.15	2,432,143.97	45,538,878.39	18.72	369.54	16,828,483.45
Alfalfa verde	387,799.54	376,421.64	28,247,520.47	75.04	462.18	13,055,453.78
Café cereza	760,974.05	688,208.41	1,287,642.69	1.87	5,293.30	6,815,878.60

Limón	166,580.41	149,607.56	2,132,921.78	14.26	2,956.35	6,305,658.73
Plátano	77,303.66	74,284.16	2,138,686.85	28.79	2,881.71	6,163,079.29
Nuez	96,277.27	68,008.91	96,476.35	1.42	62,475.2	6,027,379.78
					1	
Naranja	335,471.72	330,174.59	4,079,677.74	12.36	1,447.14	5,903,847.70
Uva	27,830.86	27,209.75	281,144.98	10.33	16,848.3	4,736,829.58
					5	
Guayaba	21,762.79	21,255.94	290,659.42	13.67	4,096.71	1,190,747.57

Los últimos 5 años en México se observa la tendencia de incrementar la producción de este cultivo, aunque ha habido una disminución en la producción para el 2011, el valor de esta siguió en aumento para el mismo año, el cultivo de guayaba representó un importe superior a los mil millones de pesos (Figura 2).



basan en caracteres fenotípicos que resultan de la expresión de genes, este tipo de marcador puede variar según las condiciones ambientales; los bioquímicos que se basan en la proteínas que resultan de la expresión génica o algún metabolito y los moleculares que se basan en variaciones a nivel secuencia de nucleótidos (Vodenicharova, 1989). Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismos o proceso sea un marcador. Dentro de los marcadores moleculares destacan los marcadores de ADN, revelan sitios de variación en el ADN (Jones *et al.*, 1997), son los más usados en el análisis del germoplasma vegetal, son selectivamente neutros debido a que se pueden localizar en regiones no codificantes del ADN (Collard *et al.*, 2005).

Durante las dos últimas décadas, la investigación molecular se ha desarrollado en el campo de la Selección Asistida por Marcadores (MAS por sus siglas en inglés) para el mejoramiento de plantas. El reto a superar es encontrar los marcadores que estén relacionados con los genes de interés y que sea posible aplicarlos a una gran cantidad de muestras (Gupta *et al.*, 1999) y que este marcador sea coherente a través de múltiples poblaciones.

Los marcadores moleculares se han empleado en el mejoramiento, caracterización de cultivares, la selección asistida para caracteres cualitativos y cuantitativos, inclusive el desarrollo e identificación de cultivares (Borém *et al.*, 2009).

El desarrollo de marcadores moleculares de ADN permite el diseño de marcadores ligados a los propios genes de interés, los cuales han sido empleados para la construcción de mapas de ligamiento que ayudan a la selección de individuos con caracteres deseados en una especie, a este proceso se le conoce como MAS (Marker assisted Selection) (Foolad and Sharma, 2005). MAS está siendo de gran importancia en el mejoramiento de plantas, al incrementar la eficiencia de la mejora en plantas. Es en la década de los noventas que se desarrollan los primeros mapas genéticos y a explotarse el ligamiento genético entre marcadores de importancia para los cultivos (Paterson *et al.*, 1988). Algunas de las especies con las que se ha empleado la selección asistida por marcadores son: *Phaseolus vulgaris* (frijol común) para introducir resistencia a antracnosis, en el cual se logra acelerar el proceso de obtención de variedades por medio

de la selección dirigida evitando cruzas innecesarias (Garzón *et al.*, 2007); especies de *Solanum sp* y *Carica papaya* también han sido mapeadas y se ha comenzado a desarrollar un programa de mejoramiento en base a estos mapas, más adelante se describe a detalle.

1.6. QTL (Loci de características cuantitativas)

Los Loci que controlan la expresión de características cuantitativas son llamados QTL. Empleando mapas genéticos se puede estudiar la conformación de los QTL logrando identificar, mapear y medir la magnitud del efecto de los principales factores genéticos involucrados en el control de esas características y por medio de selección y cruzas llegar a poder manipularlos (Ferreira, 1994).

El mapeo de características cuantitativas a través de la identificación de QTL se considera una herramienta importante para el mejoramiento genético en plantas (Cerón y Sahagún, 2007; Martínez *et al.*, 2005) y el mapeo de éstos es importante pues permite detectar regiones del genoma ligados a características de interés agronómico (Ferreira, 1994). Estos loci son detectados mediante la asociación entre los marcadores moleculares polimórficos y el fenotipo de los individuos de una población de mapeo (Schuster y Cruz, 2004). Entre los procedimientos para la caracterización de QTLs destaca el mapeo por intervalos, el cual considera dos marcadores moleculares cercanos al QTLs (marcador- QTL-marcador) (Cerón y Sahagún, 2007), es importante considerar el número de marcadores empleados para el mapeo, pues entre mayor sea el número de marcadores que cubra el genoma mayor será la posibilidad de encontrar asociación entre estos y los QTLs, además que la distancia dentro del mapa de ligamiento entre marcador y marcador se reduce. La relación QTL marcador se encuentra mediante el análisis de la segregación de estos marcadores y la variación de las características cuantitativas, para establecer una relación de ligamiento entre ellos, asumiendo que si el marcador y la característica están presentes en la progenie, se debe a un efecto de cosegregación debido a la cercanía del marcador al locus de interés (Teran, 1999).

La elección de los parentales así como el tamaño de la población es primordial para el estudio de QTL, debido a que la segregación de estas características puede verse afectada por el grado de diferencia que exista entre los parentales, por lo que es

necesario la selección de parentales con características contrastantes (Soller, 1983). El ligamiento entre los marcadores y QTLs depende de que haya un desequilibrio de ligamiento entre los alelos en el loci marcador y los alelos del QTL. Para detectar un QTL es necesario conocer la magnitud del efecto del QTL sobre la característica, la distancia entre marcadores, el tipo de población, el tamaño de la población segregante, la frecuencia de recombinación del marcador y el QTL, y la heredabilidad del carácter en estudio (Melchinguera, 1998; Ferreira, 1994).

1.7. Estudios previos relacionados con MÁS en otras plantas

Se han hecho diferentes estudios para el mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para mejorar la resistencia a enfermedades y estrés abiótico. En frijol se han desarrollado alrededor de 15 mapas de ligamiento en poblaciones generadas a partir de diferentes cruza; se han etiquetado genes y QTL ligados a resistencia a enfermedades e insectos (Miklas, 2005) destacan el mapeo de genes con resistencia a el virus del mosaico y al tizón común; a pesar de que los mapas generados son de baja densidad han permitido a los mejoradores entender la herencia de la resistencia a las características mencionadas.

Se ha mapeado y detectado QTLs de resistencia al frío en especies de *Solanum spp.* Valverde (2007), describe la metodología para la generación de mapas construidos con diferentes marcadores genéticos (AFLP y RADP) para esta especie; se detectaron 12 grupos de ligamiento que corresponden al número haploide de esta especie y se logró identificar la presencia de un QTL para aclimatación al frío el cual se ligó a dos marcadores moleculares.

Blas *et al.*, (2011) mapearon QTLs relacionados con el tamaño y forma de la papaya, emplearon una población F2 que provenía de la cruza de la variedad Thai de 1,2 kg de peso, pulpa color roja y la variedad 2H94 una variedad hawaiana de 0.2 kg, de pulpa amarilla. El mapeo se desarrolló mediante el empleo de 14 microsatélites descritos anteriormente por Chen *et al.*, (2007). Se identificaron seis grupos de ligamiento y 14 QTL con efectos fenotípicos agrupados en 4 grupos de ligamiento (GL: 02, 03, 07, y 09) estos loci contenían homólogos a QTL de tomate que también regulan el tamaño de la fruta. En

base a esto, estos autores proponen que a partir de estos QTL se podrá discernir las vías genéticas para obtener frutas de mayor tamaño y forma deseable, y brindar una herramienta para los cultivadores de esta fruta para poder desarrollar variedades de papaya para su consumo en mercados con necesidades específicas.

1.7.1. Estudios en guayaba

Algunos países latinoamericanos, como Cuba, iniciaron un programa de mejoramiento del guayabo; los estudios principalmente se centran en la conocer la variabilidad de la especie, la descripción morfológica del fruto y el desarrollo de mapas de ligamiento. El primer paso fue la recolección de especímenes con interés agronómico con características como el alto contenido de vitamina C y bajo número de semillas (interés para la industria); frutos de mayor tamaño además también se recolectaron las variedades que fueran contrastantes en sus características morfológicas, para tener enriquecido el banco de germoplasma que más adelante permitieran un programa de mejoramiento en base a las diferencias genéticas de los cultivos (Valdés-Infante *et al.*, 2003b). Las principales variedades que se colectaron fueron provenientes de cultivares del país y otras fueron introducidas para enriquecer la colección, dentro de las principales variedades se mencionan: "cotorrera", "Perú roja", "microguayaba", "Seychelles", "indonesia blanca", N6 y "suprema roja". Lo que se buscaba en este primer paso era establecer, enriquecer, mantener y multiplicar una colección de guayabos y así garantizar una fuente de variabilidad para futuras aplicaciones (Valdés-Infante, *et al.*, 2012).

En busca de tener más herramientas para la selección de variedades de guayaba para el mejoramiento y homogenizar la caracterización de esta especie, Rodríguez *et al.*, (2010), desarrolló el primer descriptor ilustrado para el cultivo de guayaba, tomando en cuenta las recomendaciones de la UPOV (Internacional Union for the Proyección of new Varieties of plants), en este catálogo se incluyen las 20 accesiones más importantes del banco de germoplasma cubano. Los descriptores mínimos para la caracterización se enlistan en el cuadro 3 (Rodríguez *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Descriptores mínimos a emplear para la caracterización de accesiones en el guayabo (Rodríguez et al., 2010)

Descriptores

Habito de crecimiento de las ramas

Diámetro de la cavidad del cáliz

Color del tallo joven

Diámetro de la cavidad del cáliz en relación con el del
fruto

Forma de la hoja desarrollada

Coloración de la pulpa

Relación largo/ancho de la lámina foliar

Uniformidad del color de la pulpa

Largo del fruto

Decoloración de la pulpa después de ser cortada

Ancho del fruto

Corteza externa arenosa

Relación largo-ancho del fruto

Grosor de la corteza externa en relación con la interna

Dimensiones del fruto

Dulzor

Forma del fruto

Acidez

Forma del fruto a nivel peduncular

Contenido de vitamina C

Ancho del cuello en relación con el del
fruto

Jugosidad

Forma del ápice del fruto

Número de semillas por fruto

Coloración externa el fruto

Masa de las semillas en relación con la del fruto.

En la parte molecular, Risterucci *et al.*, en el 2005 desarrollaron una serie de microsatélites mediante el empleo del programa SAT (SSR Analysis Tool), esta herramienta facilita la integración, análisis de las secuencias provenientes de bibliotecas enriquecidas de SSR, las cuales fueron construidas según el protocolo de Billotte *et al.* (1999), empleando para la identificación y el diseño de los cebadores de los microsatélites el software SAT (disponible en <http://sat.cirad.fr/sat>), el cual está diseñado para llevar a cabo búsquedas sucesivas en diferentes bases de datos o bibliotecas, así como eliminar la secuencia del vector, adaptadores y secuencias de clonación de baja calidad, la búsqueda de motivos SSR y ensamblar las secuencias redundantes también realiza diseño pares de cebadores SSR, todos los cebadores diseñados por el software se amplificaron en *P. guajava* y evaluaron el polimorfismo obtenido por los cebadores, los resultados sugieren que los SSR desarrollados tienen una capacidad discriminativa alta, lo que permitiría distinguir entre individuos de cultivares diferentes (Risterucci *et al.*, 2005).

Los cebadores desarrollados fueron posteriormente probados en diversos genotipos de guayaba para evaluar su capacidad de discriminación entre individuos de diferentes especies y para estimar el nivel de diversidad en la colección de guayaba cubana; los cebadores que dieron mayor nivel de polimorfismo fueron: mPgCIR07, mPgCIR09, mPgCIR11, mPgCIR15. A pesar de que el primer uso de estos marcadores fue el estudio de la variabilidad, otras potencialidades de los marcadores SSR es que permiten demostrar que existe una correlación con características morfoagronómicas de las variedades (Valdés- Infante, 2009; Valdés-Infante *et al.*, 2010).

En el 2005, inicio un proyecto internacional conocido como Guavamap, financiado por la Comisión Europea. Este proyecto estuvo integrado por la colaboración del instituto Max Planck (Alemania), Neiker (España), CIRAD (Francia), CICY e INIFAP (México), la Universidad de Los Andes (Venezuela) y EMBRAPA (Brasil). El objetivo fue la mejora de la utilización de la fruta tropical guayaba (*Psidium guajava* L.) para lo cual fue necesario la identificación y caracterización de nuevos genotipos de guayaba y su utilización en programas de mejoramiento de acuerdo a las necesidades individuales de los países, y la

aplicación de la biotecnología en forma de marcadores de ADN mediante el establecimiento de mapas de ligamiento para tres poblaciones de mapeo :“Enana Roja Cubana” x “N6” (población de mapeo 1=MP1), “Enana Roja Cubana” x “Suprema Roja” (MP2), “Enana Roja Cubana” x “Belic L-207” (MP3) usando como parental femenino a la “Enana Roja Cubana”(ANEXO I); identificación de QTL para los rasgos importantes para la producción (ANEXO II), y el desarrollo de marcadores moleculares para la selección asistida por marcadores (Rohde, 2008). El germoplasma generado se conservó *in situ* y *ex situ*, se clasificó según sus caracteres morfológicos y los descriptores establecidos, y se complementó con análisis molecular promedio de AFLP y SSR para su clasificación. Con base a estos dos tipos de marcadores se establecieron los mapas de ligamiento individuales y de referencia para las tres poblaciones de mapeo, con esta información se realizó el mapeo de QTL para características de interés y así establecer las bases para MAS (<http://www.neiker.net/neiker/quavamap/>). Ritter *et al.*, (2010) evaluaron para cada población de mapeo cebadores de AFLP y SSR, en esta primera etapa se calculó el porcentaje de polimorfismo de estos marcadores en las tres poblaciones, se seleccionaron los cebadores con mayor polimorfismo que después serían empleados; construyeron los mapas de ligamiento con los marcadores más polimórficos; se logró establecer en base a estos marcadores 11 grupos de ligamiento para cada población, en donde se señalan las distancias en cM (centimorgans) entre los marcadores y su agrupación. Ritter *et al.*, (2008a) analizaron los QTL usando las mismas poblaciones de mapeo y los asociaron a marcadores moleculares, usando el método de mapeo por intervalos empleando el software SAS (Statistical analysis software). Primero caracterizaron los parentales individualmente y las poblaciones de mapeo, cabe destacar que las características en estudio por su importancia en la industria fueron: el número de semillas, grosor de la pulpa, acidez, sólidos solubles, contenido en vitamina C y el índice de maduración. Todos los QTL en estudio fueron detectados, más de 100 QTLs fueron detectados en total en las tres poblaciones de mapeo, éstos varían entre 2 y 13 QTLs por característica, dependiendo de la población de mapeo. Los QTLs fueron integrados primero en los mapas individuales de los parentales y posteriormente en un mapa de referencia por población de mapeo, algunos de los QTLs al integrar el mapa se encontraron cercanos marcadores SSR, se obtuvo un mapa integrado para cada población en el cual se muestran los diferentes marcadores utilizados y se destacan los

QTL que fueron mapeados (Figura 7), todos los QTL identificados son reportados junto con el marcador al que se le asocia, en el cuadro 4 se muestran los QTL asociados a marcadores SSR (Ritter *et al.*, 2008b). El empleo de estos podrá permitir hacer una selección más eficiente para los programas de mejoramiento seleccionando desde etapas tempranas del desarrollo de las plantas por medio de estos marcadores asociados a características de interés sin tener que esperar que se desarrolle la planta y se obtenga el fruto.

Cuadro 4. Asociación de QTL con SSR (Ritter *et al.*, 2008b)

Población de mapeo 1		
Característica	Abreviatura del QTL	Nombre los SSR (mPgCIR...)
Grosor interno de pulpa	PI	243
Grosor externo de pulpa	PE	243 284-020 254
Sólidos solubles (°Brix)	TSS	254
Número de semillas	SN	316-193 034-161 208-163
Contenido de vitamina C	VC	334-007 094 208-163

CAPÍTULO I

Índice de maduración	MI	015
		405-157
		288-404

Población de mapeo 2

Grosor externo de pulpa	PE	178-136
-------------------------	----	---------

Grosor interno de pulpa	PI	131
-------------------------	----	-----

Acidez de la fruta	AC	193
--------------------	----	-----

Sólidos solubles (°Brix)	TSS	161
--------------------------	-----	-----

Índice de maduración	MI	193
----------------------	----	-----

Promedio del peso de las semillas	SW	253
-----------------------------------	----	-----

Población de mapeo 3

Grosor externo de la pulpa	PE	256
----------------------------	----	-----

Contenido en vitamina C	VC	101
-------------------------	----	-----

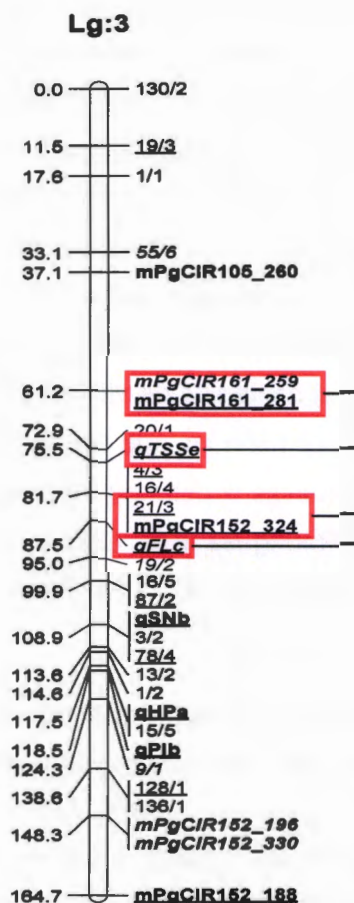
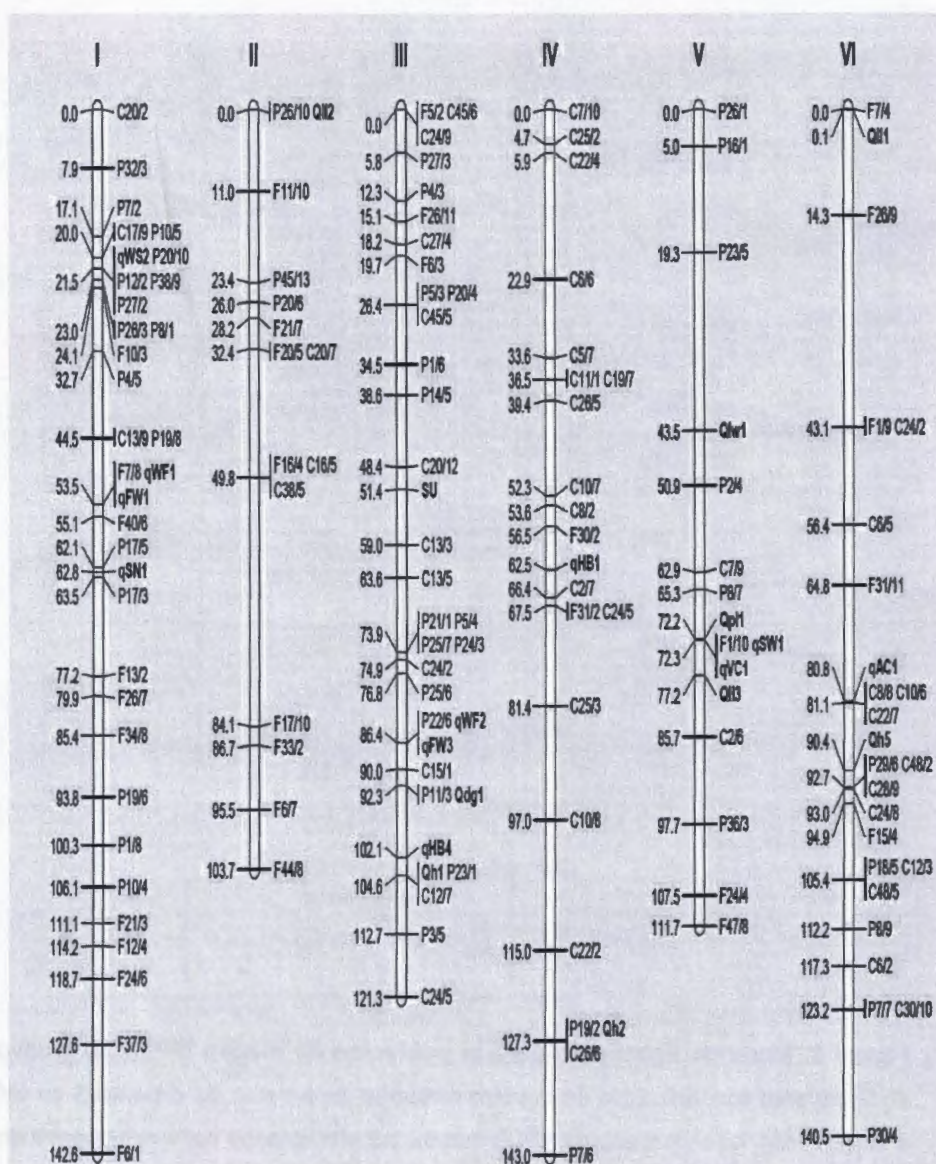


Figura 7. Ejemplo de la asociación de QTL con marcadores SSR en un grupo de ligamiento de Guayaba (Ritter *et al.*, 2008b).

Rodríguez *et al.* (2007), emplearon marcadores SSR y AFLP para establecer relaciones filogenéticas en la colección de germoplasma cubano y complementar el mapa de ligamiento publicado por Valdés-Infante (2003). Las accesiones evaluadas provienen de diferentes lugares, se evaluaron accesiones locales, genotipos de diferentes países y otros de poblaciones de polinización abierta. El protocolo de AFLP se hizo según lo reportado por Vos *et al.* (1995), para la amplificación de SSR, se emplearon 8 cebadores para el análisis de 40 accesiones.

Se construyó un mapa de ligamiento de guayaba para cada población de mapeo. Adicionalmente se obtuvo un mapa general consenso de las tres poblaciones. Con esto se extendió el mapa publicado antes por Valdés-Infante (2003) a un total de 220 marcadores que fueron ligados en 11 grupos de ligamiento que corresponde al número haploide de cromosomas del guayabo. Se lograron identificar quince QTL relacionados con características vegetativas como la longitud de hoja, ancho de hoja, longitud de peciolo, altura y las tasas de crecimiento del diámetro y altura, en cuanto a las características de la fruta solo se lograron identificar 5 loci, para el peso de las frutas, acidez, sólidos solubles totales, el contenido de vitamina C y el grosor de la pulpa. Estas características son importantes pues son las que tienen relevancia en la industria y sería de interés para el desarrollo de nuevas variedades. En la figura 8 se muestra el mapa de ligamiento de QTL obtenido por Rodríguez *et al.*, (2007) donde se observan los 11 grupos de ligamiento obtenidos y la ubicación de los marcadores mencionados y los QTLs a los que se les asocia.

Estas investigaciones sientan las bases para el mejoramiento genético del guayabo, basado en la selección asistida por marcadores moleculares. Pues con los mapas de ligamiento y los más de 100 QTLs que fueron detectados (entre 2 y 13 QTLs por característica) obtenidos a partir de las poblaciones de mapeo y asociados a un marcador AFLPs o SSR, puede ayudar a la selección temprana de individuos con las características agronómicas de interés por medio de marcadores moleculares, con la aplicación de esta estrategia se puede reducir el número de individuos que avanzan en cada ciclo de selección y con ello el número de experimentos, lo que es de vital importancia para especies frutales como el guayabo pues presentan un largo periodo juvenil en el cual la selección por caracteres morfológicos es difícil (Valdés-Infante *et al.*, 2012). Con la aplicación de estas técnicas (MAS) se podría obtener un proceso de selección más eficiente (Clegg *et al.*, 2004).



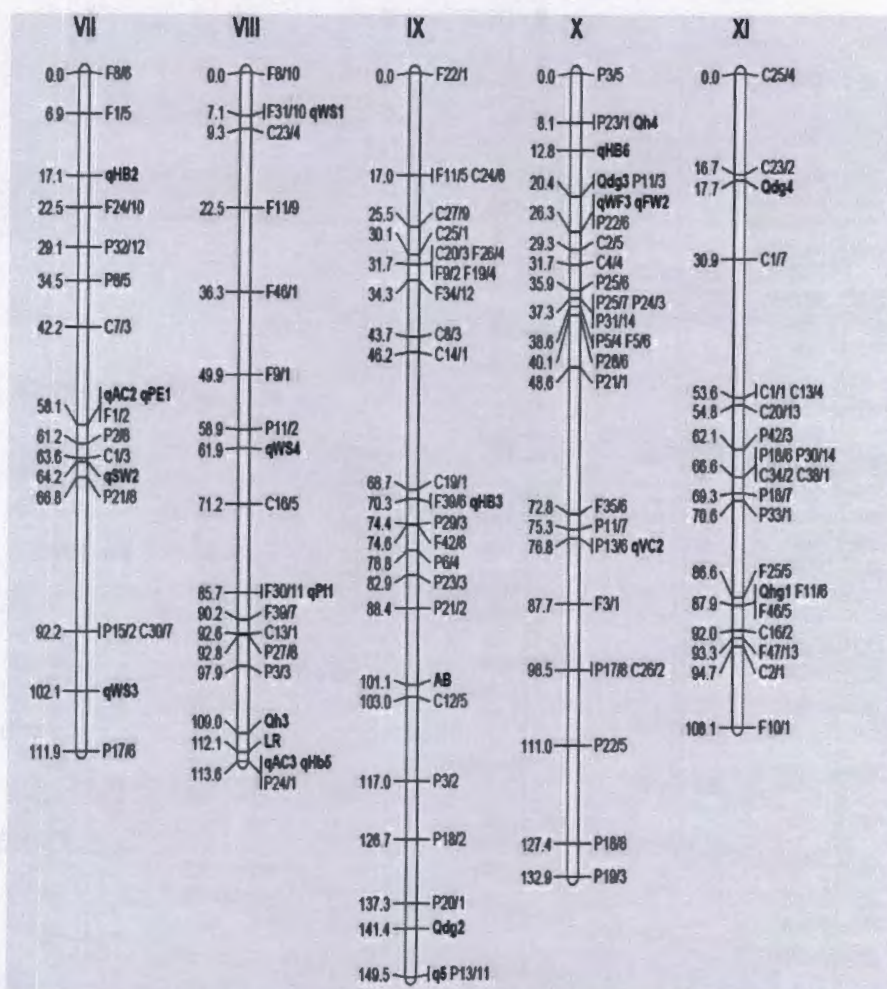


Figura 8. Mapa de ligamiento para la población de mapeo MP1. Los grupos de ligamiento son indicados en número romanos, se aprecia las distancias en cM a la izquierda. Los marcadores AFLP mapeados son listados por sus orígenes de sus parentales (P: parental 1, enana roja; F: Parental 2, N6; C: marcador común en ambos parentales) y la combinación de cebadores se enumeran en el recuadro superior (ejemplo: P17/3 es del parental 1, proveniente de la combinación de primer 17, con el fragmento específico no. 3). El mapeo de QTL es indicado con letras en negritas y abreviado como sigue: **l**: longitud de hoja; **h**: altura (HB para 1/2003- 7/2004); **lw**: ancho de hoja; **pl**: longitud del peciolo; **hg**: tasa de crecimiento para altura; **dg**: tasa de crecimiento para el diámetro; **FW**: ancho de fruta; **PE**: espesor interno de la pulpa; **AC**: acidez; **SW**: total de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix); **VC**: contenido de Vitamina C; **WS**: peso de las semillas

(Rodríguez *et al.*, 2007).

HIPÓTESIS

Sí las asociaciones QTL-SSR para características de interés agronómico encontradas para poblaciones cubanas también están presentes en guayabo mexicano, entonces éstos podrán ser empleados para la selección temprana de individuos con características agromorfológicas de interés.

1.9. OBJETIVOS

1.9.1. OBJETIVO GENERAL

- Validar el empleo de los microsatélites asociados a QTL de interés en guayaba mexicana para la selección de individuos.

1.9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de extracción de ADN y las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites asociados a características de interés en el germoplasma mexicano
- Seleccionar los cebadores SSR, en base a la capacidad discriminativa en individuos provenientes del banco de germoplasma del INIFAP.
- Validar los SSR, para la selección de características asociadas a estos, en diferentes genotipos de guayaba mexicana.

1.10. JUSTIFICACIÓN

El consumo de la guayaba y de productos derivados de fruta se ha incrementado durante los últimos años, para México el cultivo de guayaba representa más de un mil cien millones de pesos, lo que ubica a este cultivo dentro de los 21 frutales de mayor importancia económica en el país (SAGARPA, 2013). La capacidad de generar nuevas variedades de acuerdo a las necesidades del mercado es una oportunidad de generar mayores ingresos, ya que de acuerdo al producto final, el fruto debe tener ciertas características deseables. En el caso de jugos, el alto contenido de vitamina C (alrededor de 300 mg/100g) hace que sea usada para mejorar el contenido de vitamina C de otros jugos; el color rosa de la pulpa, el alto contenido en azúcares y un mayor rendimiento en la producción de derivados, así como frutas con poco contenido de semillas hacen a la

fruta deseable para la obtención de purés.

En México, se podrá aprovechar la gran variedad del género *Psidium* para el desarrollo de variedades con características de interés comercial, mediante el empleo de marcadores moleculares para la selección asistida (MAS), que permitirán transferir ciertas características de interés de una variedad a otra para que satisfaga las necesidades del consumidor. Aunque el principal producto de exportación es la guayaba en fresco, el desarrollo herramientas moleculares podría abrir nuevos mercados, como el de mermeladas, jaleas, pastas, jugos, entre otros productos mediante la aplicación de la selección asistida por marcadores para acelerar el proceso de obtención de nuevas variedades óptimas para este tipo de productos.

De forma general entre los países productores se observa una tendencia de la aplicación de MAS para la obtención de nuevas variedad con mayor producción y con característica deseables en el mercado. Por lo que comprobar que los QTL asociados a marcadores microsatélites desarrollados por Risterucci *et al.*, (2005), son aptos para la selección asistida por marcadores moleculares. Así esto, permitirá hacer más eficiente los programas de mejoramiento genético de guayaba en el país aprovechando la variedad de frutos de guayaba del país.

1.11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se utilizó en este trabajo se ilustra en la figura 9; en general, la estrategia se divide en tres apartados que incluye: 1) la estandarización de las técnicas a emplear, 2) el escrutinio y selección de los cebadores asociados a QTLs y 3) la validación del uso de estos cebadores microsatélites para la selección asistida por marcadores.

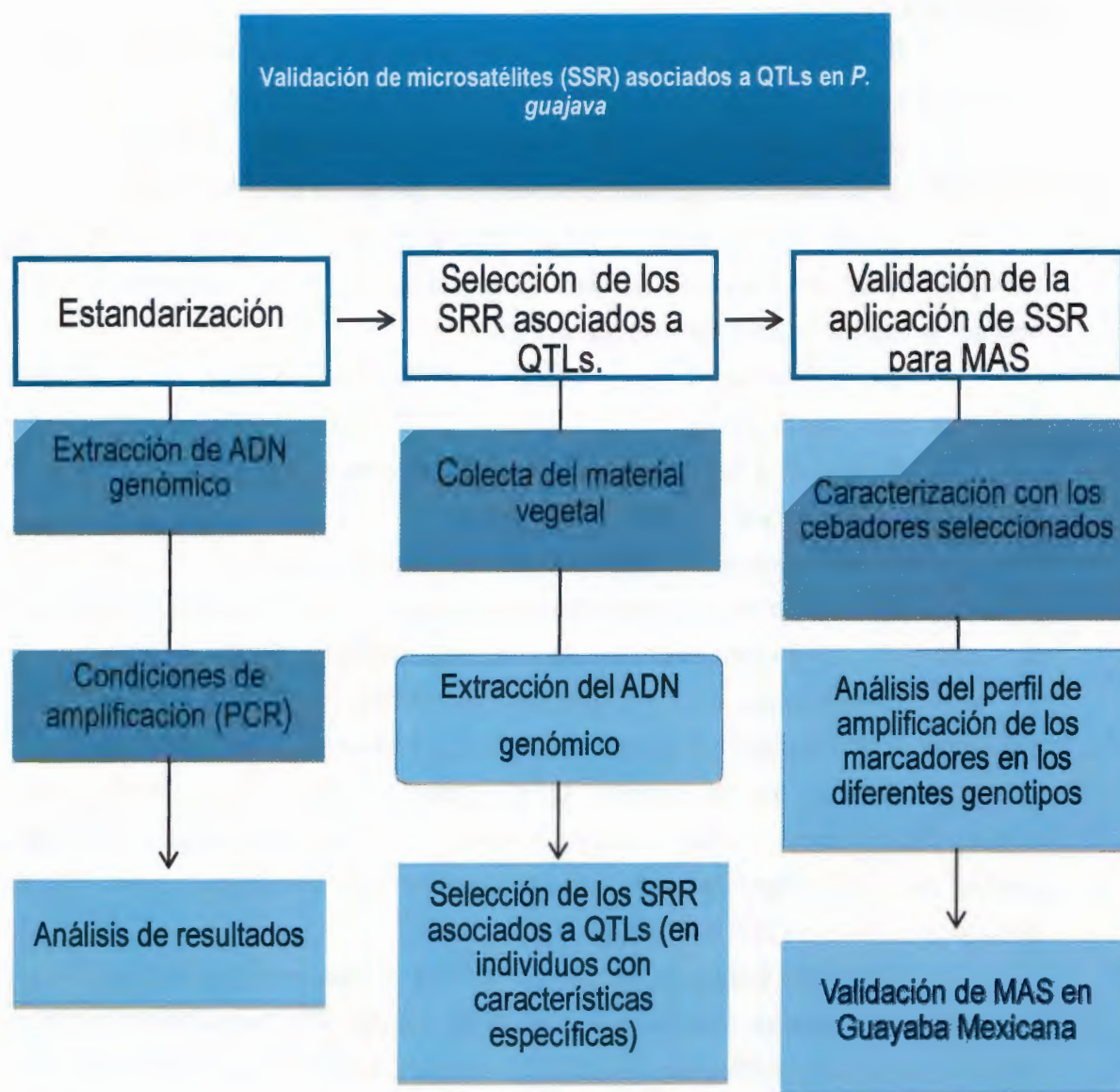


Figura 9. Estrategia experimental general del proyecto.

1.12. BIBLIOGRAFÍA

- Azofeita-Delgado, Álvaro. 2006. uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*. 17(2): 221-244.
- Base de datos del proyecto GUAVAMAP. Disponible en: <http://www.neiker.net/neiker/guavamap/Default.htm>. (acceso 2 abril del 2013)
- Billote, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci A.M., Baurens, F.C. 1999. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54 (4), 277-288.
- Blas L. Andrea, Yu Qingyi, Veatch J. Olivia, Paull E. Robert, Moore H. Paul, Ming Ray. 2011. *Mol Breeding*. Springer. DOI 10.1007/s11032-011-9562-1.
- Borém, A. y Caixeta, E. T. 2009. Marcadores moleculares. Ed. Folha de Viosa, eds. A. Borém y E. T. Caixeta... 532 p.
- Cázares-Sánchez, E. 2009. Variabilidad genética y efecto de deficiencias de B, Cu, Fe, Mn y Zn en guayabo (*Psidium guajava* L.) Tesis de doctorado. Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México.
- Cerón-Rojas, J.J. y Sahagún Castellanos, J. 2007. Estimating QTL biometrics parameters in F2 populations: a new approach. *Agrociencia* 41:57-73.
- Chen, C., Yu, Q., Hou, S., Li, Y., Eustic, M., Skelton, R.L., Veatch, O.J., Herdes, R.E., Diebold, L., Saw, J. 2007. Construcción of sequence tagged high-density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in Brassicales. *Genetics* 177:2481-2491
- Clegg, M., Cheng, H., Ashworth, V. 2004. Application of molecular markers to avocado improvement. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*. University of California, Riverside. California Avocado Commission, pp. 24-28
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to marker, quantitative trait loci (QTL), mapping and marker assisted selection for crop improvement. The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.
- Descripción botánica de *Psidium guajava*. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdf. (Consultado el 8 de junio del 2013)

- Ferreira, W. R., Williams, P.H., y Osborn, T.C. 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled-haploid lines. Theor. Appl. Genet. 89:815-821
- Foolad, M. R. y Sharma, A. 2005. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *Acta Hort.*, vol. 695, p. 225-240.
- Fundación Produce de Guerrero. 2012. Guayaba. Agenda de innovación, Guerrero.
- Garzón-Luz, N., Blair-Matthew, W. y Ligarreto, A. 2007. Use of molecular marker assisted selection for resistance to anthracnose in common beans. *Agronomía Colombiana*. 25(2), 207-214.
- González –Gaona, E., Padilla-Ramírez, J. S., Reyes-Muro, L., Perales de la Cruz M., Esquivel-Villagrana, F. 2002. Guayaba su cultivo en México. Pabellón de Arteaga, Ags., Mex. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campos Experimental Pabellón. ISBN 970-93214-0-4. 182p
- Gupta, P.K., Varshney, R.K. Sharma, P.C, Ramesh, B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *PlantBreed* 118:369–390
- Jones, N., Ougham, H. and Thomas, H. 1997, Markers and Mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137:165 -177.
- Kenneth, J.S., A. Litt, M. L. Zjhra, J. C. Pires. 2004. Clades, clocks and continents: historical and bopgeographical analysis of myrtaceae, Vochysiaceae and relatives in the southern hemisphere. *International Journal of Plnat Sciences* 165(4): S85-s105.
- Laksmi narayana, S. y M. A. Moreno R. 1978. Estudio preliminar para determinar la existencia de las variaciones en guayaba mexicana. *Chapingo* . No. 10:37-47
- Mapeo de QTL en guayaba. Consultado en <http://www.neiker.net/neiker/quavamap/for1-13.htm> y www.neiker.net/neiker/quavamap/for1-6a.htm el 2 abril del 2013.
- Martínez-Gómez, P. R., Sánchez-Pérez, M. Rubio, F. Dicenta, T. M. Gradziel y G.O. Sozzi. 2005 Aplication of recent biotechnologies to Prunu tree crop genetic imporvement. *Cien. Inv. Agr.* 32:73-96.

- Melchinguera, A.E., Utza, H.F. and C.C. Schon. 1998. Quantitative Trait Locus QTL Mapping Using Different Testers and Independent Population Samples in Maize Reveals Low Power of QTL Detection and Large Bias in Estimates of QTL Effects. *Genetics*, Vol. 149, 383 – 403.
- Miklas, P.N., Smith, J.R., and Singh, S.P. 2005. Release of USDKCBB-15 dark red kidney bean germplasm line with improved resistance to common bacterial blight. *Bean Improvement Cooperative* 48:192-193.
- Nakasone, H. Y. and R. E. Paul. 1998. *Tropical fruits*. Cab International. Pp: 149-172.
- Olmos, Sofía. 2004. Selección Asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. *Agrotecnia*. 12:23-31
- Padilla-Ramírez J. S., Reyes-Muro L., González-Gaona E. y Perales de la Cruz A. 2005. Taxonomía, morfología y composición del fruto del guayabo. En *Manual para la producción integral del cultivo de la Guayaba*. PP.: 8-11.
- Padilla-Ramírez, J.S., E. González G., F. Esquivel V. y F. Mercado S. 2001 b. Rendimiento y crecimiento de fruto de 12 selecciones de guayabo (*Psidium guajava*) de la región Calvillo- Cañones. En *Memorias del IX congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas*. Oaxtepec, Mor. P. 185
- Padilla-Ramírez, J.S., E. González G., F. Esquivel V. y F. Mercado S. 2001 c. Caracterización de selecciones de guayabo de la región Calvillo- Cañones basada en variables de fruto. En *Memorias del IX congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas*. Oaxtepec, Mor. p. 130
- Padilla-Ramírez, J.S., González G. S., Esquivel V. y F. Mercado S. 2001. Patrón de producción y calidad de fruto de selecciones de guayabo de la región Calvillo- Cañones. En *Memorias del IX congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas*. Oaxtepec, Mor. P. 74
- Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Paterson, S., Lincoln, S.E., and Tanksley, S.D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726.

- Perales de la C., M. A. y J. F. Silguero. 1995. Caracterización de colectas de guayabo (*Psidium guajava* L) de la región Calvillo- Cañones por forma y componentes del fruto. Agric. Téc. Mex. Vol.21(2): 195-203
- Perales de la C., M.A. 1993. Evaluación del rendimiento y calidad de fruta de colectas de guayabos tipo criollo de la región Calvillo-Cañones. En memorias del V Congreso Nacional de Horticultura. Veracruz, Ver. P.74
- Perales de la Cruz M. A.; Padilla Ramírez J.S; González Gaona E.; Héctor Rogelio Reyes Phillips. 2005. Manual para la producción integral del cultivo de la Guayaba. P 12-83.
- Risterucci, A.M., Duva, I M.F., Rohde W. and Billotte, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. molecular Ecology Notes 5, 745-748.
- Ritter, E., Herrán, A., Ariz, U., Muth, J., Billotte, N., O' Connors, A., Sanchez, Teyer L., Fermín, G., Santos, C. Rodríguez, M., Valdés-Infante, J., Rhode, W. 2008a. Comparative linkage mapping in three guava mapping populations and construction of an integrated reference map in guava. 2nd International Symposium on Guava and other Myrtaceae.
- Ritter, E., Herrán, A., Valdés J., Rodríguez, N., Briceño, A., Fermín, G., Sánchez, F., O' Connor A., Muth J., Boike J., Prüfer D., Santos C., Nunes dos Santos C., Rodríguez, M., Risterucci, A.M., Billote, N., Becker, D. y Rohde, W. 2010. Comparative linkage mapping in three guava mapping populations and construction of an integrated reference map in guava. Acta Hort. 849.
- Ritter, E., Rodríguez, N. y Rohde, W. 2008b. Análisis de QTL en guava. 2nd International Symposium on Guava and other Myrtaceae.
- Rodríguez, N., Valdés-Infante, J., Becker D., Velázquez, B., González, G., Sourd, D., Rodríguez, J., Billotte, N., Risterucci, A. M., Ritter, E. y Rohde, W. 2007. Characterization of guava accessions by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTL for vegetative and reproductive characters. Proc. 1st IS on Guava, Eds. G. Singh et al. Acta Hort, 735, ISHS 2007.
- Rodríguez, N.N., Fermín, G.A., Valdés-Infante, J., Velásquez, B., Rivero, D., Martínez, F., Rodríguez, J., Rohde, W. 2010. Illustrated descriptors for guava

(*Psidium guajava* L.). Proceedings of the Second International Guava Symposium, México, Acta Horticulturae. N°. 849:103-113.

- Rohde, W. 2008. The GUAVAMAP Project. In abstracts 2nd International Symposium on guava and other *Myrtaceae*. Mérida, México. P. 81

- SAGARPA. 2013. Sistema Producto Guayaba. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. (consultado el día 2 de Abril del 2013)

- Sánchez, Teyer L. F., Barraza-Morales A., Keb, L., Barredo, F., Quiroz-Moreno A., O' Connor A. and Padilla-Ramírez, J.S. 2008 Assessment of genetic diversity of mexican guava using molecular markers. In: Abstracts of the 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. Eds: W. Rhode and G. Fermin. México. Pp: 15.

- Sánchez-Teyer, L. F., Cabrera-Espadas, L. M., Becerril-Chi, K., Verdugo-Figueroa L., Quiroz-Moreno, A. 2010. Single Sequence Repeats 20 years later and its application for assessing Genetic Diversity un Guava. Proc. Is on Molecular Markers in Horticulture. Eds: N.V. Bansil and R. Martin. Acta Hort. 859, ISHS 2010.

- Schuster, I. y Cruz, C.D. 2004. Estadística Genómica Aplicada a Populacoes Derivadas de Cruzamientos Controlados. Univesidade Federal de Vicosa, Vicosa, Brasil, 568 pp.

- Soller, M. & Beckmann, J.S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic inprovement. Theor. Appl Genet. 67:25-33.

- Teran, Henry. 1999. Análisis de QTLs para un solo marcador. Seminario II. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Escuela de posgrados. Área de Fitomejoramiento. Diciembre 2. 25 p.

- Valdés-Infante, J. 2009. Utilización de caracteres morfoagronómicos y de marcadores de AND para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava* L) en Cuba. Tesis de doctorado en ciencias Biológicas. Facultad de Biología. UH. Cuba. 100p

- Valdés-Infante, J. Nerdo-Rodríguez, N., Bárbara, Velásquez, J., Gaspar-Sourd D., González,G., Alberto-Rodríguez, J., Rohde, W. 2012. Herramientas para un

programa de mejoramiento genético del Guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba. *Agronomía Costarricense* 36(2): 111-129. ISSN: 0377-9424.

- Valdés-Infante, J. Rodríguez-Medina, N.N., Bautista-Alor, M., Ortiz-García M.M., Quiroz-Moreno, A., Sánchez-Teyer, L.F., Risterucci, A. M., Rohde, W. 2010. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XII No. 1. Pp 64 – 67.

- Valdés-Infante, J., Becker, D., Rodríguez, N.N., Velázquez, B., González, G., Sourd D., Rodríguez, J., Ritter, E., Rohde, W. 2003. Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. *J. Genet., y Breed* 57: 349-358.

- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N.N. 2003b. Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales tropicales., <http://fao.cubasi.cu> (Sitio virtual de la FAO). 25 p.

- Valverde, Roberto. 2007. Mapeo Genético y Detección de QTLs en Especies de *Solanum*. *Agronomía Costarricense* 31(2): 31-47. ISSN: 0377-9424.

- Vodenicharova, M.S. 1989. Use of proteins as molecular genetic markers in plants. *Genetics Selection* 22:269-277.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker M., Reojans, M., Van De Lee, T., Homes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23:4407-4414

CAPÍTULO II

ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y LAS CONDICIONES DE PCR PARA LOS CEBADORES MICROSATÉLITES ASOCIADOS A QTL DE INTERÉS

2.1. INTRODUCCIÓN

Unos de los principales problemas para aislar el ADN de plantas, es la presencia de macromoléculas como los compuestos fenólicos, proteínas, carbohidratos y enzimas, principalmente, que se encuentran asociadas a él y dificultan su extracción ya que se aíslan de manera simultánea durante el proceso de purificación (Cázares-Sánchez, 2009). En las hojas de guayabo, se ha detectado la presencia de compuestos fenólicos (ácidos gálico, ferúlico, procatecuico, clorogénico, psidiólico y cafelco), flavonoides (quercetina, avaculatina, guaijaverina y kampferol) , un alto contenido de taninos, entre otros compuestos (Gutiérrez *et al.*, 2006). En el caso de las hojas de guayabo que tienen un alto contenido de estos compuestos es importante la eliminación de estos, pues de no hacerlo interfieren de manera negativa con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Valdés y Kahl, 2000). Tomando en cuenta esto, este primer capítulo se enfocó en probar dos métodos de extracción de ADN que permitieran la eliminación de los productos de los procesos oxidativos y obtener ADN de buena calidad para llevar a cabo los análisis posteriores. Una vez que se estandarizó el método de extracción de ADN se evaluaron las condiciones de PCR reportadas por Rodríguez *et al.*, 2007 para algunos cebadores microsatélites asociados a QTL para determinar las condiciones y las temperaturas de la PCR.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

El tejido vegetal para el experimento fue colectado en el INIFAP, proveniente del banco de germoplasma del sitio experimental "Los cañones" en Huanusco Zacatecas, esta colección consta de cerca de 200 accesiones que han sido colectadas a lo largo de todo el país, las cuales en un periodo de cinco años consecutivos han sido caracterizadas morfológicamente para sus frutos. De esta colección se colectaron 90 individuos en total,

cinco colectados en una primera ocasión para la estandarización y los 85 restantes fueron colectados en una segunda colecta, tomando en cuenta para su selección, plantas de apariencia sana, que hayan producido fruto en un periodo mayor a 3 años, los cuales serán usados para la validación de los marcadores. Para el estudio se colectaron ramas jóvenes de entre 13 y 15 hojas por rama, las cuales fueron almacenadas para su transporte en cajas de cartón, y a la llegada al laboratorio se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un ultra congelador a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN, la estandarización se realizó primero con cinco individuos y posteriormente se extrajo el ADN del resto de la colecta, cabe mencionar que los cinco individuos usados en la extracción fueron colectados en una primera colecta y fueron almacenados a -80°C el mismo día de la colecta, mientras que el resto se colectó en una segunda ocasión, los cuales permanecieron a temperatura ambiente por tres días hasta la llegada al laboratorio. La información de las características de estos árboles y sus frutos se muestran en el cuadro 5. Estos datos serán empleados posteriormente para la validación de los SSR.

Estandarización de las técnicas de extracción de ADN y las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites asociados a
QTL de interés

Cuadro 5. Características de las accesiones colectadas (INIFAP)

No.	Etiqueta	Línea	Árbol	Estado	Peso Fruto	Diam. Ec.	GEP	GIP	C. Pulpa	*Brix	No. Sem	Acidez	IM	vitamina C
1	59	L-1	A-1		339	8.7	1.37	7.33	B	10.9	652.5	IND	IND	IND
2	67	L-1	A-4	SLP	29.3	3.68	0.53	3.14	B-C	13.38	164.5	IND	IND	IND
3	31	L-1	A-6	Jal.	26	3.54	0.5	3.03	C	13.96	132.8	IND	IND	IND
4	29	L-1	A-12	SLP	58.4	4.69	0.56	4.13	C	9.84	262	IND	IND	IND
5	79	L-1	A-16	Ags	63.4	4.64	0.63	4.01	R	11.92	152	IND	IND	IND
6	100	L-2	A-1	Pue.	17.8	3.07	0.43	2.63	R	10.2	118.2	IND	IND	IND
7	57	L-2	A-6		33.29	3.86	0.56	3.3	C	12.03	153	IND	IND	IND
8	58,-65	L-2	A-18		32.17	3.47	0.6	2.87	Sal-C	9.13	134.17	IND	IND	IND
9	82	L-2	A-23	Pue.	41	4.18	0.64	3.54	C	12.12	138	IND	IND	IND
10	93	L-3	A-1	Pue.	17.14	3.14	0.45	2.68	C	15.63	148	IND	IND	IND
11	36	L-3	A-3	Mich	50.8	4.37	0.62	3.75	C	14.72	223.2	IND	IND	IND
12	49	L-3	A-6	SLP	26	3.59	0.63	2.95	B	12.12	82.2	IND	IND	IND
13	51,-77	L-3	A-7		35.29	3.86	0.56	3.31	Sal	14.06	144	IND	IND	IND
14	50,-53	L-3	A-10	Nay	30.67	3.67	0.6	3.07	C	14.23	140	IND	IND	IND
15	86	L-3	A-14		33.29	3.8	0.55	3.25	B	10.37	182.29	IND	IND	IND
16	98	L-3	A-17	SLP	30.2	3.58	0.63	2.95	C	12.48	186	IND	IND	IND
17	90	L-4	A-10	Nay	25.43	3.38	0.41	2.97	Sal	10.89	392.57	IND	IND	IND
18	78	L-4	A-12	Mich	41.2	4.04	0.6	3.44	S-C	10.4	154.8	IND	IND	IND
19	89	L-4	A-14	Jal.	29	3.53	0.69	2.84	C	13.92	122.2	IND	IND	IND
20	92	L-5	A-1	Zac	54.5	4.48	0.77	3.71	C	14.5	136.25	IND	IND	IND
21	35,-62	L-5	A-3	Zac	40.4	4.05	0.53	3.52	C-N	13.64	242.6	IND	IND	IND
22	80	L-5	A-4	Gto.	101.43	5.46	0.82	4.64	B	10.51	321	IND	IND	IND
23	84	L-5	A-5	Zac	39.4	3.93	0.57	3.36	C	14.24	146.4	IND	IND	IND
24	55	L-5	A-8	Jal.	83.5	5.05	1.2	3.85	R-B	15.4	85	IND	IND	IND

Estandarización de las técnicas de extracción de ADN y las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites asociados a QTL de interés

26	85	L-5	A-21		36.8	3.97	0.83	3.14	C	12.8	113.4	IND	IND	IND
27	61	L-5	A-23	SLP	40.29	4.21	0.52	3.7	C	11.09	195.43	IND	IND	IND
28	27	L-6	A-1		26	3.55	0.49	3.06	C	14.52	142.2	IND	IND	IND
29	76	L-6	A-5		117.5	5.73	0.92	4.81	B	11.7	186.25	IND	IND	IND
30	99	L-6	A-15	Mich	35.8	3.87	0.47	3.39	C	12.12	153	IND	IND	IND
31	52	L-6	A-18	Jal.	67.8	4.74	0.71	4.03	R	11.32	185.2	0.84	13.76	IND
32	25	L-6	A-24	Jal.	41	4.19	0.64	3.55	B-R C-R	12.28	260.4	IND	IND	IND
33	40	L-7	A-1	Zac	51.2	4.23	0.75	3.47	C	13.28	137.2	IND	IND	IND
34		L-7	A-11		55	4.58	0.88	3.7	R-B	14.56	99.6	IND	IND	IND
35	8	L-7	A-14	Jal.	93.57	5.01	0.85	4.18	R	10.57	133.57	IND	IND	IND
36	33,91	L-8	A-2	Tab.	416.6	8.83	1.67	7.15	B-C	13.4	408	IND	IND	IND
37	9	L-8	A-11	Nay	61.2	4.64	0.58	4.06	N-Sal	11.24	371.8	IND	IND	IND
38	12	L-8	A-15	Ags	42.8	4.1	0.74	3.36	B	15.32	135.8	IND	IND	IND
39	41	L-8	A-21	Gto	39.2	4.05	0.74	3.31	C	12.84	88.6	IND	IND	IND
40	101	L-8	A-22	Nay.	24.83	3.51	0.55	2.96	B-C	12.37	86.5	IND	IND	IND
41	23	L-8	A-23	SLP	47.6	4.11	0.69	3.42	C-Sal	12.64	150	IND	IND	IND
42	72	L-9	A-1	Col	32.2	3.68	0.5	3.18	B	11.56	188.8	IND	IND	IND
43	75-88	L-9	A-5	Col	33.4	3.83	0.57	3.27	C	10.24	61	IND	IND	IND
44	38	L-9	A-11	Nay	55.43	4.48	0.62	3.86	R	9.66	305	IND	IND	IND
45	13	L-9	A-17	Nay	46.43	4.35	0.6	3.75	N	9.57	199.71	IND	IND	59.85
46	19	L-9	A-19	Tam	60.2	4.71	0.65	4.06	C	10.12	253.2	IND	IND	IND
47	46	L-10	A-1	India	84.67	5.34	0.79	4.55	R	13.33	303.33	1	14.41	384.83
48	11	L-10	A-3	India	163	6.3	0.86	5.45	B	8.28	367.8	IND	IND	IND
49	73,81	L-10	A-5	India	185.6	7.16	1.37	5.79	B-C	9.12	439	IND	IND	IND
50		L-10	A-7	India	86	5.6	0.98	4.62	R	14.11	189.71	IND	IND	IND
51	2	L-10	A-11	India	179.4	6.82	1.19	5.62	B	12.08	326.8	IND	IND	IND
52	71	L-11	A-1	Mich	79	5.04	0.89	4.14	R	9.88	208.2	IND	IND	IND

Estandarización de las técnicas de extracción de ADN y las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites asociados a
QTL de interés

53	28	L-11	A-5	Jal.	52.33	4.42	0.65	3.77	C-Sal	13.93	117	IND	IND	IND
54	87	L-11	A-8	Nay	64.86	4.78	0.62	4.16	R	9.71	365.29	IND	IND	IND
55	56	L-11	A-10	Nay	55.57	4.54	0.98	3.57	B	8.51	70.29	IND	IND	IND
56	34	L-11	A-16	Col	21.6	3.35	0.53	2.82	C	6.96	127.2	IND	IND	IND
57	39	L-12	A-2	Zac	92	5.3	0.66	4.64	A-N	11.64	411.6	IND	IND	164.87
58	6	L-12	A-9	Zac	98.83	5.44	0.85	4.59	R-B C	9.97	240.67	IND	IND	IND
59	94	L-12	A-16	Zac	74.2	4.9	0.76	4.15	S-N-S	11.08	136.2	IND	IND	IND
60	47	L-13	A-1		70.67	4.78	0.85	3.93	R	12.4	173.67	1.09	12.08	
61	21	L-13	A-19	Colom bia	63	4.71	0.77	3.93	R	7.83	241.83	IND	IND	IND
62	14	L-13	A-21	Colom bia	74.8	4.96	0.8	4.16	C	9.32	238.8	IND	IND	IND
63	17	L-13	A-24	Colom bia	40	4.21	0.62	3.59	N-Sal	8.8	141	IND	IND	IND
64	16,63	L-14	A-9	Brasil	91.28	5.17	1.07	4.1	R	8.44	199.11	IND	IND	IND
65	97	L-14	A-24	EdoM ex	103.4	5.42	0.65	4.78	R-F	9.96	263	IND	IND	IND
66	7,45	L-15	A-9		76.2	4.99	0.76	4.23	C-Sal	11.32	249.2	IND	IND	IND
67	26	L-15	A-14	Edo.	41	4.08	0.68	3.4	R	10.08	194.6	IND	IND	IND

Estandarización de las técnicas de extracción de ADN y las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites asociados a QTL de interés

Méx.														
78	4,-22	L-16	A-9		94.67	5.27	1.19	4.09	R	11.47	67.67	IND	IND	IND
79	1,-24	L-16	A-10		162.5	6.31	0.97	5.34	R	13.1	254.5	IND	IND	201.78
80	32	L-17	A-21	Nay.	IND.	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND
81	54	Selec	A-3	Zac	60	4.6	0.55	4.05	C	11.5	315	1.02	11.76	162.01
82	43	Selec	A-20	Zac	65	4.9	0.6	4.3	C-Sal	11	315	IND	IND	IND
83	18	Selec	A-24	Zac	90	5.5	1	4.5	R	10	320	1.25	13.22	188.48
84	48	Selec	A-33	Zac	70	5	0.7	4.3	B	11	370	IND	IND	IND
85	44	Selec	A-46	Zac	55	4.7	0.56	4.14	C	11.5	200	IND	IND	IND

Peso Fruto (g); DE: Diam. Ecuatorial (cm); GEP: Grosor Externo de Pulpa (cm); GIP: Grosor Interno de Pulpa (cm); Color de Pulpa; No. de Semillas: Acidez (mg/100g de pulpa): Vitamina C (mg/100g de pulpa)
 Color de Pulpa: B:Blanca; C:Crema; R:Rosa; Sal:Salmon;
 N:Naranja; A:Amarilla

Los datos de las características del fruto se obtuvieron en el ciclo 2008, 2009, 2010, 2012 y corresponden al promedio de 3 a 5 frutos por árbol.

Selec: Selección
 IND; INFORMACION
 NO DISPONIBLE

2.2.2. Aislamiento y purificación del ADN

Para la extracción del ADN genómico se probaron dos métodos, i) El propuesto por Echeverría *et al.* (2005) y ii) El kit de purificación ChargesSwitch de invitrogen (no. Cat: CS18000). Posteriormente se realizaron modificaciones al kit de purificación ChargesSwitch, con el fin de eliminar compuestos fenólicos, proteínas y carbohidratos que pudieran interferir en pasos posteriores. Para este fin se añadió, al momento de la maceración del tejido congelado, una pizca de PVPP y adicionando inmediatamente después nitrógeno líquido para conservar congelado el tejido durante la maceración.

La integridad del ADN se observó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en TBE 1x, corridos durante 15 minutos a 85 volts teñido con EtBr. El ADN total extraído se cuantificó por medio de espectrofotometría con el equipo NanoDrop 1000 (Thermo scientific). Para corroborar que el ADN extraído permitiera la reacción de la polimerasa se realizó una PCR usando cebadores universales para la región del ADNr 18s. Las condiciones de la PCR fueron: volumen final de la reacción 20 µl, que contenía buffer de PCR 1X, 10 mM de dNTP, 10 pM de cada cebadores (Forward y Reverse) y 1U de Taq polimerasa y 25ng de ADN blanco. El programa incluye la desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, temperatura de alineamiento 64°C por 1 minuto y 30 segundos, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min.

2.2.3. Amplificación de las regiones Microsatélites

Para las amplificaciones de los microsatélites, se utilizó el protocolo de Rodríguez *et al.* (2007), el cual consta de las siguientes condiciones de reacción: para la amplificación se utilizó un volumen final de 20 µl que contenía: 2 ng de ADN genómico, Buffer de PCR 1X, 10 mM de dNTP, 10 pM de cada cebadores (Forward y Reverse) y 1U de Taq polimerasa. El programa incluye los siguientes pasos: Desnaturalización inicial a 94° C por 3 min; seguido de una desnaturalización a 94°C por 45 segundos; alineamiento a 55° C por 60 s; y la extensión final a 72° C por 30 esto por 35 ciclos, por ultimo una extensión final a 72°C por 20 min y un hold a 10°C. Para la visualización del producto de amplificado se realizó una electroforesis en agarosa al 3%, con TBE 1X, el amplificado fue teñido con EtBr.

2.3. RESULTADOS

En las técnicas de biología molecular es importante la obtención de ADNg de calidad, por lo cual se probaron dos métodos de extracción, para identificar que protocolo permita la purificación del ADN de hojas de guayaba que como se mencionó anteriormente, tiene altos contenido de compuestos fenólicos que reducen la calidad del ADN y un alto contenido de polisacáridos. Con el protocolo propuesto por Echeverría *et al.* (2005), no se logró la extracción de ADN, debido a que centrifugar para precipitar la silica, se formaba una pasta que se adhería a las paredes internas del tubo, lo cual impedía la formación de la pastilla que generalmente precipita hacia el fondo del tubo y no se podía continuar con el protocolo, lo cual es probable que sea causado por los polisacáridos presentes en las hojas que tienden a formar un aglomerado pegajoso con el ADN dificultando su manejo (Porebski *et al.*, 1997; Cázares-Sánchez *et al.*, 2009).

Para el caso del kit de purificación de ADNg ChargeSwitch, al realizarlo como se recomienda por el fabricante, si se lograba extraer ADN; sin embargo había casos en los que al añadir las perlas y mezclar por pipeteo, estas perlas se aglomeraban y no se resuspendían homogéneamente en la solución buffer (DI al 10%) , en otros casos, el ADN tomaba una coloración rojiza al ser resuspendido, posiblemente por la presencia de fenoles en el ADN que impiden las amplificaciones de fragmentos en la PCR. En este sentido se procedió a realizar una modificación al inicio, durante la maceración se le añadió polivinilpirrolidona (PVPP). Al realizar la modificación se logra eliminar estos compuestos, esto se observa en la figura 10, donde se muestra dos tubos, el primer tubo (Izq) el extracto realizado por ChargeSwitch añadiendo la pisco de PVPP al momento de macerar y en la figura de la derecha se muestra el resultado de la extracción por el protocolo sin modificación, donde se aprecia que el extracto de ADN se torna de color pardo.

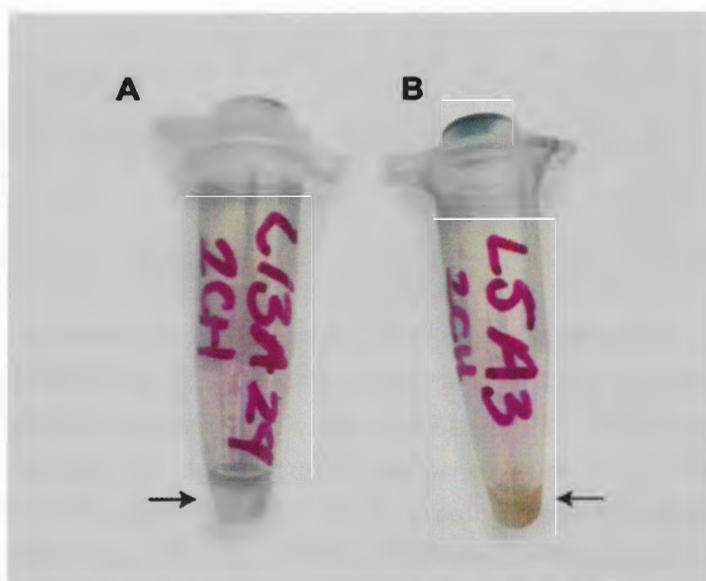


Figura 10. Coloración de las extracciones obtenidas por medio del Kit Chargeswitch. A) ADN purificado añadiendo PVPP durante la maceración; B) ADN purificado siguiendo el protocolo del kit sin modificación.

Se extrajo el ADN de las 5 muestras que se utilizaron para la estandarización, añadiendo PVPP durante la maceración, se estimó la concentración de ADN y la calidad de las muestras por espectrofotometría con el equipo NanoDrop 1000 (Thermo scientific). Las muestras con mayor pureza se obtuvieron mediante la segunda elusión del ADN ($260/280=1.6$), con una concentración en promedio de 60 ng/ μ l, mientras que para la primera elusión la calidad fue menor ($260/280=1.2$) y una concentración mayor 80 ng/ μ l, por lo que se decidió continuar con las muestras de la segunda elusión, probablemente el aumento en la calidad, sea debido a que durante la primera elusión la mayoría de los contaminantes se hallan purificado junto con el ADN y para la segunda elusión la concentración de estos en el extracto haya sido mucho menor, esto se aprecia en los geles de integridad del ADN (figura 11).

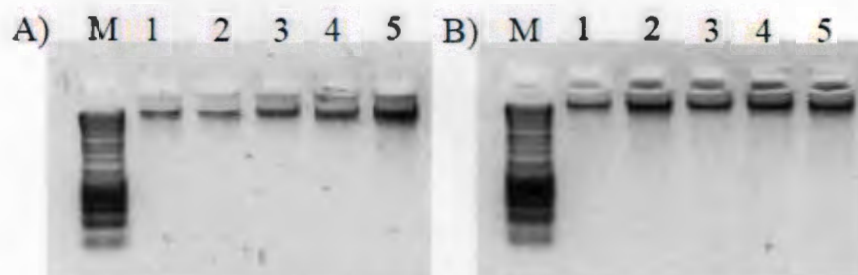


Figura 11. ADN_g extraído con el kit Chargeswicht modificado. Primera y segunda elusión. Electroforesis en agarosa al 1.5% del ADN_g extraído con el kit de ChargeSwitch. M: marcador de 1kb plus (Invitrogen), teñido con EtBr. Carriles del 1 al 5 extracciones de ADN_g para las muestras de guayaba empleadas para la estandarización (L2A3, L1A20, L1A34, L1A45, S54). (La figura A, muestra el ADN obtenido en la primera elusión para cinco individuos de la colección ex situ; la figura B) muestra el ADN obtenido en la segunda elusión para los mismos cinco individuos.

Con la finalidad de determinar si el ADN extraído es óptimo para la PCR, se utilizaron los cebadores para amplificar la región 18S. Se observó la amplificación esperada (alrededor de 200 pb) para cada una de las muestras, indicando con esto que el ADN, es de buena calidad y que permite la amplificación del ADN (figura 12).

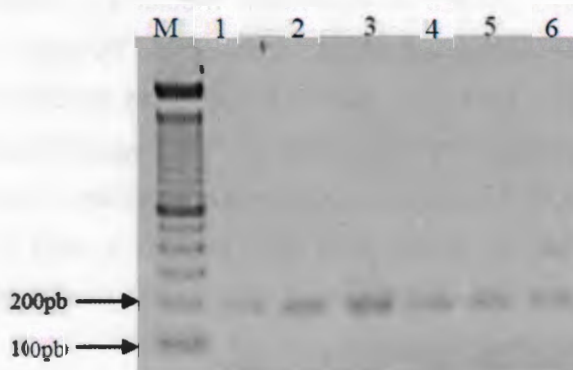


Figura 12. Amplificación de fragmentos de ADN_r 18s a partir de hojas guayaba extraídas por el kit de ChargeSwitch modificado. Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con EtBr. M: marcador de 1kb plus (Invitrogen), carriles del 1 al 5 extracciones de ADN_g para las muestras de guayaba empleadas para

Estandarización de las técnicas de extracción de ADN y las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites asociados a QTL de interés

la estandarización (L2A3, L1A20, L1A34, L1A45, S54); carril 6: control positivo.

Una vez que se estandarizó la técnica de extracción de ADN, se procedió a probar las condiciones de PCR para los microsatélites que reporta Rodríguez *et al.* (2007). Empleando este protocolo se seleccionaron 3 cebadores (mPgCIR 163, mPgCIR 161 y mPgCIR 243), los cuales fueron probados solo en 5 individuos, logrando amplificar los fragmentos del tamaño esperado 168, 246 y 174 pb respectivamente (Figura 13).

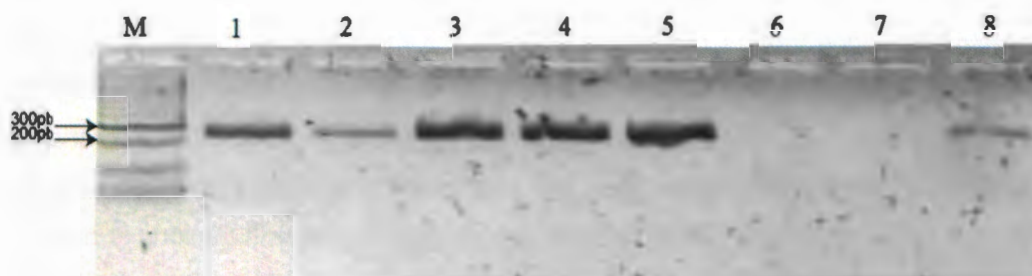


Figura 13. Estandarización de las condiciones de PCR para los cebadores asociados a QTLs. Electroforesis en agarosa al 3% del producto de amplificación, teñido con EtBr. M: marcador HyperLadder II (Bioline), carriles del 1 al 5 extracciones de ADNg para las muestras de guayaba empleadas para la estandarización (L2A3, L1A20, L1A34, L1A45, S54); carril 6: control negativo; carril 7 y 8 corresponden a individuos de las variedades Belic y Enana como control de amplificación. En la figura se muestra los productos de amplificación para el cebador mPgCIR 161, aproximadamente en el tamaño esperado de amplificación (246 pb).

2.4. DISCUSIÓN

Obtener ADN de calidad es necesario para cualquier estudio molecular que se quiera llevar a cabo (Arbi *et al.*, 2009), uno de los principales problemas para aislar el ADN de plantas, es la presencia de macromoléculas como los compuestos fenólicos, proteínas, carbohidratos y enzimas, principalmente, que dificultan su extracción ya que se aíslan de manera simultánea durante el proceso de purificación (Cázares-Sánchez, 2009), para plantas superiores los protocolos que emplean CTAB y tiempos largos de incubación para la extracción del ADN, generalmente se obtiene un ADN de baja calidad, con presencia de polifenoles y polisacáridos que impiden continuar con los estudios moleculares de manera normal (Manning, 1991; Murray and Thompson, 1980), se han descrito varias

modificaciones a estos protocolos como la adición de PVP para disminuir la concentración de fenoles, la reducción de los tiempos de incubación para disminuir la oxidación, entre otras modificaciones para poder obtener ADN de calidad de plantas con abundancia de estos compuestos (Haque *et al.*, 2008; Michiels *et al.* 2003; Porebski *et al.*, 1997), la obtención de ADN de calidad permite almacenarlo por periodos largos de tiempo sin riesgo de degradación, así como evitar la inhibición de la polimerasa por la presencia de compuestos fenólicos y otros pigmentos (Valdés y Kahl, 2000), como se ha reportado la presencia de estos compuestos tñe la extracción de una coloración rojiza (Schlink and Reski, 2002; Fang *et al.*, 1993), como sucede con guayaba, es de esperar que al añadir el PVPP, el cual presenta afinidad por los polifenoles, los adsorba y se eliminan al precipitarse junto con el tejido vegetal durante el paso de centrifugación, el mecanismo acción de este reactivo se basa en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos y el oxígeno del grupo amida del anillo pirrolidona del PVPP, de esta forma, el PVPP arrastra consigo los compuestos fenólicos que a él se enlacen, eliminándolos del medio. Dentro del grupo de polifenoles, el PVPP adsorbe preferentemente aquellos que poseen un mayor grado de hidroxilación, como los taninos, los cuales son abundantes en los tejidos de guayaba, otro compuesto abundante en las hojas de guayaba, son los polisacáridos, los cuales se han reportado que al entrar en contacto con la Silica, generan una pasta pegajosa que impide continuar de manera normal el protocolo (Porebski, 1997), este compuesto junto con los fenoles son de los principales en las hojas de guayaba, lo cual indicaría porque el protocolo propuesto por Echeverría *et al.* (2005), no pudo emplearse de manera satisfactoria para guayaba. Se ha reportado para Anona (*Annona squamosa* L.) que al igual que en guayaba, sus hojas presentan un alto contenido de polisacáridos y fenoles, una de las principales modificaciones fue la adición de PVP para prevenir la oxidación debido a los polifenoles (Rakhi *et al.*, 2012), similar a la estrategia seguida en este estudio, en el que la adición de PVPP permitió la obtención de ADN óptimo para realizar la reacción de la polimerasa, esto se observa al obtener los extractos sin la coloración rojiza que se observaba al realizar el protocolo sin el PVPP, lo cual indica que se disminuyó la presencia de estos ya que se sabe que esta coloración está relacionada a la presencia de estos compuestos Fang *et al.*, 1993; Schlink and Reski, 2002). Una de las principales ventajas del kit Chargeswitch sobre los protocolos

convencionales de extracción de ADN, son los tiempos cortos de incubación que como reporta Rakhi *et al.*(2012), es fundamental reducir estos tiempos para evitar el daño por oxidación y disminuir la concentración de fenoles, además que la tecnología del uso de perlas cargadas eléctricamente para la recuperación de ADN, permite separar de manera más eficiente a los compuestos como los polisacáridos que pudieran asociarse al ADN, sobre todo por el doble lavado que se le realiza a la pastilla con el ADN, lo que permite tener una extracción más pura, otra característica de este Kit, es que permite hacer una segunda elusión, la cual por lo general permite obtener ADN en menor concentración (50-100 ng/μl) con respecto a la primera elusión, pero de mucho mayor calidad (1.6 de relación 260/280).

Con base en estos resultados se concluye que para tejidos de hoja de guayaba el protocolo de ChargeSwitch modificado permite la obtención de ADN de buena calidad, se recomienda el uso del PVPP durante el macerado para evitar la oxidación del tejido, además de trabajar con las segundas elusiones, que si bien tienen una menor concentración de ADN, la calidad es mucho mayor. Para las condiciones de PCR para los cebadores microsatélites, las cuales han sido previamente establecidas por Rodríguez *et al.* (2007) son las adecuadas para la obtención de producto de amplificación, lo que permitirá realizar los estudios posteriores.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Arbi, G., Naceur, B., Chokri M., Mohamed, N. 2009. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum* L. (Alliaceae). African J. Biotech. 8:4020-4024.
- Cázares-Sánchez, E. 2009. Variabilidad genética y efecto de deficiencias de B, Cu, Fe, Mn y Zn en guayabo (*Pidiumguajava*L.) Tesis de doctorado. Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México.
- Echeverría-Machado, I., Sánchez-Cach, L.A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R. and Moreno Valenzuela, O. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilagenus plants tissues. Molecular Biotechnology.31:129-135

- Fang, G., Hammar S., Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for preparation of DNA from tissues of Yam (*Dioscorea* spp). Plant Molecular Biology Reporter 17, 9-14.
 - Gutiérrez, G., Y.I., Martínez, M., O. Bilbao, R., J. de la Paz N. y Rodríguez, L. E. 2006. Suspensión oral antidiarreica de *Psidium guajava* L. revista cubana de farmacología 34(1): 44-49
 - Haque, I., Bandopadhyay, R., Mukhopadhyay, K. 2008. An optimized protocol for fast genomic DNA isolation from high secondary metabolites and gum containing plants. Asian J Plant Sci. 7(3):304-308.
 - Manning, K. 1991. Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. Anal Biochem. 195:45-50
 - Michiels, A., Van den Ende, Tucker, M., Van, Riet L., Van, LAere A. 2003. Extracción de high quality genomic DNA from latex containing plants. Anal Biochem 315: 85-89.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol Biol, Rep 15:8-15.
- Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. Plant Biology Reporter 15, 8-15.
 - Rakhi, Nagori and Sunil, Dutta. 2012. An improved method for DNA isolation from polyphenols rich leaf samples of *Annona squamosa* L. Plant Biotechnol. 21 (1): 140-143.
 - Rodríguez, N., Valdés-Infante, J., Becker, D., Velázquez, B., González, G., Sourd, D., Rodríguez, J., Billotte, N., Risterucci, A. M., Ritter E. y Rohde, W. 2007. Characterization of guava accession by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTL for vegetative and reproductive characters. Proc. 1st IS on Guava, Eds. G. Singh et al. Acta Hort, 735, ISHS 2007.
 - Schlink, K., Reski, R. 2002. Preparing high quality DNA from moss (*Physcomitrella patens*). Plants Molecular Biology Reporter, 20, 423a-423f.
 - Valdés, M., E., y Kahl G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas.
- Edit. Mundi-prensa, México D.f. 147p

CAPÍTULO III

SELECCIÓN DE LOS SRR ASOCIADOS A QTLS DE INTERÉS EN GUAYABO MEXICANO

3.1. INTRODUCCION

Se considera que la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) es una herramienta importante en los programas de mejoramiento vegetal, pues ayuda a hacerla más eficiente. Una manera de ver esta herramienta es como un complemento a la selección fenotípica tradicional, combinando la información genotípica con la fenotípica, esta selección se realiza empleando marcadores moleculares los cuales están ligados a alguna característica de interés (Ferreira, 1994), estas asociaciones se basan en el análisis de la segregación de estos marcadores junto con la característica de importancia en una población segregante, en las cuales se relaciona la presencia del marcador al QTL en un mapa de ligamiento en el cual se muestran las distancias del QTL al marcador, siendo así que entre más cercano este el marcador del QTL es mayor la probabilidad de asociación entre ellos (Cerón y Sahagún, 2007). Debido a que las asociaciones QTL-marcador se hacen para poblaciones segregantes específicas, al querer aplicarlos como marcadores de selección para otras poblaciones, es indispensable verificar que conserven las asociaciones, ya que hay factores que pueden provocar que estos pierdan la asociación.

Este capítulo está dedicado al escrutinio y selección de los cebadores SRR, pues como se menciona en el capítulo I, tanto los cebadores, como los mapas de ligamiento y la asociación de QTL a los marcadores moleculares, se realizaron para individuos de guayaba provenientes de un banco de germoplasma cubano (Enana Roja cubana, Belic, Suprema roja, N6), por lo que es importante determinar cuáles de estos marcadores asociados características de interés, pueden ser aplicados a variedades de guayabas mexicanas, debido a que existe la posibilidad que al ser variedades diferentes, estos no amplifiquen o no estén asociados a las características en las variedades mexicanas. Sin embargo existe una gran probabilidad de que estos cebadores puedan ser empleados con variedades mexicanas, se han reportado índices de similitud muy cercanos entre variedades de guayaba de diferentes países en comparación con guayabas colectadas de diferentes estados de México (Tapia y Legaria, 2007), otro estudio realizado por Sánchez

et al.(2008), reporta un árbol filogenético construido en base a los SSR desarrollados durante el proyecto GUAVAMAP, en donde se agrupan variedades de guayabas colectadas de distintos estados y dos muestras provenientes del germoplasma cubano (Enana roja cubana y Belic), si bien no se reportan los índices de similitud, reportan que enana y belic se agrupan junto con guayabas mexicanas provenientes de la región del centro del país.

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Material vegetal

El material biológico utilizado, proviene del mismo sitio de colecta que se describe en el Capítulo 2, en el apartado 2.1, el material fue transportado en cajas de cartón y fueron almacenadas a temperatura ambiente durante tres días hasta el regreso al laboratorio, donde fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso. Para el escrutinio de los cebadores se agruparon a los individuos según sus características en grupos contrastantes (valores altos y otro de bajos) para cada grupo se seleccionaron 5 individuos representativos con los cuales se realizó una mezcla equimolar de ADN (BULK). Los individuos seleccionados se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Individuos seleccionados para el escrutinio de los cebadores asociados a características de interés.

Individuos seleccionado para: contenido de sólidos solubles (°Brix)

Alto contenido (Bulk 1)		Bajo contenido (Bulk 2)	
Individuo	Valor	Individuo	Valor
L3A1	15.63	L10A3	8.28
L3A3	14.72	L11A10	7.88
L5A8	15.40	L11A16	6.98

Selección de los SRR asociados a QTLs de interés en Guayabo mexicano

L5A11	16.05	L13A19	7.83
L8A15	15.32	L14A9	8.44

Individuos seleccionados para: Grosor interno de pulpa (cm)

Mayor grosor (Bulk 3)		Menor grosor (Bulk 4)	
Individuo	Valor	Individuo	Valor
L1A1	7.23	L2A1	2.63
L8A2	7.15	L2A18	2.87
L10A5	5.79	L3A1	2.68
L14A1	5.74	L4A14	2.84
L15A1	7.22	L11A16	2.82

Individuos seleccionados para: Grosor externo de pulpa (cm)

Mayor grosor (Bulk 5)		Menor grosor (Bulk 6)	
Individuo	Valor	Individuo	Valor
L1A1	1.37	L1A4	0.53
L8A2	1.67	L1A6	0.50
L10A5	1.37	L2A1	0.43
L15A1	1.05	L3A1	0.45
L5A8	1.20	L4A10	0.41

Individuos seleccionados para: Número de semillas

Alto contenido (Bulk 7)		Bajo contenido (Bulk 8)	
Individuo	Valor	Individuo	Valor

Selección de los SRR asociados a QTLs de interés en Guayabo mexicano

L1A1	652.5	L11A10	70.2
L8A2	408	L3A6	82
L10A5	439	L5A8	85
L14A1	411.5	L9A5	61
L15A1	397.5	L16A9	67.5

Individuos seleccionados para: Color de pulpa

	Bulk 9		Bulk 10		Bulk 11
Individuo	Color	Individuo	Color	Individuo	Color
L11A8	Rosa	L9A1	Blanca	L6A1	Crema
L10A1	Rosa	L6A5	Blanca	L3A10	Crema
L11A11	Rosa	L5A4	Blanca	L4A14	Crema
L13A19	Rosa	L3A14	Blanca	L5A23	Crema
S24	Rosa	L1A1	Blanca	L6A15	Crema

Cuadro 6b. Individuos seleccionados para el escrutinio de los cebadores asociados a características de interés.

Individuos seleccionados para: acidez, índice de madurez y vitamina c

Individuo	Característica	Valor
L6A18	Acidez	0.84
L10A1	Acidez	1
L13A1	Acidez	1.09

SELECCIÓN A3	Acidez	1.02
SELECCIÓN A24	Acidez	1.25
L6A18	Índice de madurez	13.76
L10A1	Índice de madurez	14.41
L13A1	Índice de madurez	12.08
SELECCIÓN A3	Índice de madurez	11.76
SELECCIÓN A24	Índice de madurez	13.22
L9A17	Vitamina C	59.85
L10A1	Vitamina C	284.83
L12A2	Vitamina C	164.87
L16A9	Vitamina C	201.78
SELECCIÓN A3	Vitamina C	162.01
SELECCIÓN A24	Vitamina C	188.48

3.2.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por la metodología antes descrita en el capítulo 2, apartado 2.3. Una vez obtenido el ADN, se realizaron mezclas de ADN (bulk), mezclando el ADN de la siguiente manera, se añadieron 10ng de ADN por cada individuo perteneciente a los bulks (cuadro 6). Para las características de acidez, índice de madurez y vitamina C, no se obtuvieron bulks, pues no se contaban con datos de suficientes individuos para agruparlos, para estas características se probaron los cebadores con todos los individuos (cuadro 6b).

3.2.3. Escrutinio y selección de los cebadores SSR asociados a características de interés

Una vez establecidas las condiciones de PCR descritas en el capítulo 2, apartado 2.4,

se procedió a hacer una selección de los cebadores asociados a características de interés (cuadro 7) para seleccionarlos y evaluar su uso como marcador de selección, empleando como criterio el polimorfismo que obtengan para las muestras seleccionadas, se empleó ADN genómico extraído anteriormente y se realizaron los bulks con dichos individuos, se amplificó el ADN de los bulks (poco y alto número de semilla; grosor de pulpa delgada y gruesa; alto y bajo contenido de vitamina C, alto y bajo contenido de sólidos, color de pulpa) y se observó el polimorfismo obtenido por cada combinación de cebadores en los Bulks, este análisis se realizó para cada una de las características y sus cebadores asociados.

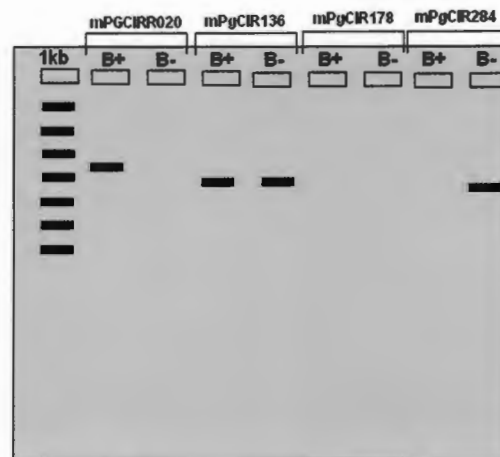
Se seleccionaron los cebadores que son capaces de discriminar entre los individuos con características contrastantes de interés (Cuadro 8). Para la visualización de estos fragmentos de amplificación se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 3% con TBE 1X, teñidos con EtBr. Los criterios de selección se ilustran en la figura 14, los cebadores que se seleccionaron son los que mostraron polimorfismo, es decir que solo amplificó para uno de los dos bulks por característica a los que se le llamo informativos. Los cebadores que no amplificaron para ningún bulk o para ambos (de la misma característica) no se tomaron en cuenta para la validación del empleo MAS.

Cuadro 7. SSR asociados a QTLs (Ritteret al., 2008)

Característica asociada al marcador.	Primer.
Grosor externo de la pulpa	mPgCIR 020, mPgCIR 136, mPgCIR178, mPgCIR 284
Grosor interno de la pulpa	mPgCIR 131, mPgCIR243
Número de semilla	mPgCIR 034, mPgCIR 161, mPgCIR 208
Sólidos solubles (°Brix)	mPgCIR 161, mPgCIR 254
Vitamina C	mPgCIR 007, mPgCIR 094, mPgCIR 208,
Color de pulpa	mPgCIR 099, mPgCIR 137, mPgCIR 161

Índice de madurez

mPgCIR 288



Primers asociados	GROSOR DE PULPA		
	BULK	BULK	Informativo
	D	G	
mPgCIR 020	+		Si
mPgCIR 136	+	+	No
mPgCIR178			No
mPgCIR 284		+	Si

Figura 14. Criterios de selección de los cebadores asociados a características de interés. B+: bulk con individuos de pulpa gruesa, B-: bulk con individuos de pulpa delgada, D: Individuos de pulpa delgada, G: Individuo de pulpa gruesa, + indica la presencia del fragmento de amplificación.

3.3. RESULTADOS

Se extrajo el ADN de las 85 muestras restantes con el protocolo antes descrito, el ADN obtenido se cuantificó y visualizó en geles de agarosa al 1.5%, tal y como se menciona en el capítulo anterior el ADN de mejor calidad se obtuvo durante la segunda elusión. Una vez se obtuvo el ADN se procedió a realizar los Bulks para las características antes mencionadas, seguido de la preparación de los bulks, los cuales fueron

cuantificados por espectrofotometría y se visualizaron en geles de agarosa al 3%(figura 15).

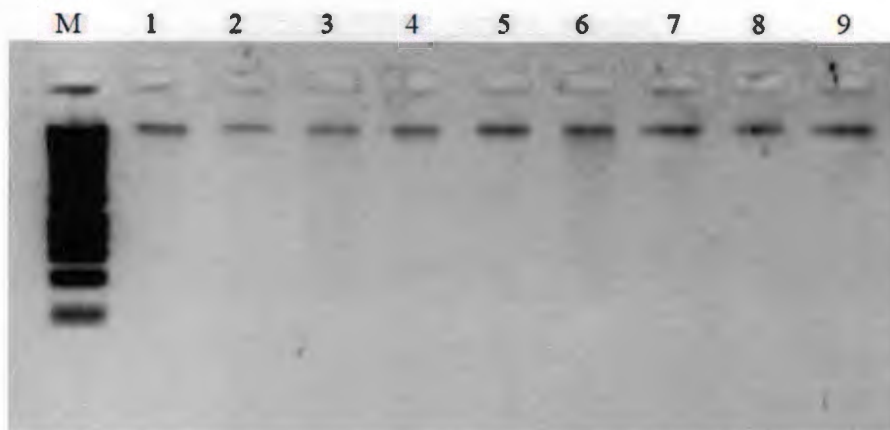


Figura 15. ADN de Bulks en concentraciones de 10ng/μl. Electroforesis en agarosa al 1.5% de los Bulks de ADNg extraído kit de Chargeswitch para cada una de las características, teñido con EtBr. M: marcador de 1kb plus (Invitrogen); carriles del 1 al 9 corresponden a los bulks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 respectivamente.

Posteriormente se procedió realizar la selección de los cebadores SSR. Se evaluaron los cebadores mPgCIR 161, 254 (*Brx) en los bulks 1 y 2, los cebadores mPgCIR 131, 243, 208 (grosor interno de pulpa) en los bulks 3 y 4, los cebadores mPCIR 020, 136, 243, 284 (Grosor externo de pulpa) en los bulks 5 y 6, los cebadores mPgCIR 034, 161, 208, (número de semillas) en los bulks 7 y 8, los cebadores mPgCIR 99, 137, 161 en los bulks 9, 10, 11. Para las características de índice de madurez (el cebador 208) y contenido en vitamina C (cebadores 007, 094, 208) seleccionaron los individuos del cuadro 6b.

A pesar de tener estandarizada la extracción de ADN y las condiciones de PCR, no se obtuvo amplificación con ninguno de los juego de cebadores, para descartar que algún compuesto de la extracción del ADN, así como algún componente de la reacción no estuviera inhibiendo la reacción de PCR, se realizó una amplificación con el cebador universal para la región de ADNr 18s, sin embargo tampoco se obtuvo amplificación (Figura 16).

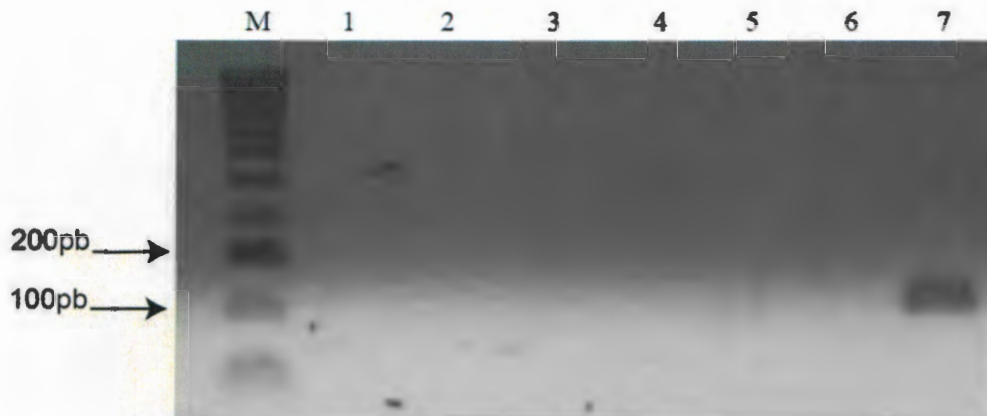


Figura 16. Amplificación de dos Bulks (B1 y B2) y del ADN de dos individuos con cebadores 18s. Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con EtBr. M: marcador Hyperladder II (Bioline), carril 1: Bulk 1; carril 2 y 3: individuos que forman parte del bulk1; carril 4: bulk 2; carril 5 y 6: individuos que forman parte del bulk2; carril 7: control positivo. No se obtiene amplificación, mientras que para el control, si se obtiene amplificado.

Se sospechó que algún compuesto estaba inhibiendo la reacción de la polimerasa, posiblemente Fenoles, que no hayan sido eliminados del todo con el PVPP, para tratar de eliminar las impurezas de ADN, se realizó una purificación utilizando 3 tratamientos. El primer tratamiento se basa en la purificación de ADN usando cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y la presentación con etanol absoluto, otro tratamiento que se probó fue el kit de purificación de ADN Wizzard (Promega), por último se probó el tratamiento de purificación por gel de agarosa de bajo punto de fusión, empleando la enzima agarasa y precipitando con etanol absoluto. Con el ADN purificado, se realizando una PCR con los cebadores 18s y a pesar del tratamiento al que fueron sometidas las muestras no se obtuvo amplificado. En base a resultados anteriores se decidió evaluar la estrategia de realizar diluciones seriadas partiendo de ADN a una concentración de 10 ng/μl, para obtener ADN a concentraciones de 1 y 0.1 ng/μl (1:10 y 1:100 respectivamente).Una vez

obtenidas las diluciones se realizó una PCR con los cebadores 18s (Figura 17), los resultados indican que haciendo las diluciones seriadas, se logra obtener amplificación con las mismas muestras que antes no habían amplificado, de acuerdo a estos resultados, se seleccionó la segunda dilución (1ng/μl), que es la dilución que presenta un amplificado de mayor intensidad.

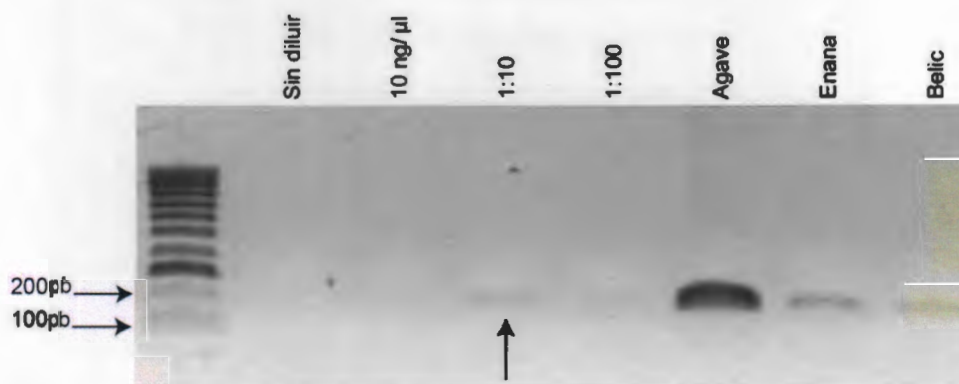


Figura 17. Amplificación de fragmentos de ADRr 18s, con la muestra L10A3, a diferentes diluciones. Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con EtBr. M: marcador de 1kb plus (Invitrogen), Agave, Enana y Belic fueron usados como control positivo. Se observa amplificado en la muestra diluida 1:10 y en la 1:100 con menor intensidad.

Una vez que se observó que la dilución 1:10 se obtenía amplificación se procedió a hacer un experimento con los individuos de los bulks, se diluyó el ADN de todos los individuos por separado y se realizó una PCR con el cebador mPgCIR 161 (figura 18).

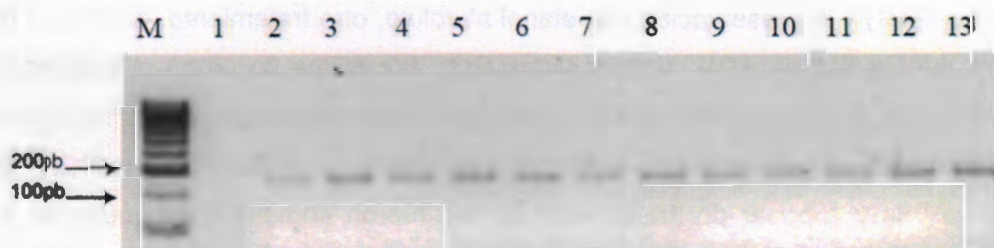


Figura 18. Amplificación de los individuos de los bulks 1 y 2 a una concentración de 1 ng/μl con el cebador mPgCIR 254 (205 pb). Electroforesis en agarosa al 3%, teñido con EtBr. M: marcador Hyperladder II

(Bioline); carril 1 al 5: individuos del bulk 1 (L8A15, L5A11, L5A8, L3A3, L3A1), carril 6: bulk1; carril 7 al 11: individuos del bulk 2 (L10A3, L11A10, L11A16, L13A19, L14A19) carril 12: bulk 2; carril 13: control positivo.

Mediante esta estrategia se logra obtener amplificado para los bulks que anteriormente no habían amplificado, quizá se deba a que al realizar las diluciones seriadas, la concentración de los contaminantes como fenoles, polisacáridos y taninos todos ellos presentes en altas concentraciones en las hojas de guayabo no se hayan eliminado del todo con el tratamiento del PVPP, pero que al hacer las diluciones la concentración de éstos disminuya hasta un punto en el que no inhiban la reacción de PCR. Porebski *et al.* (1997), menciona que la presencia de estos compuestos inhiben la actividad de la polimerasa, ocasionado por el aumento del proceso de fenolización al cortar el tejido por lo cual es fundamental el almacenamiento de los tejido para evitar la formación de mayor cantidad estos. Se sospecha la presencia de estos compuestos cuando el extracto toma una coloración rojiza (Schlink and Reski, 2002; Fang *et al.*, 1993), tal y como pasó durante la estrategia, que si bien se disminuyó la coloración, pueden haber quedado Fenoles en concentraciones suficientes para inhibir la reacción de la polimerasa. Cabe mencionar que a diferencia del primer material que se colectó, este fue almacenado en una caja de cartón a temperatura ambiente por varios días, Bhattacharjee *et al.* (2004) menciona que, sobre todo en plantas perenes y tropicales que tienen altos contenido en fenoles y taninos, si las muestras no son congeladas de manera casi inmediata se dificulta la extracción de ADN de buena calidad, provocando el aumento de Fenoles en las extracciones e imposibilitando la reacción de PCR, por lo que el traslado de las plantas al laboratorio y su inmediata congelación es un paso fundamental para la obtención de buen material.

Para el caso de guayaba, es recomendable que las muestras sean congeladas en el mismo sitio de colecta y que sean trasladadas de inmediato al laboratorio para su tratamiento y utilización y así no permitir que el proceso de fenolización avance y permita la extracción de ADN de buena calidad. Si esto es difícil debido a que los sitios de colecta están en lugares retirados, es recomendable utilizar la estrategia de diluciones aunado a añadir PVPP durante la maceración para disminuir la concentración de estos contaminantes, para que la reacción no sea inhibida. Se ha repetido esta estrategia y se ha amplificado después de 6 meses almacenamiento y sigue siendo viable el ADN para

PCR, Resultados similares se han obtenido con la misma estrategia para cocotero y cicadas (resultados no reportados).

Una vez que se logró obtener el amplificado con el ADN, se procedió a hacer la selección de los cebadores polimórficos (informativos) asociados a las características.

3.3.1. Selección de cebadores informativos

Se analizó el polimorfismo obtenido con dos cebadores asociados a contenido de °BRX (161, 254), estos se amplificaron para los bulks uno y dos (tabla 8). De los dos cebadores evaluados solo uno resultó informativo (mPgCIR161) pues solo amplificó para aquellos bulks de individuos con menor concentración de °BRX, mientras que el primer 254 se descartó pues amplifica para ambos bulks, por lo que no es capaz de discriminar entre individuos de una característica u otra (Figura 19).

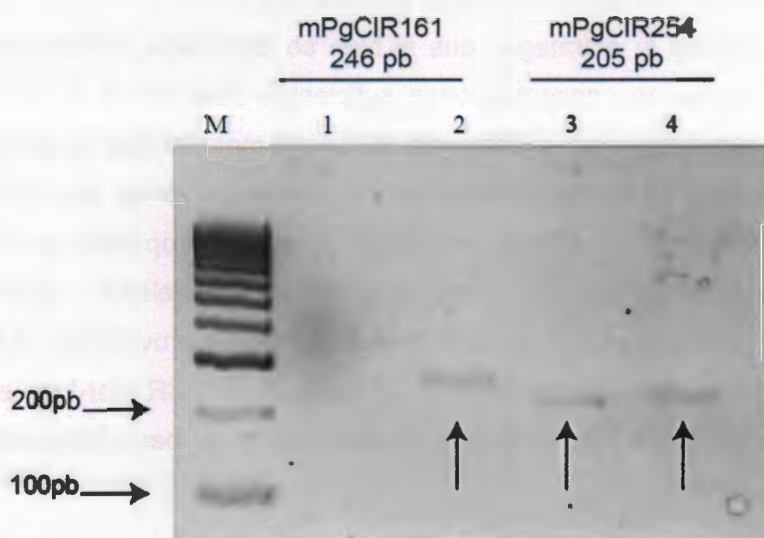


Figura 19. Selección de los microsatélites asociados a °BRX. Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificado para los cebadores mPgCIR161 y 254, teñido con EtBr. Se indican con flechas el fragmento del tamaño esperado para cada cebador. Se enmarca el primer que se seleccionó por ser polimórfico. Carril 1 y 3: bulk 1 para mayor °BRX; carril 2 y 4: bulk 2 para menor °BRX.; M: marcador 1kb plus (Invitrogen).

Para la característica de grosor interno de pulpa se evaluaron tres cebadores

(mPgCIR 131, 243, 208), de los cuales solo uno fue seleccionado (mPgCIR 131) por ser polimórfico para individuos de pulpa gruesa (figura 20). El cebador 243 se descarta para selección por ser monomórfico para los bulks y el 208 por no amplificar para ningún bulk.

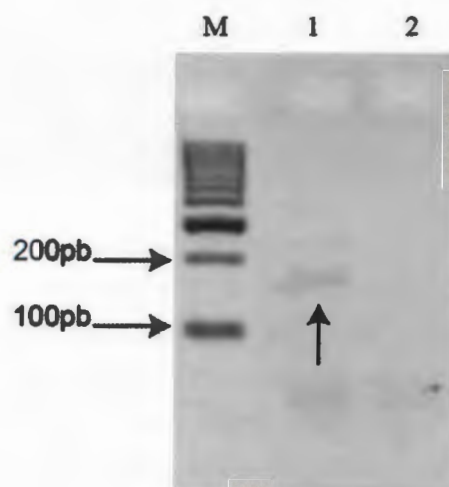


Figura 20. Selección de los microsatélites asociados al grosor interno de pulpa. Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificado para los cebadores mPgCIR131 en Bulks 3 y 4. Se indican con flechas los fragmentos del tamaño esperado para cada cebador. Carril 1: bulk 3 para individuos menor grosor interno de pulpa; carril 2: bulk 4 para mayor grosor de pulpa; M: marcador 1kb plus (Invitrogen).

De la misma manera se procedió a elegir los cebadores asociados a grosor de pulpa externo, se evaluaron cuatro cebadores (mPgCIR 020, 136, 243 y 284), de los cuales los cebadores 020 y 284 no mostraron amplificación, el cebador 243 resulto ser monomórfico para los bulks y solo se escogió por ser polimórfico el cebador 136, que podría permitir la selección de individuos de pulpa externa delgada (figura21).

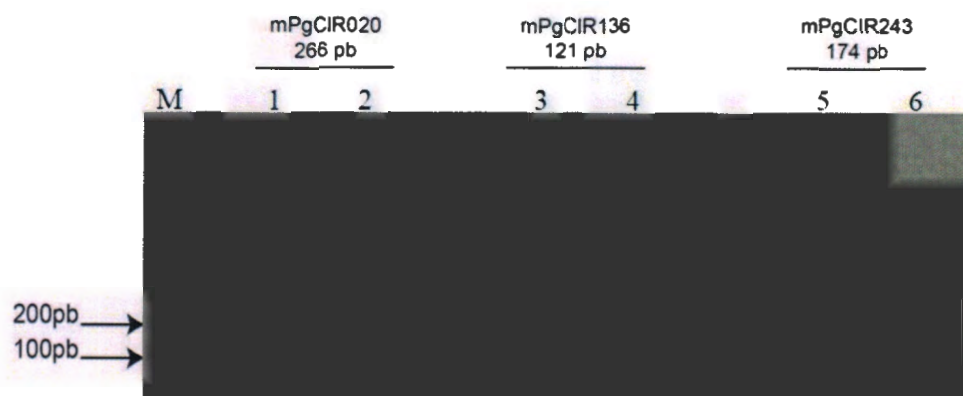


Figura 21. Selección de los microsatélites asociados a Grosor externo de pulpa. Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificado para los cebadores mPgCIR020, 136 y 243, teñido con EtBr. Se indican con flechas el fragmento del tamaño esperado para cada cebador. Se enmarca el primer que se seleccionó por ser polimórfico. Carril 1, 3 y 5: bulk5 para mayor; carril 2, 3 y 6: bulk6 para menor grosor de pulpa externa; M: marcador 1kb plus (Invitrogen)

Para la característica de número de semillas se evaluaron tres cebadores (mPgCIR 034, 161, 208), de los cuales todos resultaron ser monomórficos, por lo que ninguno de ellos se seleccionó para continuar con la validación del empleo de estos para selección. Aunque no se encuentre un marcador de selección para esta característica, en campo se ha visto que el número de semillas está relacionado con el grosor externo de pulpa, por lo que indirectamente al seleccionar individuos de pulpa externa delgada se puede suponer que el número de semillas es alto para estos individuos, sin embargo faltan estudio para poder afirmar esta relación.

Para el color de pulpa se evaluaron tres cebadores (mPgCIR 99, 137, 161), de estos cebadores se seleccionó el mPgCIR 161, que tiene la característica de amplificar solamente para aquellos individuos de pulpa crema o blanca, discriminando a los individuos de pulpa rosa. Los otros dos cebadores no amplificaron para ningún individuo como se muestra en la figura 22. Cabe destacar que para la selección de estos marcadores se usaron tres bulks, el bulk 9 para pulpa rosa, el bulk 10 para pulpa blanca y el bulk 11 para pulpa color crema.

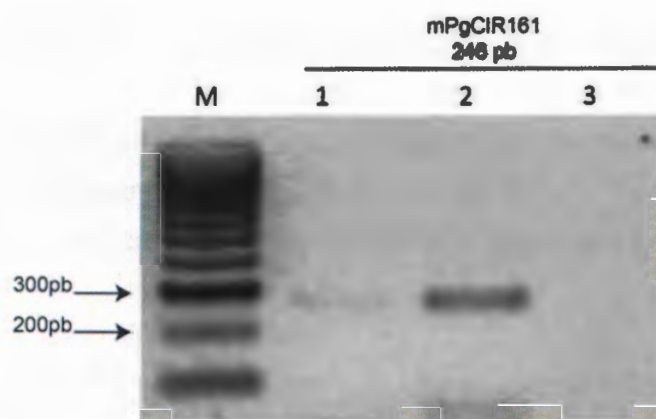


Figura 22. Selección de los microsatélites asociados al color de pulpa.

Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificado para el cebador mPgCIR161. Se indican con flechas los fragmentos del tamaño esperado para cada cebador. Carril 1: bulk 10 para individuos pulpa blanca; carril 2: bulk 11 para de pulpa crema; carril 3: bulk 11 para pulpa rosa; M: marcador 1kb plus (Invitrogen), teñido con EtBr.

El cebador mPgCIR 161, también fue seleccionado para la selección de individuos con alto contenido de °BRX, que se ha visto que aquellos individuos de pulpa blanca tienden a tener un mayor contenido de azúcares, por lo que este mismo cebador podrá ser empleado para la selección de ambas características.

Para las el índice de madurez y el contenido de vitamina C, no se pudo realizar los bulks, pues el número de individuos que se tienen caracterizados son muy pocos, por lo que se procedió a tomar a los individuos y evaluar los cebadores en todos los individuos. Para el índice de madurez el cebador mPgCIR 288, muestra polimorfismo en la amplificación, pero no discrimina entre los individuos de mayor o menor índice de madurez (figura 23), sin embargo el número de individuos que se usaron para la selección son muy pocos, es recomendable aumentar el número de individuos para llegar a una conclusión sobre este marcador, Además que los valores del índice de madurez entre ellos son muy cercanos (cuadro 6b). Sucede algo similar para los cebadores asociados al contenido de vitamina C (mPgCIR 007, 094 y 208), donde son pocos los individuos caracterizados, sin embargo posiblemente el cebador mPgCIR007 y 094 puedan ser empleado para la selección de individuos con alto contenido de vitamina C y se descarta

el 208 por amplificar en todos los individuos (monomórfico), aunque de nuevo los valores están muy cercanos entre sí, se aprecia que este cebador solo amplifica para aquellos individuos que tengan contenidos de vitamina C mayores a 150 mg/ 100g de pulpa (figura 24). Aun que hace falta hacer el análisis con un mayor número de individuos para poder concluir si está asociado a individuos con mayor o menor contenido de vitamina C.

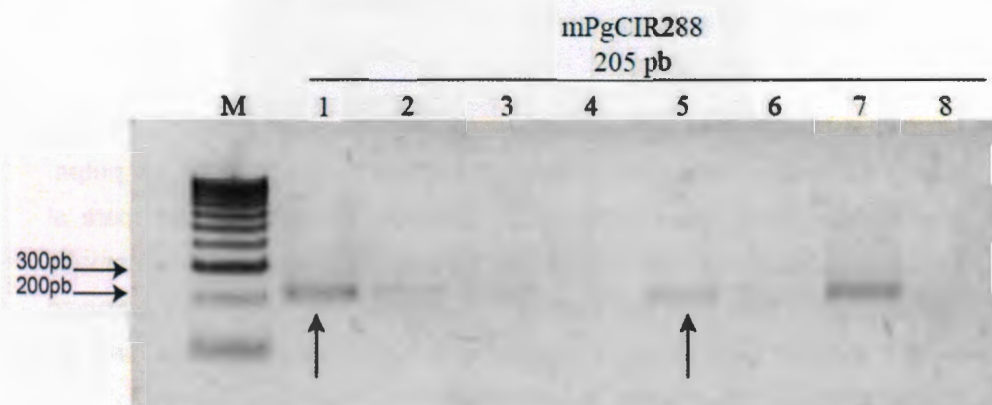


Figura 23. Amplificación con el cebador asociado a índice de madurez. Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificado para el cebador mPgCIR288, teñido con EtBr. Se señalan con flechas el fragmento de amplificación para los individuos de menor y mayor índice de madurez. Valor de índice de madurez (°Brx/ acidez): carril 1 al 8 individuos seleccionados para índice de madurez: SA3: 11.76; L13A1: 12.8; SA24:13.22; L6A18: 13.76; L10A1: 14.31, respectivamente. M: marcador 1kb plus (Invitrogen)

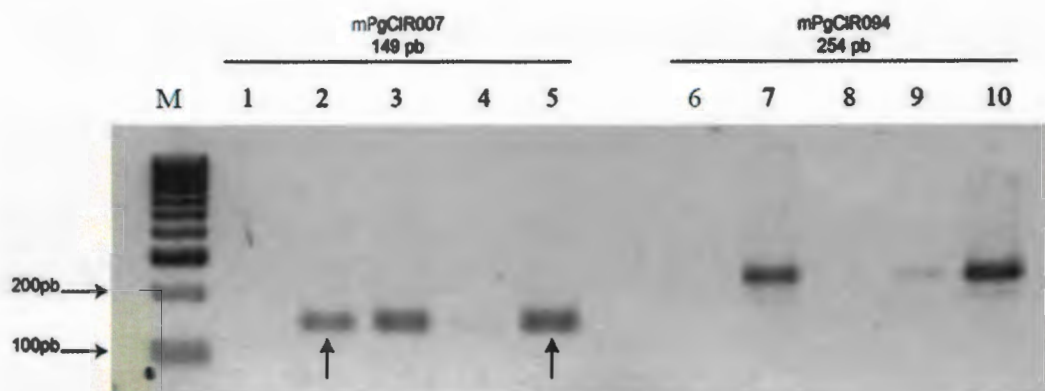


Figura 24. Amplificación con los cebadores asociado a contenido de vitamina C. Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificado para los cebadores mPgCIR 007 y 094, teñido con EtBr. Se señalan con flechas el fragmento de amplificación para los individuos de menor y mayor contenido de vitamina C. carriles 1 y 6: L19A17: 59.8 mg/ 100g de pulpa; 2 y 7: SA3:162 mg/ 100g de pulpa; 3 y 8: L12A2:164.8 mg/100g de pulpa; 4 y 9: SA24:188 mg/100g de pulpa; 5 y 10: L16A9: 201 mg/ 100g de pulpa. M: marcador 1kb plus (Invitrogen)

Hasta el momento se han seleccionado 4 cebadores asociados a 5 características morfoagronómicas de interés (cuadro 8), se puede decir que para las características de mayor interés comercial, como lo es el contenido de °BRX, el grosor externo de la pula, grosor interno de pulpa, el color de la pulpa, contenido de vitamina C. Como se mencionaba anteriormente el cebador mPgCIR161, puede ser empleado para la selección de dos características a la vez, tanto para individuos con alto contenido de °BRX como, para la selección de individuos de color de pulpa crema-blanca; el cebador mPgCIR136 para selección de individuos de pulpa externa delgada y el cebador mPgCIR131 para la selección de individuos de pulpa interna gruesa. Estos resultados aún son preliminares, falta validar el uso de estos cebadores en un número mayor de individuos para poder sugerir su uso como marcadores de selección.

Cuadro 8. Características y asociaciones de los cebadores evaluados

Característica asociada	Nombre del cebador	Asociado a:
° Brix	mPgCIR 161	Asociado a bajo contenido
	mPgCIR 254	No asociado (monomórfico)
Color de pulpa	mPgCIR 99	No asociado (no amplificó)
	mPgCIR 137	No asociado (no amplificó)
	mPgCIR 161	Asociado a pulpa blanca a crema
Grosor externo de pulpa	mPgCIR 020	No asociado (no amplificó)
	mPgCIR 136	Asociado a pulpa delgada
	mPgCIR 243	No asociado (monomórfico)
	mPgCIR 284	No asociado (no amplificó)
	mPgCIR 178	No asociado (no amplificó)
Grosor interno de pulpa	mPgCIR 131	*Asociado a pulpa gruesa
	mPgCIR 243	No asociado (monomórfico)
Número de semillas	mPgCIR 208	No asociado
	mPgCIR 034	No asociado (monomórfico)
	mPgCIR 161	No asociado (monomórfico)
	mPgCIR 193	No asociado (monomórfico)
	mPgCIR 316	No asociado (no amplificó)

	mPgCIR 163	No asociado (no amplificó)
Índice de madurez	mPgCIR 288	No asociado
	mPgCIR 015	No asociado
	mPgCIR 193	No asociado
	mPgCIR 405	No asociado
	mPgCIR 157	No asociado
	mPgCIR 007	*Asociado a alto contenido
Contenido de vitamina c	mPgCIR 094	*Asociado a alto contenido
	mPgCIR 208	No asociado (no amplificó)
	mPgCIR 163	No asociado
	mPgCIR 094	*Asociado a alto contenido
	mPgCIR 334	No asociado (no amplificó)
	mPgCIR 193	No asociado (monomórfico)
Acidez	mPgCIR 193	No asociado (monomórfico)

3.4. DISCUSIÓN

Como se menciona anteriormente, uno de los objetivos de este capítulo es determinar cuáles de estos marcadores pueden ser empleados para la selección asistida por marcadores en guayabas mexicanas, debido a que existía la probabilidad de que éstos no amplificaran o la asociación al QTL se perdiera a estos ser desarrollados para otras poblaciones. Sin embargo ya había habido reportes de la capacidad de los marcadores microsatélites de ser transferidos entre especies relacionadas y para diferentes géneros, debido a que hay una conservación de las secuencias en estas regiones repetidas en las plantas (Dos santos *et al.*, 2007; Ochieng *et al.*, 2007; Marqués *et al.*, 2002) lo que indicaba que no debería de existir inconveniente en cuanto al empleo de estos microsatélites desarrollados para poblaciones cubanas en el germoplasma

mexicano, existen varios estudios realizados en guayaba que usan estos mismos microsatélites en diferentes individuos de guayaba provenientes de distintos países e inclusive de diferentes géneros de la familia Myrtaceae, para estudios de diversidad y en todos los casos estos microsatélites fueron útiles para el objetivo (Valdés-Infante *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2008; Tapia y Legaria., 2007), además cabe destacar que en algunos estudios anteriores se han construido dendogramas en base a estos microsatélites y se reporta que las guayabas provenientes de otros países (Estados Unidos de América) se llegan a agrupar con guayabas originarias de Cuba, hasta con un coeficiente de identidad de Nei de 0.89 (Valdés-Infante *et al.*, 2007), esto puede dar indicios de que si es factible el uso de estos marcadores microsatélites en individuos de la misma especie provenientes de regiones distintas, además de que como menciona Tapia y Legaria., 2007, existen relaciones genéticas entre las poblaciones de guayabas, ya sea debido al flujo genético causado por las aves migratorias o bien por otros factores como puede ser el hombre. Estos autores reportan índices identidad de Nei entre poblaciones mexicanas y brasileñas del 0.88, lo que podría estar indicando no solo el parentesco genético entre las poblaciones si no también, la posibilidad de que los microsatélites puedan ser empleados para distintas poblaciones de guayaba. A la vez era importante verificar si los marcadores seguían ligados a los QTL, pues como se menciona anteriormente existía la posibilidad de que éstos no se asocien cuando las poblaciones están expuestas a recombinación genética por efectos de la reproducción sexual, debido al incremento en la frecuencia de recombinación es posible que poco a poco el marcador se vaya separando del locus. (Longhi *et al.*, 2013), tal y como es el caso para la mayoría de las huertas mexicanas las cuales fueron establecidas a partir de semillas (Martínez *et al.*, 2004), sin embargo con los resultados obtenidos hasta el momento, los microsatélites parecieran conservar su ligamiento al QTL al menos para los individuos en estudio, en total cuatro características conservaron su asociación al marcador, la característica de color de pulpa no ha sido mapeada ni ligada aun, sin embargo con este trabajo se sugiere que el marcador 161 asociado al menor contenido de grados Brix, también este asociado al color de pulpa blanca. Las características que se corroboró su asociación al marcador destacan por su importancia para la selección de individuos y frutos, como son el contenido de °Brix, color de pulpa, grosor externo e interno de la pulpa, probablemente también contenido de Vitamina C.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Bhattacharjee, R., Maria, Ka, Peter, A., Sunday, T., Ivan I. 2004. An improved Semi automated Rapid Method of Extracting Genomic DNA for Molecular Marker Analysis in Cocoa, *Theobroma cacao* L. Plant Molecular Biology Reporter. 22, 435a-435b.
- Cerón-Rojas, J.J. y Sahagún-Castellanos, J. 2007. Estimating QTL biometrics parameters in F2 populations: a new approach. Agrociencia 41:57-73.
- Dos Santos, K. L., de Mesquita, J. Welter A., Guerra, M. P., Ducroquet J. P. H. J, Nodari, R. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. To *Acca sellowiana* and succesful use of this technique in genetic characterization. Genet Mol Biol. 30(1): 30-40.
- Fang, G., Hammar, S., Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for preparation of DNA from tissues of Yam (*Dioscorea* spp). Plant Molecular Biology Reporter 17, 9-14.
- Ferreira, W. R., Williams, P.H., y Osborn, T.C. 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled-haploid lines. Theor. Appl. Genet. 89:815-621
- Longhi, Sara, Capellin, Luca, Guerra, Walter and Costa, Fabrizio. 2013. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in Apple (*Malus x domestica* Borkh.). Mol breeding. 32:841-852.
- Marqués, C. M., Brondani, R. P. V., Grattapaglia D., Sederoff, R. 2002. Conservation and synteny of SSR loci and GTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. Theoretical and Applied Genetics. 105 (2-3): 474-478.
- Ochieng, J. W., D. A. Steane, P. Y. Ladiges, P. R. Baverstock, R. J. Henry, M. Shepherd. 2007. Microsatellites retain phylogenetic signals across genera in *Eucalyptus* (Myrtaceae). Genetics and Molecular Biology. 30 (4): 1125-1134.
- Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. Plant Biology Reporter 15, 8-15.
- Sánchez-Teyer, L. F., Barraza-Morales, A., Keb, L., Barredo, F., Quiroz-Moreno, A., O'Connor –Sánchez, A. and Padilla-Ramírez J.S. 2008 Assessment of genetic diversity of mexican guava using molecular markers. In: Abstracts of the 2nd

International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. Eds: W. Rhode and G. Fermin. Mexico. Pp:15.

- Schlink, K., Reski, R. 2002. Preparing high quality DNA from moss (*Physcomitrella patens*). Plants Molecular Biology Reporter, 20, 423a-423f.
- Tapia-Peréz, D., Legaria-Solano, J. 2007. Genetic Variability in cultivars of guava (*Psidium guajava* L.). Rev. Fitotec. Mex. Vol. 30 (40), pag: 391-401.
- Valdés-Infante, J. Rodríguez-Medina, N.N., Bautista-Alor, M., Ortiz-García, M.M., Quiroz-Moreno, A., Sánchez-Teyer, L.F., Risterucci, A. M., Rohde, W. 2010. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XII No. 1. Pp 64 – 67.
- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N. N., Velázquez, B., Sourd, D., Espinosa, G. and Rohde, W. 2007. Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. Cultivos tropicales. 28 (3): 5-11.

CAPÍTULO IV

VALIDACIÓN DE LOS MARCADORES SSR COMO HERRAMIENTA DE SELECCIÓN TEMPRANA PARA GUAYABA MEXICANA

4.1. INTRODUCCIÓN

Los diferentes cultivos de importancia económica están siempre bajo continua mejora, adaptándolas de acuerdo a las necesidades del hombre. La generación de nuevas variedades se ha realizado para mejorar las características de interés agronómico, lo cual se realiza por medio de cruza de los mejores parentales que satisfagan las características de interés, seguido de la selección de los mejores individuos de la progenie (Moose and Mumm, 2008; Asins, 2002). Para frutales con ciclos de vida largo este proceso puede ser caro y muy lento, debido a que se tienen largos periodos juveniles antes de obtener los frutos y poder seleccionar los individuos, además que se tiene que mantener toda la progenie durante todo el proceso hasta la selección. La biotecnología ha avanzado en este tema, se han desarrollado estrategias que pueden hacer más eficiente el proceso de obtención de variedades mejoradas. Una de estas estrategias es la selección temprana de individuos por medio de marcadores moleculares asociados a las características de interés. Esta estrategia se puede llevar a cabo para la selección de los parentales con las características de interés (Marker Assisted Parent Selections, MAPS) o para la selección de las segregantes (Marker Assisted Seedling Selection, MASS), lo que permite eficientar el proceso de selección y también la reducción de individuos que se mantienen durante el proceso (Delannay *et al.*, 2011; Collard and Mackill, 2008).

Durante este capítulo se describirá la validación de los marcadores SSR asociados a tres características de importancia en guayaba: grosor externo e interno de pulpa, color de pulpa y contenido de °Brix, que son de interés para la obtención de variedades mejoradas. Hasta ahora no se contaba con marcadores tipo SSR validados e integrados a un programa de mejora para guayaba mexicana, existen antecedentes en lo que se describe marcadores SSR asociados a QTL para características del fruto en poblaciones cubanas, de los cuales al menos cuatro fueron seleccionados por conservar su asociación a los QTLs en accesiones mexicanas. El objetivo de este capítulo es validar el empleo de los

marcadores tipo SSR asociados a tres características agronómicas de interés, el grosor externo e interno de pulpa, el color de pulpa y el contenido de °Brix, los cuales en el capítulo anterior se corroboró su asociación y se le asignó una característica cualitativa a cada uno de ellos.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Se colectaron hojas de accesiones de guayaba pertenecientes a la colección *ex situ* del INIFAP colectadas en todo el país, este material se describe en el Capítulo 2, en el apartado 2.1 (cuadro 5).

4.2.2. Alelotipificación con los marcadores mPgCIR161, 136 y 131

La extracción de ADN se realizó mediante el kit Chargeswitch® (Invitrogen) con la metodología antes descrita en el capítulo 2, apartado 2.3. Se amplificó el ADN de todos los individuos colectados con los tres cebadores SSR por separado (mPgCIR161 para color de pulpa blanca y menor contenido de grados brix, mPgCIR136 para individuos de menor grosor de pulpa externa y el mPgCIR131 para individuos con mayor grosor de pulpa interna), con el programa de PCR y las concentraciones descritas en el capítulo 2, apartado 2.2. Los fragmentos de amplificación se separaron usando una electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) y la visualización y clasificación por tamaño de los fragmentos de amplificación se realizó por medio del software GENEMARKER®.

4.2.3. Análisis de datos

El análisis de los datos obtenidos del software GENEMARKER® se llevó a cabo por medio de una matriz binaria con el software Microsoft Excel®, donde la ausencia del fragmento está indicada por 0 y la presencia por 1. Los fragmentos que no correspondieran al tamaño esperado o bien que la intensidad del pico fuera menor a los 250 fueron eliminados de la matriz. Los individuos se agruparon de acuerdo a los alelos que presentaran a lo que se le llamo tipo alélico. El análisis para la validación se realizó

calculando el porcentaje de eficiencia de selección por tipo alélico obtenido, es decir para cada tipo alélico obtenido qué porcentaje de individuos tienen la característica esperada (formula 1).

Formula 1

$$\text{Eficiencia de seleccion} = \left(\frac{\text{numero individuos con la característica esperada}}{\text{total de individuos con el mismo tipo alelico}} \right) \times 100$$

Este análisis se hizo para cada uno de los marcadores SSR antes mencionados.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Validación del microsatélite mPgCIR131 para individuos de menor grosor de pulpa interna

Para validar la eficiencia del marcador microsatélite mPgCIR131 como herramienta de selección en programas de mejora en guayaba, se analizó los diferentes alelos amplificados y se clasificaron en tipos alélicos de acuerdo con el tamaño de los alelos que correspondieran al tamaño esperado (144 pb). Se identificaron tres tipos alélicos para este marcador, los individuos de forma homóciga para el alelo 148, los individuos en forma heteróiga con los alelos 141 y 148 y 146 y 151 (figura 25).

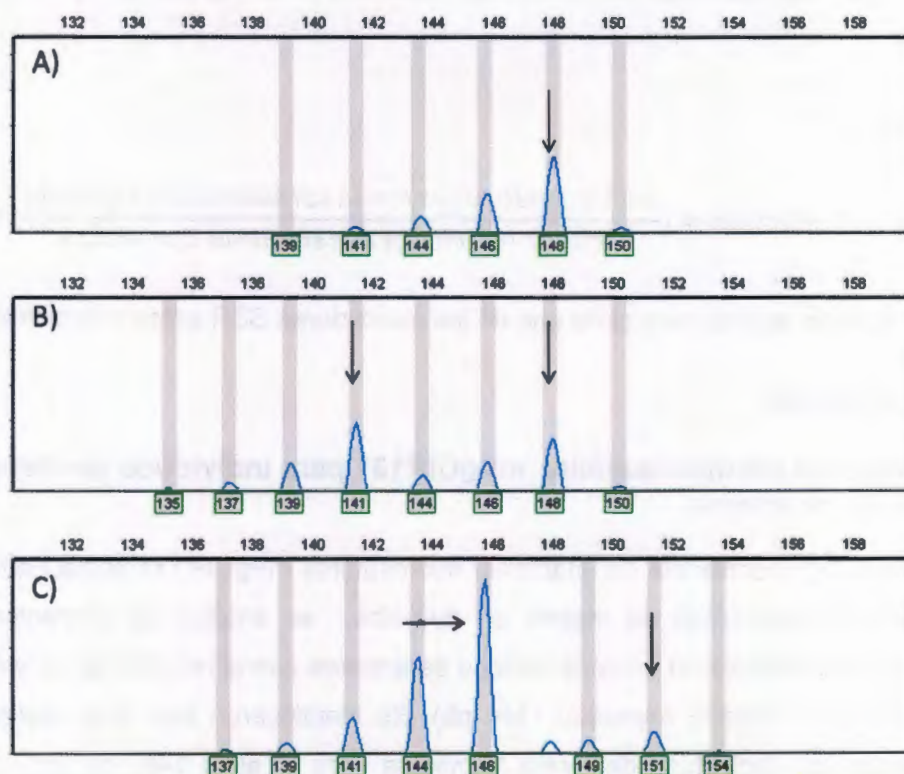


Figura 25. Formas alélicas obtenidas con el marcador mPgCIR131. A) Homócigo para el alelo 148, **B)** Heterócigo para los alelos 141 y 146 y **C)** Heterócigo para los alelos 148 y 151. Electroferograma obtenido a partir de una electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosistem®)

El tipo alélico que presentó la mayor eficiencia de selección fue el que presenta los alelos 146 y 151 con un 100% de eficiencia y un grosor de pulpa promedio de 5 mm, sin embargo estos alelos solo están presentes en dos individuos ambos provenientes de Cuba, por lo que no se considera útil para selección de germoplasma mexicano, aunque probablemente estos alelos sean útiles para seleccionar individuos de origen cubano. El tipo alélico que presenta los alelos 141 y 148 tiene una eficiencia de 85%, es decir que 8 individuos de cada 10 que presentan este tipo alélico, corresponden a la característica esperada de menor grosor de pulpa interna, con un promedio de 3.84 mm, mientras que para el tipo alélico homocigoto 148 no se encontró ninguna relación puesto que pocos individuos presentan este alelo de los cuales algunos corresponden a mayor grosor y

otros a menor grosor de pulpa. Para corroborar si existe diferencias con respecto al grosor de pulpa interna entre los individuos de un tipo alélico y otro, se realizó un análisis de diferencias mínimas significativas, los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las formas alélicas 141/146 y 148/151 pero si entre ellas dos con la forma alélica 148 (figura 26). Descartando el alelo 151 presente en solo en dos individuos, en germoplasma mexicano se podría decir que el alelo que predice la característica de menor grosor de pulpa es el tipo alélico 141/146. Para la selección temprana de guayaba mexicana se recomienda seleccionar aquellos individuos que presenten este alelo, pues es el que probablemente esté más asociado a esta característica, en comparación con lo reportado por Ritter *et al* (2008) que reporta que el tamaño del alelo esperado para el grosor de pulpa interna es de 144 pb, esta diferencia puede ser explicada debido a que para la elaboración del mapa de ligamiento solo se tomaron en cuenta poblaciones cubanas, pero a pesar de eso, la asociación al QTL que controla esta característica en guayaba mexicana está muy cerca del alelo esperado.

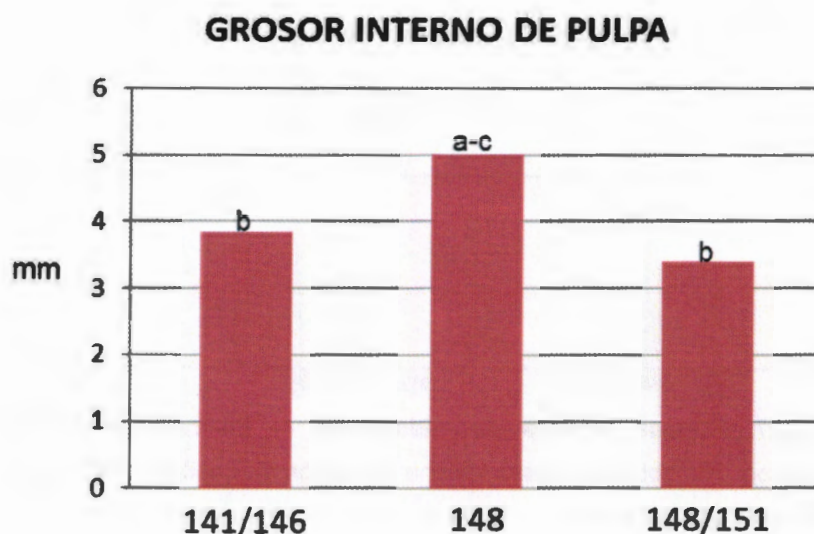


Figura 26. Promedio de los grosores de pulpa interna para los distintos tipos alélicos. a, b, c corresponden a los tres tipos alélicos, 141/146, 148, 148/151 respectivamente. Indican a que tipo alélico son estadísticamente diferentes.

4.3.2. Validación del microsatélite mPgCIR136 para individuos de menor grosor de pulpa externa

Para el marcador mPgCIR136, se amplificaron dos alelos (110 y 120), los cuales se clasificaron en tres tipos alélicos de acuerdo con el tamaño de los alelos y la combinación entre ellos. Los individuos de forma homóciga para el alelo 110 y 120 y los individuos de la forma heteróciga con los alelos 110/120 (figura 27) forman los tres tipos alélico para este microsatélite.

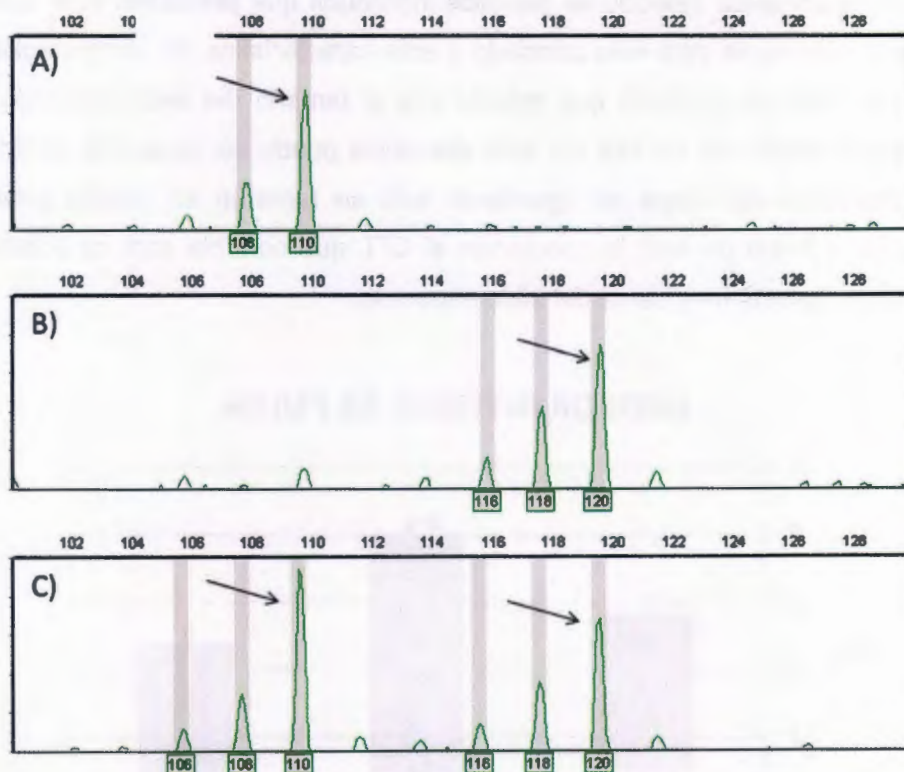


Figura 27. Formas alélicas obtenidas con el marcador mPgCIR136. Electroferograma obtenido a partir de una electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) A) Homócigo para el alelo 110, B) Homócigo para los alelos 120 y C) Heterócigo para los alelos 110 y 120.

El tipo alélico que presentó la mayor eficiencia de selección fue el grupo homócigo para el alelo 110 con un 100% de eficiencia es decir todos los individuos que presentan este tipo alélico, corresponden a la característica esperada de menor grosor de pulpa externa, de la misma manera la forma alélica heteróciga (110 y 120) presenta el 100% de

eficiencia sin embargo este tipo alélico solo está presente en tres individuos, por lo que no es representativo para el análisis, para el tipo alélico homocigoto 120 no se encontró ninguna relación puesto que estos alelos no están bien representados, solo están presentes en 4 individuos y entre ellos no comparten ninguna característica.

Se calculó el promedio del grosor de pulpa para cada uno de los tipos alélicos, se observó que para el tipo alélico 110 el promedio del grosor de pulpa es de 0.72 mm, para el tipo alélico 120 el promedio es de 1.3 y para la forma alélica 110/120 es de 0.90 mm. Para corroborar si existe diferencia entre el grosor de pulpa externa de los individuos de un tipo alélico y otro, se realizó un análisis de diferencias mínimas significativas, los resultados indican que entre las dos forma homocigotas con la forma heterocigota existe una diferencia mínima significativa pero que no existe entre las formas alélicas 110 y 110/120, (figura 28), al parecer el alelo que está prediciendo la característica de menor grosor de pulpa externa es el alelo 110, pues este tipo alélico es estadísticamente diferente con individuos que no presentan este alelo, mientras que cuando se compara con los individuos heterocigotos que comparten este alelo, no existe una diferencia significativa con respecto al grosor externo de pulpa, sin embargo parece haber una relación del alelo 120 con individuos de mayor grosor de pulpa, pero habría que hacer más estudios con respecto a eso. Se sugiere que para la selección temprana se utilice como criterio de selección la presencia del alelo 110, que resulto estar asociado a esta característica en guayaba mexicana. A diferencia de lo reportado por Ritter *et al.*, (2008) que reporta que el tamaño del alelo esperado para el grosor de pulpa externo es de 120, nosotros encontramos que el alelo 110 es el que presenta mayor asociación, al igual que en el caso anterior esta diferencia puede ser explicada debido a que el mapa de ligamiento solo se tomaron en cuenta poblaciones cubanas que fueron cruzadas de manera controlada, mientras que en el caso de la mayoría las poblaciones mexicanas, estas fueron establecidas por semilla y no se tiene control de las cruas, lo que incrementa la recombinación genética, que puede reducir la asociación del marcador separando a este del QTL (Longhi *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha validado el uso como herramienta de selección el alelo 110 para individuos de menor grosor de pulpa empleando el marcador tipo SSR mPgCIR136.

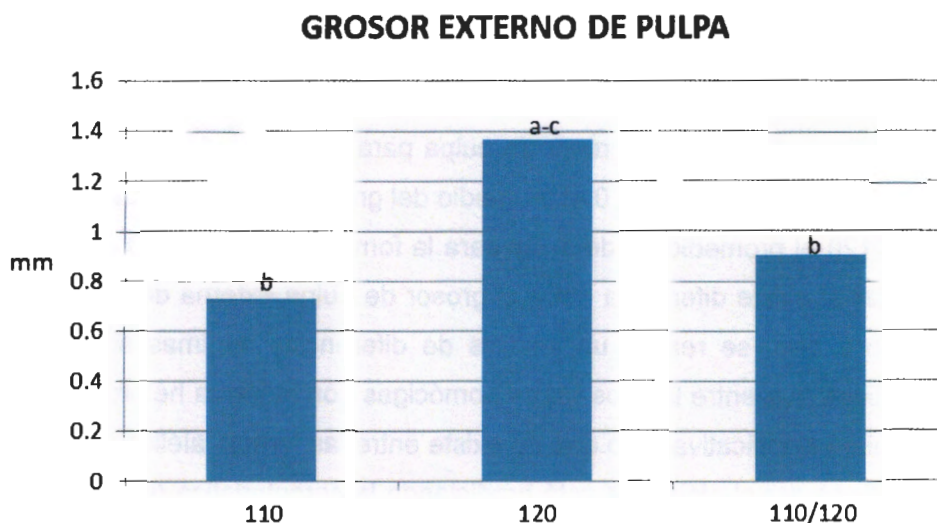


Figura 28. Promedio de los grosores de pulpa externa para los distintos tipos alélicos. a, b, c corresponden a los tres tipos alélicos, 110, 120, 110/120 respectivamente. Indican a que tipo alélico son estadísticamente diferentes

4.3.3. Validación del microsatélite mPgCIR161 para individuos de color de pulpa blanca y menor contenido de °Brix

Este marcador resultó estar asociado a dos características de interés agronómico, el color de pulpa y el contenido de °Brix, la estrategia para validar su aplicación como herramienta de selección es similar a la de los marcadores anteriores, primero se clasificaron en tipos alélico de acuerdo a la presencia de alelos amplificados, para este marcador se obtuvieron tres alelos, los cuales se agruparon en dos tipos alélicos homóciga (250 y 263) y otros dos de forma heteróciga (246/263 y 250/263) según se observa en la figura 29, posteriormente se evaluó el porcentaje de eficiencia de selección para las dos características asociadas a este marcador.

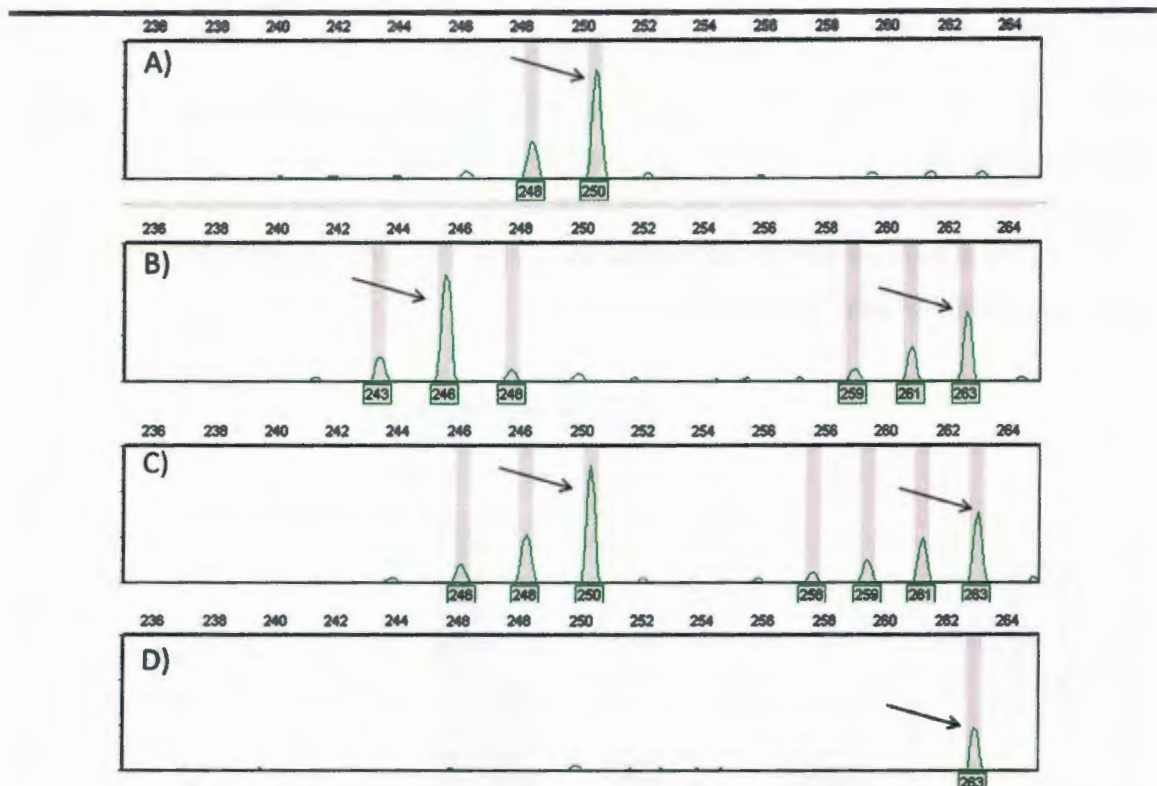


Figura 29. Formas alélicas obtenidas con el marcador mPgCIR161. Electroferograma obtenido a partir de una electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) A) Homocigoto para el alelo 250, B) Heterocigoto para los 246 y 263, C) Heterocigoto para los alelos 250 y 263, D) Homocigoto para el alelo 263.

El análisis de eficiencia de selección por cada tipo alélico indica que el tipo alélico 250/263, es la que presenta una mayor eficiencia para ambas características, del 69% para color de pulpa blanca y del 75% para individuos de menor contenido de °Brix. Para el resto de las formas alélicas, son pocos los individuos que presentan esos alelos y entre ellos no comparten el color de pulpa ni el porcentaje de °Brix, por lo que no se evaluó su eficiencia de selección.

Para el color de pulpa blanca, se contabilizó el número de individuos que presentarían esta característica, en cada uno de los tipos alélicos y se observó que, a pesar de que la eficiencia de selección es relativamente baja 70%, se observa una tendencia en cuanto a la proporción de individuos de pulpa blanca, cuando el alelo 263 está presente, cuando no

está el alelo 263, la proporción de individuos de pulpa blanca es del 1-1, para la formas heterócigas 246/263 y 250/263 la proporción de individuos de pulpa blanca incrementa, por cada individuo de pulpa rosa hay dos 2 de pulpa blanca y para la forma homóciga el 100% de los individuos son de pulpa blanca, lo cual indica que el color de pulpa puede estar en función del alelo 263 (Figura 30).

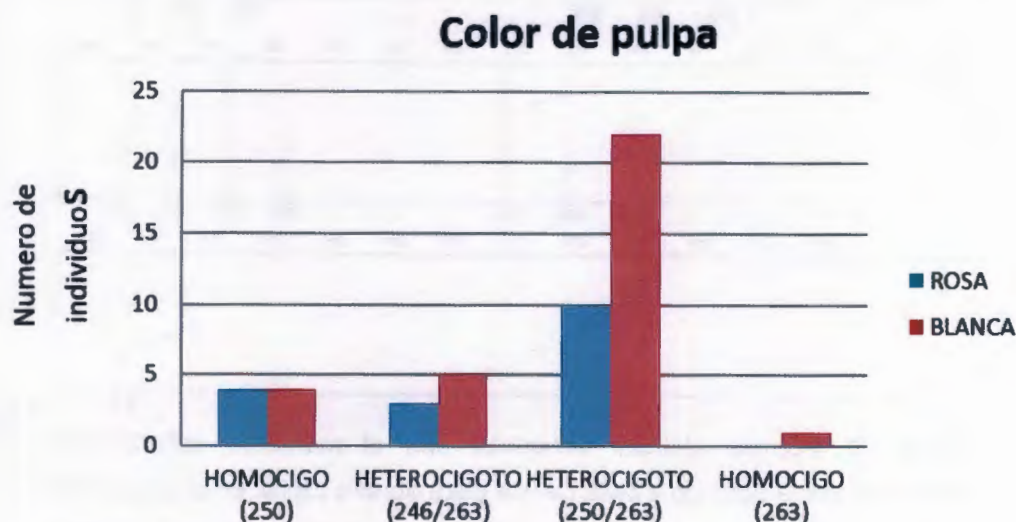


Figura 30. Proporción de individuos de pulpa blanca y de pulpa rosa por cada tipo alélico.

Para este mismo marcador se evaluó su eficiencia de selección para menor contenido de °Brix, si bien se observó que no existe una diferencia significativa entre los promedios de los °Brix entre los diferentes tipos alélicos, al igual que para color de pulpa, la proporción de individuos con menor contenido de °Brix parece aumentar con la presencia del alelo 263 (figura 31), este alelo puede ser empleado como marcador de selección temprana para predecir las características de menor °Brix y color de pulpa blanca, las cuales parecen estar relacionadas, cabe mencionar que la característica de color de pulpa blanca no está reportada en el mapa de ligamiento de guayaba, por lo que se aporta una nueva característica de interés agronómico ligada al marcador mPgCIR161. La diferencia en el tamaño obtenido de 263 pb con el reportado por Ritter *et al.*, (2008) de 246 pb, puede ser debido al igual que en los casos anteriores a que para la elaboración

del mapa de ligamiento realizado en base a poblaciones cubanas, sin embargo a pesar de eso, el marcador conserva su asociación al QTL de grados Brix, la cual parece estar relacionado con el color de la pulpa.

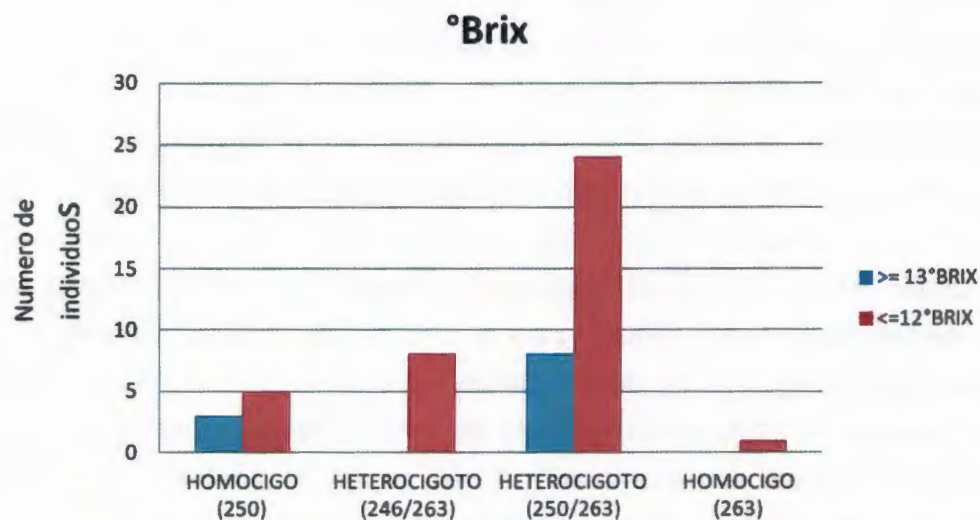


Figura 31. Proporción de individuos de menor y mayor contenido de ° Brix por cada tipo alélico

4.4. DISCUSIÓN

Una estrategia para validar la eficiencia en la predicción de la característica de los SSR empleados, es comparar el promedio del valor de cada una de las características para cada uno de los tipos alélicos y así saber si existe una diferencia significativa entre ellos (Longhi *et al.*, 2013), en base a esto, se identifican aquellos alelos que estuvieran confiriendo la característica y con esto sugerir que alelo sería el ideal para realizar la selección. Al igual que lo reportado por Longhi *et al.*, 2013, esta estrategia permitió descartar más del 50% de los individuos de la colección *ex situ* de guayaba que no tienen el perfil genético deseado para las tres características evaluadas, lo que para el productor implica un ahorro de dinero pues la población que se mantiene durante el proceso de mejora es menor, además, por la naturaleza codominante de los microsatélites, estos facilitan la identificación de individuos homocigotos y heterocigotos en generaciones tempranas, lo que permite la obtención de líneas puras en menor tiempo,

pues descartas del proceso aquellas líneas que sean heterocigas desde el inicio del proceso de mejora, lo que por medio de la selección tradicional no se puede hacer (Zhou *et al.*, 2003).

Es muy probable que la variación en la eficiencia de selección por cada alelo asociado a las características obtenidas con los distintos SSR, sea debido a las distintas distancias del marcador con el QTL, que entre más cercano esta del QTL, mayor es la asociación, lo que incrementaría la eficiencia, mientras que la variación en las diferencias de uno u otro tipo alélico para un mismo marcador, se puede explicar debido a que existe un porcentaje del efecto del QTL, sobre la característica, por lo que si este efecto es menor, puede ser que no sea suficiente para diferenciar entre el efecto causado por un alelo u otro (Maliepaard *et al.*, 2001), para el caso del marcador mPgCIR131 el QTL al que está ligado explica el 46% de la varianza del carácter, este marcador en nuestro estudio presenta una eficiencia de selección del 85%, la distancia al QTL es de 5.5 cM, para el QTL asociado al marcador mPgCIR136 explica el 59% de la varianza de la característica, este marcador es el que presenta la mayor eficiencia de selección (100%) y concuerda con que es el marcador con la menor distancia con el QTL, con 5cM, sin embargo el marcador mPgCIR161 no presenta el patrón esperado pues el efecto del QTL al que está ligado es del 81%, y la eficiencia de selección es del 75% para °Brix aunque este resultado se puede explicar porque la distancia entre este y el QTL es la mayor de 13.2 cM (Ritter *et al.*, 2010), un caso similar se presenta en trigo, en el que el marcador del tipo microsatélite asociado a resistencia a scab presenta una baja eficiencia a pesar de que el QTL explica el 50% de la variación de la característica (Bai *et al.*, 1999), este patrón se observa sobre todo en poblaciones fuera del mapeo genético (Zhou *et al.*, 2003; Waldron *et al.*, 1999). Esta baja eficiencia con respecto a la asociación puede ser explicada por que estos porcentajes de efectos sobre la característica están reportados para poblaciones de mapeo específicas, al estudiar genotipos diferentes aun que compartan gran parte de la información genética, los eventos de recombinación pudieran estar afectando la asociación entre los marcadores y los QTL, aunado a esto además que el rango del contenido de °Brix que en esas poblaciones (12°Brix) están por encima del promedio de nuestras accesiones (11°Brix) (Ritter *et al.*, 2010, Lepitre *et al.*, 2010)

entonces el rango de máximos y mínimos no es el mismo, por lo que la discriminación entre un individuo de alto contenido con uno de bajo contenido, depende de la población de estudio. Por otra parte la característica de color de pulpa no está reportada dentro de los QTL asociados a microsatélites del GUAVAMAP, sin embargo en investigaciones anteriores a esta del grupo de investigación (no publicado) se ha visto que este marcador es capaz de discriminar entre individuos de pulpa blanca y pulpa rosa, en base a estos resultados se valida el uso de este marcador para ambas características. Esta discrepancia entre la eficiencia de uno y otro marcador y el posible efecto del QTL en las poblaciones ajenas a las de mapeo, se explica debido a que en México la mayoría de los cultivos en sus inicios fueron obtenidos por medio de cruces no controladas (Perales *et al.*, 2005), lo que esta incrementado la probabilidad de que por eventos de recombinación las asociaciones del marcador y el QTL se disminuyan, a causa de una probable separación entre el QTL de interés y el marcador, siendo que entre más cercano este el marcador del QTL, parece tener una mayor eficiencia de la selección (Zhou *et al.*, 2003), se espera que al tener las líneas puras, la eficiencia del marcador aumente, sucede lo contrario con la presencia de individuos heterocigos, la cual disminuye la eficiencia de selección así como la predicción de la característica (Anderson *et al.*, 2001).

Son varios los programas con avances en la obtención de mapas de ligamiento, algunos de ellos en melón (*Cucumis melo* L) (Oliver *et al.*, 2001); kiwi (*Actinidia chinensis*) (Testolin *et al.*, 2001); manzana (*Malus pumila* Mill) (Davey *et al.*, 2006), pero son pocos los que han validado con éxito el empleo de estos marcadores en poblaciones ajenas a la de ligamiento, y la mayoría de estos son con respecto a resistencia por ejemplo en frijol para resistencia a *Phaeoisariopsis griseola* y *Colletotrichum lindemuthianum* (Namayanja *et al.*, 2006; Nayibe *et al.* 2007), en papa para resistencia al virus PVY (Ottoman *et al.*, 2009). Son pocos en los que se ha validado el empleo de marcadores para características cuantitativas como tamaño y forma, suavidad, textura, contenido de azúcares del fruto, destacan papaya (Blas *et al.*, 2011), papa (Lili *et al.*, 2013) y manzana (Longhi *et al.*, 2013), que ha permitido establecer con éxito programas de mejora. La importancia de esta estrategia es que por medio de la selección temprana permitirá la obtención de líneas puras en menos tiempo, además de reducir los costos de mantener elevado número de individuos durante el experimento, la aplicación de esta estrategia además se puede usar, para obtener frutos de características deseadas y satisfacer las necesidades del

productor, industria y consumidor, que a pesar de que esto se ha realizado tiempo atrás, el proceso tradicional por lo general lleva de entre 10 y 15 años (Lili *et al.*, 2013; Darwin *et al.*, 2009; Milbourne *et al.*, 2007; Barr *et al.*, 2000) mientras que empleando esta estrategia se pueden observar los resultados en el tercer o cuarto año (Masuelli, 1999), lo que en el caso de guayaba significa poder obtener fenotipos deseables en cuanto a las características de pulpa blanca, menor grosor interno y externo de pulpa y contenido de grados brix, para las cuales se validó el empleo de 4 marcadores para la selección temprana de individuos con estas características, aunado a esto la posibilidad de usar más de un marcador al mismo tiempo permite mejorar varias características en un solo proceso de mejora.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J., Stack, R. W., Liu, S., Waldron, B. L., Coyne, C., Moreno-Sevilla B., Mitchel-Fetch, J., Song, Q. J., Cregan, P. B., and Froberg, R. C. 2001. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTL in two wheat population. *Theor. Appl. Genet.* 102:1164-1668.
- Asins, M. J. 2002. Present and future of Quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breed.* 12:281-291.
- Bai, G. H., Kolb F. L., Shaner, G. E and Domier, L. L. 1999. Amplified fragment length polymorphism marker linked to major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology.* 89:343-348.
- Barr, A.R., Jefferies, P., Warner, D.B., Moody, K.J., Chalmers and P. Langridge. 2000. Marker Assisted Selection in Theory and Practice. In: VIII international Barley Genetics Symposium. Pp 11-16.
- Blas, A. L., Yu Q., Veatch O. L., Paull R. E., Moore P. H. and Ming R. 2011. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. *Mol breeding.*
- Collard B. C. Y. and Mackill D. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty first century. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363:557-572.

- Darwin-Robbins, Matthew and Staub-Jack, E. 2009. Comparative analysis of marker-assisted and phenotypic selection for yield components in cucumber. *Theor Appl. Genet.* 119:621-634.
- Davey, M., K. Kenis and J. Keulemans. (2006). Genetic Control of Fruit Vitamin C Contents. *Plant Physiology.* 142: 343-351.
- de la Cruz-Perales, M. A., Padilla-Ramírez, J.S., González-Gaona, E.H., Rogelio-Reyes, Phillips. 2005. Manual para la producción integral del cultivo de la Guayaba. P 12-83
- Delannay, X., McLaren, G. and Ribaut, L. M. 2006. Fostering molecular breeding in developing countries. *Mol Breed.* 29(4):857-873.
- Lepitre, V., Nansot, G., Grangeon, R., Pomies, V., Rivallan, R., Risterucci, A.M., Valdés-Infante, Rodríguez-Medina, N. N., Muth, J., Boike, J., Prüfer, D., Becker, D., Rohde, W., Ritter, E. and Billotte. 2010. The microsatellite (SSR)/ AFLP reference linkage Map of guava. In IInd IS on Guava and other *Myrtaceae*. *Acta Hort.* 849.
- LiLi, Tacke, Eckhard, Hans-Reinhardt Hofferbert, Lübeck, Jean, Strahwald Josef, M. Draffehn Astrid, Walkemeter, Birgit and Gebhardt, Christiane. 2013. Validation of candidate genes markers for marker-assisted selection of potato cultivars with improved tuber quality. *Theor Appl Genet.* 126: 1039-1052.
- Longhi, S., Capellin, L., Guerra, W., and Costa, F. 2013. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol breeding.* 32:841-852.
- Maliepaard, C., Sillanpää, M.J., van Ooijen, J.W., Jansen, R.C., Arjas, E. 2001. Bayesian versus frequentist analysis of multiple quantitative trait loci with an application to an outbred Apple cross. *Theor Appl Genet.* 103:1243-1253.
- Masuelli, W. Ricardo. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. 1999. *Avances en horticultura.* 4(1).
- Milbourne, D., Pande B. and Bryan GJ. 2007. In: Kole C (ed) *Genome mapping and molecular breeding in plants*, vol 3., Pulses, sugar and tuber crops Springer Berlin, Heidelberg. Pp 205-236.
- Moose, S. P., Mumm, R. H. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol.* 147:969-977

- Namayanja, A., Buruchara, R., Mahuku, G., Rubaihayo, P., Kimani, P., Mayanja, S. and Eyedu, H. 2006. Inheritance of resistance to angular leaf spot in common vean and validation of the utility of resistance linked markers for marker assisted selection out side the mapping population. *Euphytica*. 151:361-369
- Nayibe L., W. Blair, M. y A. Ligarreto, Gustavo. 2007. Uso de selección asistida con marcadores para resistencia a antracnosis en frijo común. *Agronomía colombiana*. 25(2):207-2014
- Oliver, M., García-Mas J., Cardús M., Pueyo N., López-Sesé A., Arroyo M. Gómez-Paniagua H., Arús P. M. C de Vicente. (2001). Construction of a reference linkage map for melon. *Genome*. 44(5): 836-845
- Ritter, E., Herrán, A., Ariz, U., Muth, J., Billotte, N., O' Connors, A., Sánchez-Teyer L., Fermin, G., Santos, C. Rodríguez, M., Valdés-Infante, J., Rohde W. 2008. Comparative linkage mapping in three guava mapping populations and construction of an integrated reference map in guava. 2nd International Symposium on Guava and other Myrtaceae.
- Ritter, E., Rodríguez-Medina, N. N., Velásquez, B., Rivero D., Rodríguez, J.A., Martínez, F. and Valdés-Infante, J. 2010. QTL (Quantitative Trait Loci) Analysis in Guava. In IInd IS on Guava and other *Myrtaceae*. *Acta Hort*. 849.
- Testolin, R., Huang, W. G., Lain O., Messina R., Vecchione A., Cipriani G. (2001). A kiwifruit (*Actinidia spp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 103(1): 30–36.
- Waldron, B. L., Moreno-Sevilla, B., Anderson, J. A., Stack, R. W. and Froberg R. C. 1999. RFLP mapping of QTL for Fusarium Head Blight resistance in wheat. *Crop Sci*. 39:805-11
- Zhou, W.C, Kolb, F. L., Bai, G. H., Domier, L. L., Boze, L. K., and Smith, N. J. 2003. Validation of a major QTL for scap resistance whit SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding*. 122:40-46
- .

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

La selección fenotípica en algunas especies frutales como en guayabo se ha desarrollado por mucho tiempo, tanto que agricultores experimentados conocen la relación entre un carácter fenotípico como por ejemplo el tamaño de la hoja con el tamaño del fruto, en base a este conocimiento seleccionan a los individuos de acuerdo al tamaño de hoja, esperando que tenga la característica relacionada deseada, sin embargo este tipo de marcador varía según la población, lugar de cultivo e incluso con el clima por lo que no es aplicable para todos los casos (Kephart, 1990). Se ha investigado sobre nuevas estrategias para mejorar el proceso de selección, con el advenimiento de marcadores de ADN que en su mayoría son secuencias que no se expresan, se ha podido “marcar” genes, con base en la asociación del marcador al gen de interés, la cual está determinada por la cercanía del marcador con este (Tuvevsson *et al.*, 2009; Collard, 2005; Salas *et al.*, 2014). La aplicación de marcadores moleculares como herramienta de selección (MAS) se considera una herramienta adicional muy útil para programas de mejora, una de las ventajas de aplicar MAS, es que permite conocer previamente el pool-genético, además que al realizar la selección de individuos con el genotipo deseado, existe la posibilidad de poder piramidar varios genes y se disminuye el número de individuos que avanza en cada ciclo de mejora, reduciendo así el tamaño del experimento, lo cual hace que el proceso de mejora sea más eficiente (Lammert *et al.*, 2010; Dwivedi *et al.*, 2007; Clegg *et al.*, 2004). Una de las principales limitantes de la selección por marcadores moleculares es la extracción de ADN en grandes número de individuos, sin embargo el desarrollo de nuevas técnicas de extracción de ADN de alta eficiencia y rapidez ha permitido el empleo de marcadores moleculares en programas de mejora, los cuales han tenido resultados satisfactorios, lo que ha convencido a mejoradores en emplear MAS para sus plantaciones (Lammerts *et al.*, 2010)

Las características morfoagronómicas de interés para el mejoramiento como: tamaño de fruto, color del fruto, textura del fruto, contenido de sólidos solubles, etc. Son generalmente controladas por más de un gen, los cuales cada uno de ellos tiene una contribución al valor fenotípico final, lo que se conoce como QTL (Ochieng *et al.*, 2007; Valdés-Infante, 2012), la asociación de un marcador a estos QTL puede llegar a tener un

gran impacto en especies frutales, pues al aplicar estos marcadores como criterio de selección temprana se evita esperar la obtención y maduración del fruto para realizar la selección (Sánchez-Pérez *et al.*, 2004).

El guayabo (*Psidium guajava* L.), es una de las especies de las *Myrtaceae* más cultivadas en el mundo (Nakasone y Paull, 1998), el interés general de mejoramiento es sobre la fruta, la que tiene una gran importancia económica para países como India, China, Estados Unidos de América, Cuba y México (Tate, 2000). La guayaba es popular debido a su aroma, sabor y propiedades nutricionales (Varmundy, 2013), algunas de las características de interés de mejora son: el tamaño del fruto, el grosor de la pulpa, el número de sólidos solubles, el contenido de vitamina C y el color de la pulpa. Para estas características se identificaron 50QTL en estudios previos, los cuales fueron asociados a marcadores del tipo SSR y AFLPs (Valdés-Infante, 2009; Rodríguez, 2005; Valdés-Infante *et al.*, 2003).

Los marcadores microsatélites (SSR), se definen como secuencias simples repetidas de di o tri nucleótidos, son de los más empleados como marcadores de selección, principalmente por su característica de ser codominante, lo que permite la identificación de individuos homocigos y heterocigos. Estos marcadores han tenido un fuerte impacto en los programas de mejoramiento por MAS, posiblemente a que la aplicación y visualización de estos es de las más sencillas con respecto al resto de los marcadores empleados para el mapeo de ligamiento a QTL (Abdel-Mawood, 2012; Ribaut *et al.*, 2010; Bernardo, 2008), en base a esto, se decidió seleccionar los microsatélites asociados a QTL para características de fruto previamente descritos (Valdés- Infante *et al.*, 2012; Risterucci *et al.*, 2010; Valdés-Infante, 2009;Valdés-Infante *et al.*, 2007; Risterucci *et al.*, 2005) y evaluar su aplicación en el germoplasma mexicano. Los microsatélites que se seleccionaron son los siguientes: para °Brix mPgCIR161 y mPgCIR254; para color de pulpa mPgCIR199, mPgCIR137, mPgCIR161; para grosor externo de pulpa mPgCIR020, mPgCIR136, mPgCIR243, mPgCIR284; para grosor interno de pulpa mPgCIR131 y mPgCIR243; para el número de semillas mPgCIR243, mPgCIR034, mPgCIR161, mPgCIR208; para vitamina c mPgCIR007, mPgCIR094, mPgCIR208 y por ultimo para el índice de madurez el mPgCIR288. De los cuales 4 marcadores resultaron ser útiles como criterio de selección temprana en guayaba mexicana, el mPgCIR161 para las

características de menor contenido de °Brix e individuos de color de pulpa blanca, el mPgCIR136 para menor grosor de pulpa externa, el mPgCIR131 para individuos con menor grosor de pulpa interna y posiblemente también el mPgCIR007 para individuos con mayor contenido de vitamina C.

En general un programa de mejora consiste en un proceso cíclico, en el cual en cada ciclo se evalúan los individuos de una población determinada y como resultado de esta evaluación se descartan aquellos que no sean deseables y se seleccionan los que tengan las características de interés para luego ser cruzados entre sí y dar inicio a un nuevo ciclo (Sala *et al.*, 2001). La aplicación de los marcadores SSR, seleccionados para características de fruto en guayaba mexicana, al ser empleados como criterio de selección en un programa de mejora permite ofrecer una herramienta capaz de seleccionar individuos de manera temprana, lo que ayudaría a reducir el número de individuos que se mantiene en cada ciclo y obtener los genotipos deseados con mayor rapidez, se ha reportado que empleando esta estrategia se ha reducido en un 50% el número de generaciones necesarias para obtener las nuevas variedades mejoradas (Sala *et al.*, 2001). Una de las posibles estrategias para aplicar en guayaba, puede ser la retrocruzas asistidas por marcadores moleculares, en la cual la selección en una primera etapa de los parentales con características fenotípicas deseables se complementa con una caracterización genotípica con los marcadores SSR, seguido de la selección por marcadores de la progenie con el genotipo esperado para la cruce con el padre recurrente, ya sea haciendo este proceso para una sola característica empleando solo un marcador o para varias características usando diferentes marcadores asociados a cada una de ellas.

Se reporta que MAS tiene mayor eficiencia que la selección fenotípica tradicional (Edwards y Page 1994; Lande y Thompson, 1990), sin embargo existe una discrepancia con respecto a esto, puesto que hay estudios en los que tomando en cuenta criterios como el tiempo, costo, y beneficio, la eficiencia de la selección fenotípica es mayor que la selección asistida (Davies *et al.*, 2006; Hoeck *et al.*, 2004) en otros casos, no hay diferencia de emplear una u otra estrategia (Moreau *et al.*, 2004; Stromberg *et al.*, 1994), aun que es importante destacar que la mayoría de estos casos son para especies de ciclo corto y ninguno para frutales. En los pocos casos que se han reportado la aplicación de la

selección asistida por marcadores en especies frutales se recomienda el uso de estos marcadores para la selección y no las características fenotípicas, aunque no se han realizado estudios de comparación con respecto al tiempo de respuesta o costo beneficio entre un tipo de selección y otra (Longhi *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2012; Blas *et al.* 2011; Oliveira *et al.*, 2010; Darwin *et al.*, 2009). Cabe mencionar que además del tipo de cultivo, es de vital importancia seleccionar marcadores que estén estrechamente ligados a los QTL, pues se sabe que esto incrementa la eficiencia de selección, para el caso de frutales, esto permitirá realizar una selección temprana, lo que por selección fenotípica no se puede. Aunque aplicando en conjunto ambas estrategias se puede obtener mejores resultados (Luttikholt, 2009), al menos en etapas tempranas del proceso de mejora, cuando es necesario tener bien caracterizados fenotípicamente y correlacionar la información fenotípica y genotípica, una vez que el programa ya esté bien establecido, las futuras selecciones ya se pueden llevar a cabo por marcadores moleculares, por lo que para un programa futuro de mejoramiento en guayaba mexicana se sugiere:

- Disponibilidad de germoplasma con amplia base genética (colectas, introducciones, segregantes de polinización abierta) en una colección *ex situ*.
- Caracterización físico-química del germoplasma.
- Selección de individuos que tengan las características fenotípicas deseadas (menor grosor interno de pulpa, mayor grosor externo de pulpa, color de pulpa blanca, contenido de °Brix)
- Caracterización molecular de estos individuos con los microsatélites asociados a dichas características (mPgCIR131, mPgCIR136, mPgCIR162)
- Programa de cruzamientos y obtención de la progenie (F1) y selección del genotipo deseable por SSR.
- Realizar las retrocruzas con los individuos seleccionados y obtención de la población F2, selección de genotipo deseable por SSR.
- Al final del proceso de mejora realizar una validación comparando el genotipo

deseado con el fenotipo esperado, para comprobar la eficacia de MAS.

En la figura 32 se muestra un esquema sugerido para la aplicación de MAS para la obtención de nuevas variedades para un programa de mejoramiento dentro de la colección *ex situ* del INIFAP.

5.1. CONCLUSIONES

- Cuatro marcadores SSR asociados a QTLS, fueron seleccionados por conservar su asociación a las características de °Brix, grosor externo e interno de pulpa y color de pulpa, aun en poblaciones fuera de las de mapeo.
- La eficiencia de selección para el marcador mPgCIR161 asociado a menor contenido de grados Brix y color de pulpa blanca es de 75% y 69% respectivamente; para el marcador mPgCIR136 asociado a menor grosor externo de pulpa la eficiencia fue de 100%; en el caso del mPfCIR131 asociado a menor grosor interno de pulpa es de 85%. Lo que indica que pueden ser empleados como criterios de selección en programas de mejora para guayaba mexicana.

5.2. PERSPECTIVAS

- La validación de la aplicación de los SSR asociados a características de interés en Guayaba Mexicana como marcadores de selección, podría permitir el desarrollo de un programa de mejoramiento basado en MAS.
- Reducción del número de generaciones para la estabilización de los genotipos generados.
- Aprovechamiento de la variabilidad genotípica de la Guayaba Mexicana.

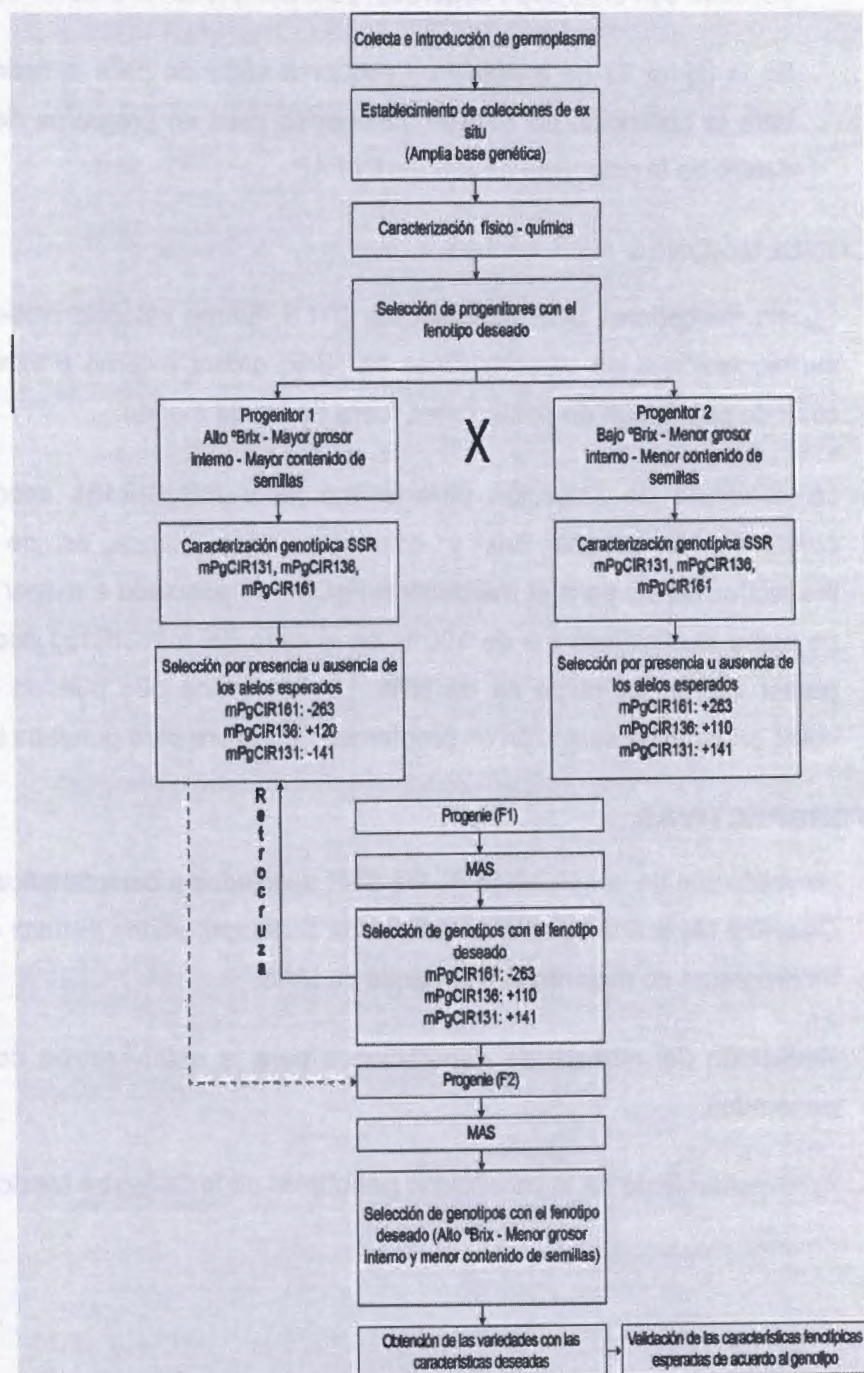


Figura 32. Esquema de la aplicación de MAS para un programa de mejora en guayaba mexicana.

5.3. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Mawgood, A. L. 2012. DNA based techniques for studying genetic diversity. In: Mahmut Caliskan (ed). Genetic diversity in Microorganisms. In Tech, Crotatia. Pp. 95-122.
- Bernardo, R. 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learnin from the last 20 years. Crop Sci. 48:1649-1664
- Blas, L. Andrea, Yu, Qingyi, Veatch, J., Olivia, Paull, E. Robert, Moore H., P., Ming Ray. 2011. Mol Breeding. Springer. DOI 10.1007/s11032-011-9562-1.
- Clegg, M., Cheng, H., Ashworth, V. 2004. Application of molecular markers to avocado improvement. Proceedings of the California Avocado Research Symposium. University of California, Riverside. California Avocado Commission, pp. 24-28
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., and Pang E.C.K. 2005. An introduction to marker, quantitative trait loci (QTL), mapping and marker assisted selection for crop improvement. The basic concepts. Euphyttica 142:169-196.
- Darwin-Robbins, Matthew and Staub-Jack, E. 2009. Comparative analysis of marker-assisted and phenotypc selection for yield components in cumber. Theor Appl. Genet. 119:621-634.
- Davies, J., Berzonsky, W. A., Leach, G. D. 2006. A comparision of marker-assisted and phenotypic selection for high grain protein content in spring wheat. Euphytica. 152:117-134
- Dwivedi, S.L., Crouch, J.H. Mackill, D. J., Xu Y., Blair, W. M. Ragot, M., Upadhyaya, H. D., and Ortiz, R. 2007. The molecularization of public sector crop breeding: Progress, problems and prospects. Adv Agron. 95:163.318.
- Edwards, M. D. and Page, N. J. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. Theor Appl Genet. 88:376-382.
- Ge Yue, Tao Wang, Na Wang, Zhe Wang, Cui Liang, Nirala Ramchiary, Su-Ryun Choi, Yong Pyo Lim, Zhong Yin Pia. 2012. Genetic mapping and localization of Quantitative trait loci for Cholophyll content in Chinese Cabbage (*Brassica rapa spp.*) Scientia horticulturae. 147:42-48

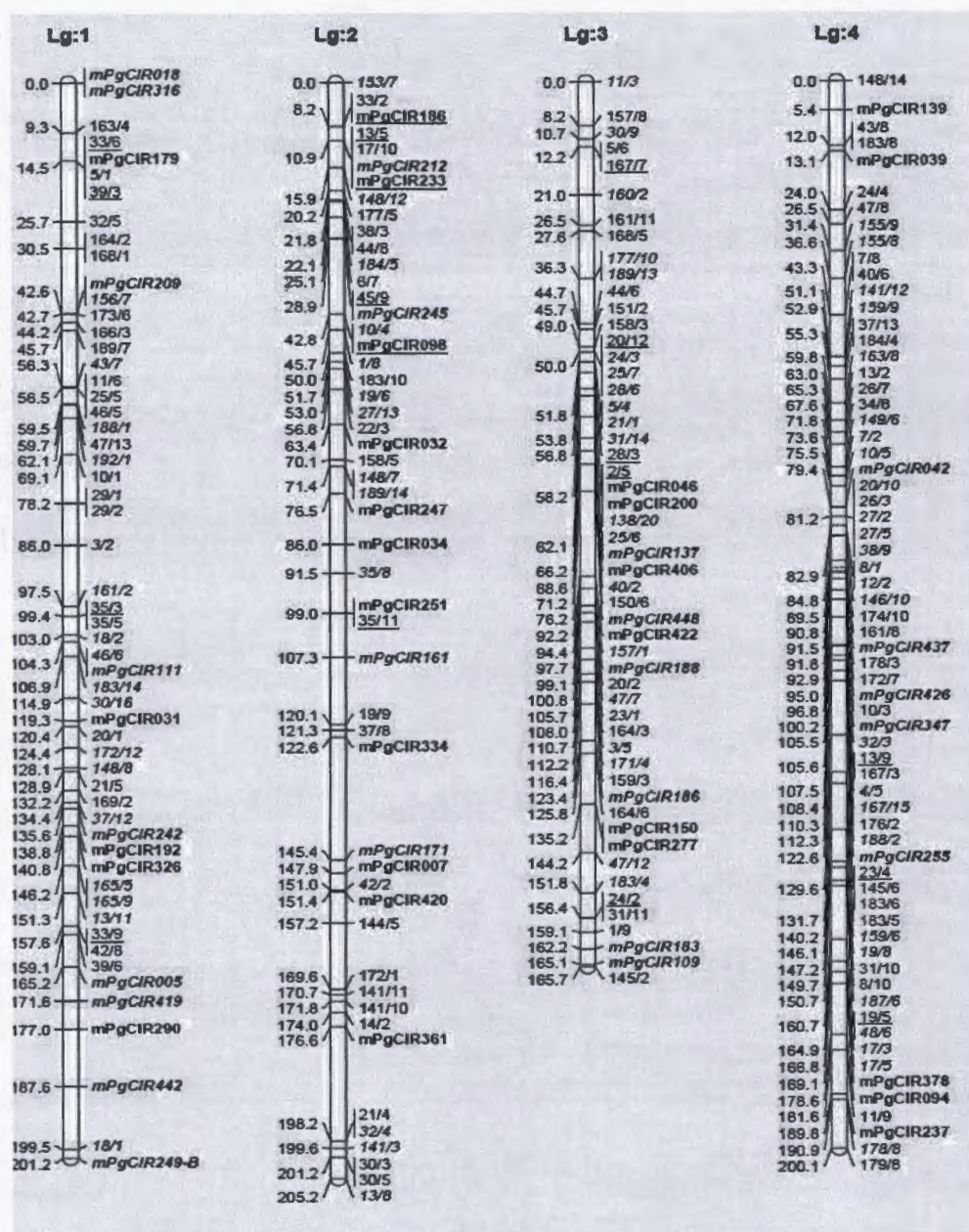
- Hoeck, J. A., Fehr, W. R., Shoemaker, R. C., Welke, G. A., Johnson S.L., Cianzio, S. R. 2003. Molecular marker analysis of seed size in soybean. *Crop Sci.* 43:68-74.
- Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Am J Bot.* 77:693-712.
- Lammerts Van Bueren, E.T., Backes G., de Vriend, H. and Østergard, H. 2010. The role of molecular markers and marker assisted selection in breeding for organic agriculture. *Euphytica*, 175:51-64.
- Lande, R., and Thompson, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of qualitative trait. *Genetics.* 124:743-756.
- Longhi, S., Capellin, L., Guerra, W. and Costa, F. 2013. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol breeding.* 32:841-852.
- Luttikholt, L. 2009. Principles of organic agriculture. In: Østergard, H, Lammerts, van Bueren, E.T, Bouman-Smits (eds) Proceedings of the BioExploit/Eucarpia workshop on the role of marker assisted selection in breeding varieties for organic agriculture, BioExploit, Wageningen, the Netherlands, pp 45-50, 25-27. www.Eucarpia.org. consultado octubre 2013.
- Moreau, L., Charcosset, A., Gallais, a. 2004. Experimental evaluation of several cycles of marker assisted selection in maize. *Euphytica.* 137:11-118.
- Nakasone, H. and., Paull, R. E. 1998. Tropical fruits. CAB Queensland Agri. J. III, Walirgrod. Pp. 93-98.
- Ocrieng, J. W., D. A. Steane, P. Y. Ladiges, P. R. Baverstock, R. J. Henry, M. Shepherd. 2007. Microsatellites retain phylogenetic signals across genera in *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Genetics and Molecular Biology.* 30 (4): 1125-1134.
- Oliveira-Eder, Jorge, Santos-Silva, Alne dos, de Carvillo-Moraes, Fabiana, Costa-Vanusia Batista de Oliveira, Loyola-Dantas Jorge L. 2010. Polimorphic microsatellite makers for *Carica papaya* L. and its use in molecular marker assisted selection.
- Ribaut, J. M., de Vicente M. C., Delannay, X. 2010. Molecular breeding in developing countries: Challenges and perspectives. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:1-16.

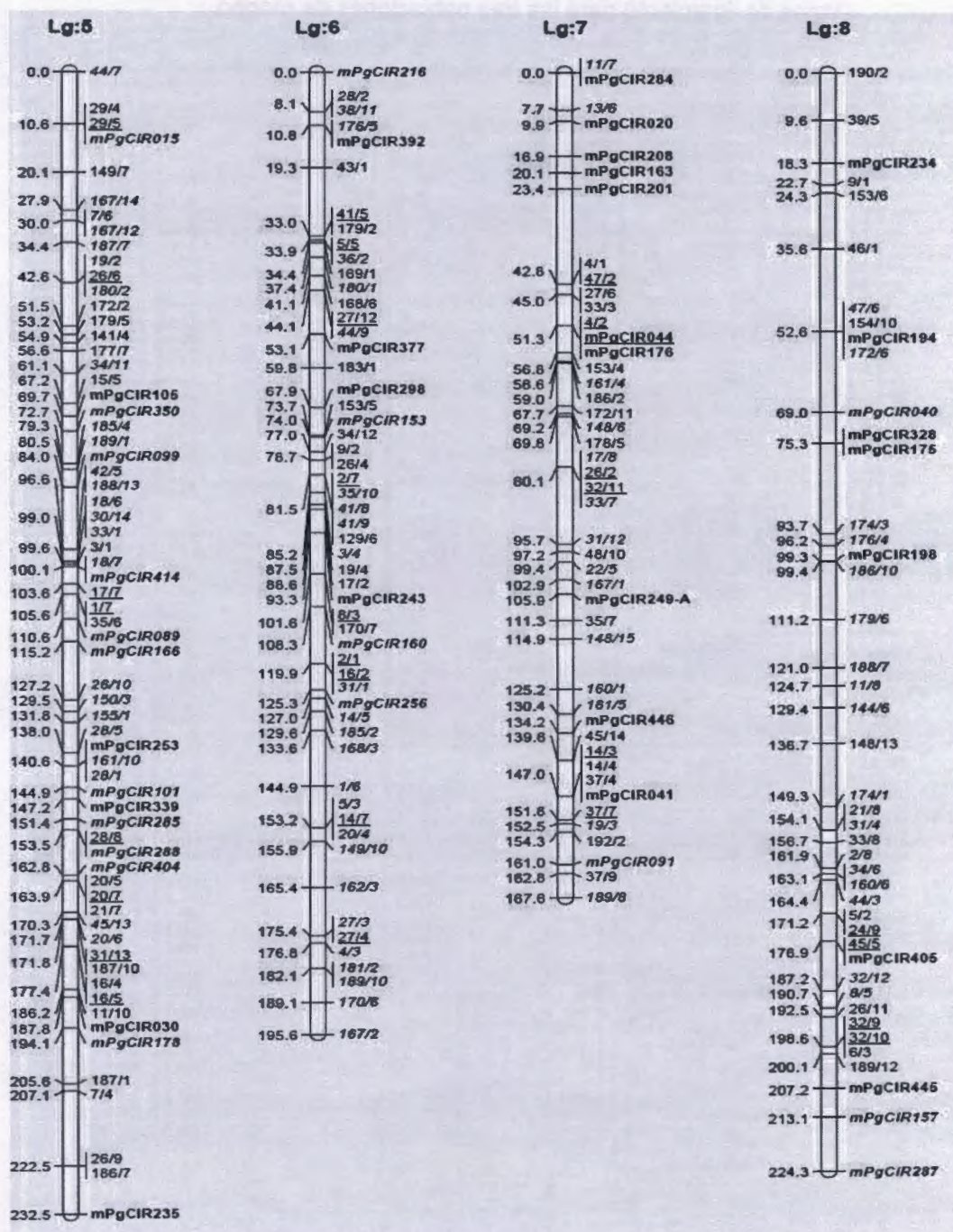
-
- Risterucci, A.M., Duval, M.F., Rohde, W. and Billotte, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. molecular Ecology Notes 5, 745-748.
 - Rodríguez, N.N., Valdés- Infante, J., Becker, D., Velázquez, B., González, G., Sourd, D., Rodríguez, J., Billotte, N., Risterucci, A.M., Rohde. 2005. Characterization of guava accession by SSR marker, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. Pp 201-215. In: R.K. Pathak, G. Singh, r. Kishum and E. Chandra ed. Proceedings of the first international guava symposium. Lucknow, India. December 2005.
 - Salas, C., Bulos, M., Fresco, A, Altieri, E. 2014. Marcadores moleculares y mejoramiento genetico de cultivos. En Biotecnología y mejoramiento vegetal II, Edit. INTA. Argentina. Pp 325-337
 - Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Martínez-Gomez, P., Howad, W., Arus, P. 2004. Construcción of linkage map and QTL analysis using SRR markers. ISHS. Acta Horticulturæ /26: IV International Symposium on Pistachios and Almonds. P. 10.
 - Stromber, L. D., Dudley, J. W. and Rufener, G. K. 1994. Comparing conventional early genetation selection with molecular marker assisted selection in maize. Crop Sci. 34:1221-1225
 - Tate, D. 2000. Tropical Fruit of Thailand. Asia Books Co. Ltd., Bangkok, Thailand.
 - Tuveson, S., Dayteg, C., Hagberg, P., Manninen, O., Tanhuanpaa, P., Tenhola-Rponinen, T., Kiviharhu, E., Föster, J., Schondelmainer, J., Lafferty, J., Marn, M., Fleck, A. 2007. Molecular marker and doubled haploids in European Plant breeding programmes. Euphytica. 158:305-312.
 - Valdés-Infante, J. 2009. Utilización de caracteres morfoagronómicos y de marcadores de AND para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava* L) en Cuba. Tesis de doctorado en ciencias Biológicas. Facultad de Biología. UH. Cuba. 100p
 - Valdés-Infante, J. Nerdo-Rodríguez, N., Bárbara Velásquez J., Gaspar-Sourd D., González-Gaona, Rodríguez, J., Rohde W. 2012. Herramientas para un programa de mejoramiento genético del Guayabo (*Psidium guajava*L.) en Cuba. Agronomía Costarricense 36(2): 111-129. ISSN:0377-9424.
-

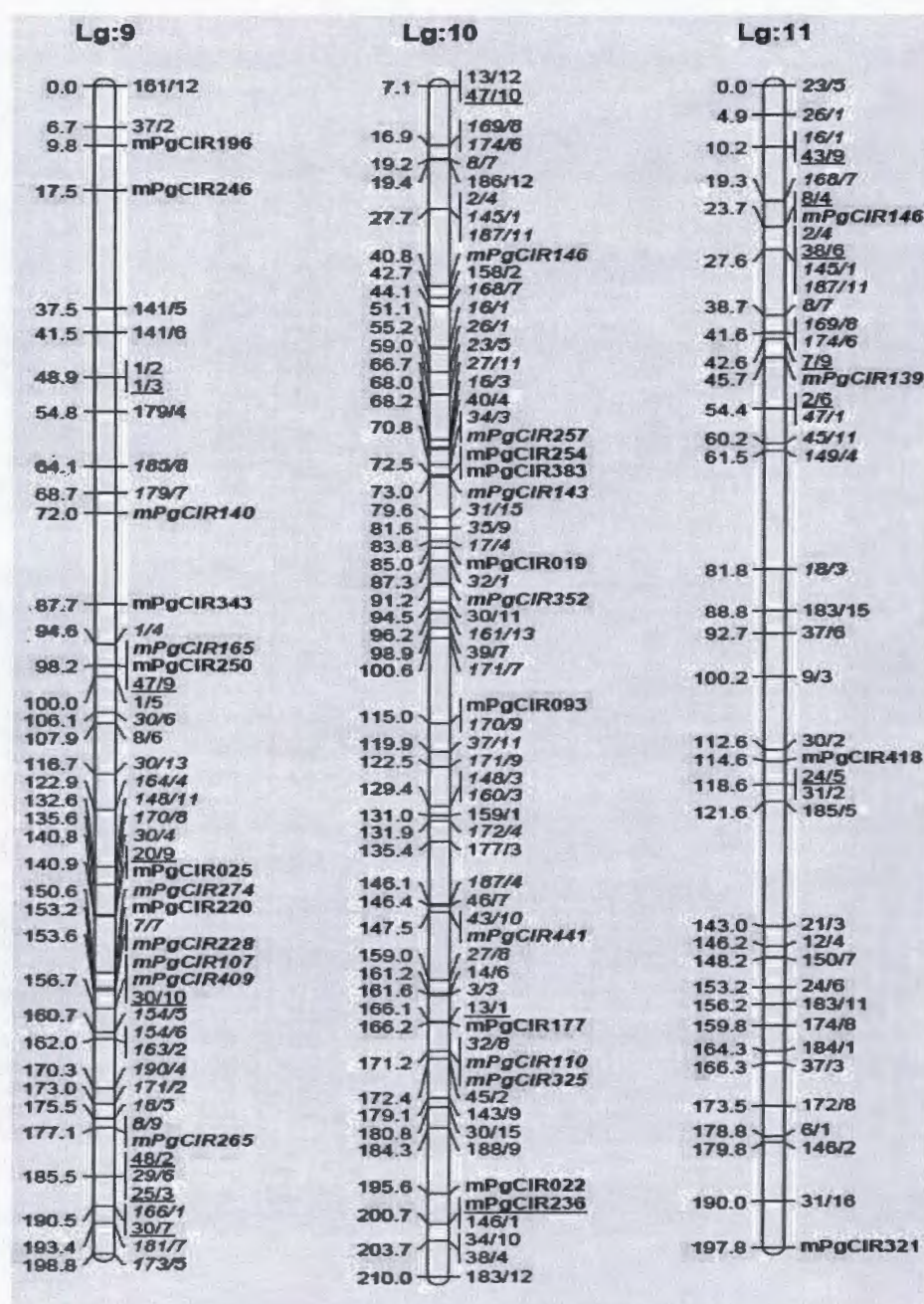
- Valdés-Infante, J., Becker, D., Rodríguez, N.N., Velázquez, B., González, G., Sourd D., Rodríguez, J., Ritter, E., Rohde, W. 2003. Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTL for vegetative characters. J.Genet., y Breed 57:349-358.
- Valdés-Infante, J., N. N. Rodríguez, B. Velázquez, D. Sourd, G. Espinosa, and W. Rohde. 2007. Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in cuba. Cultivos tropicales. 28 (3): 5-11.
- Varmundy, V. 2013. Guava: Potential untapped. Fact for you. Disponible en:http://www.ffymag.com/admin/issuepdf/Guava_FFYApril-13.pdf. (consultado Abril, 2013).

ANEXOS

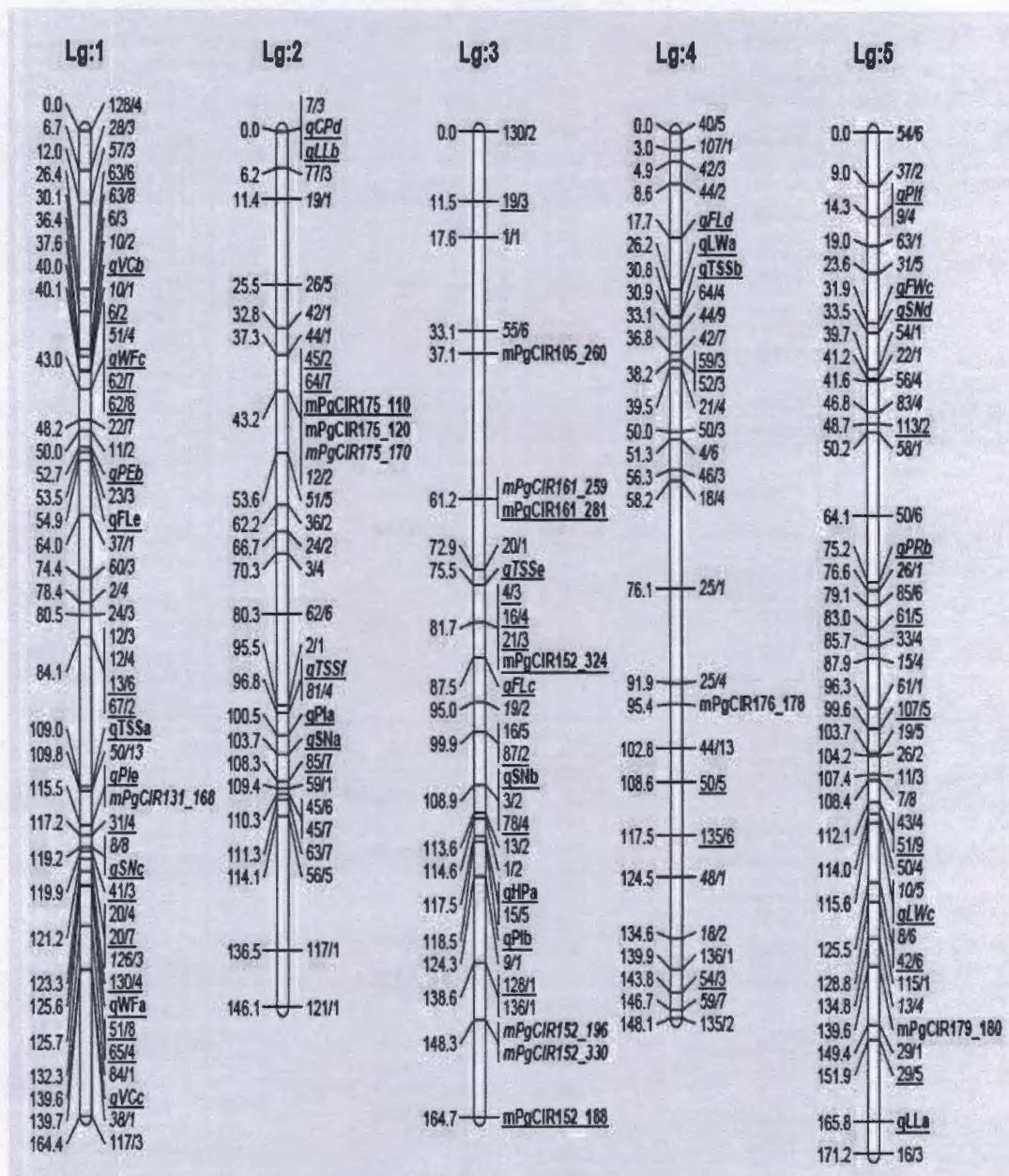
ANEXO I. Mapas de ligamiento para las tres poblaciones de mapeo.

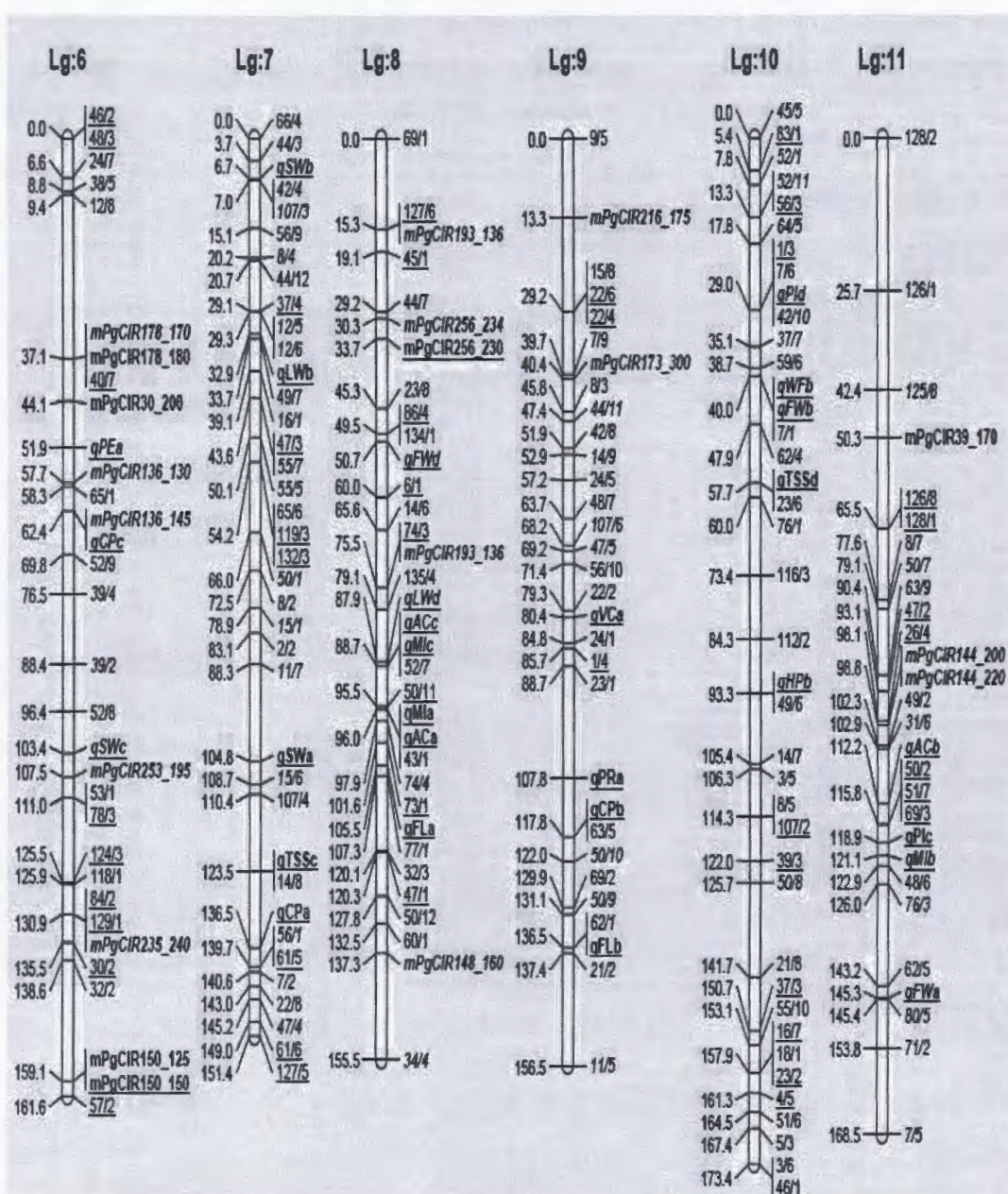




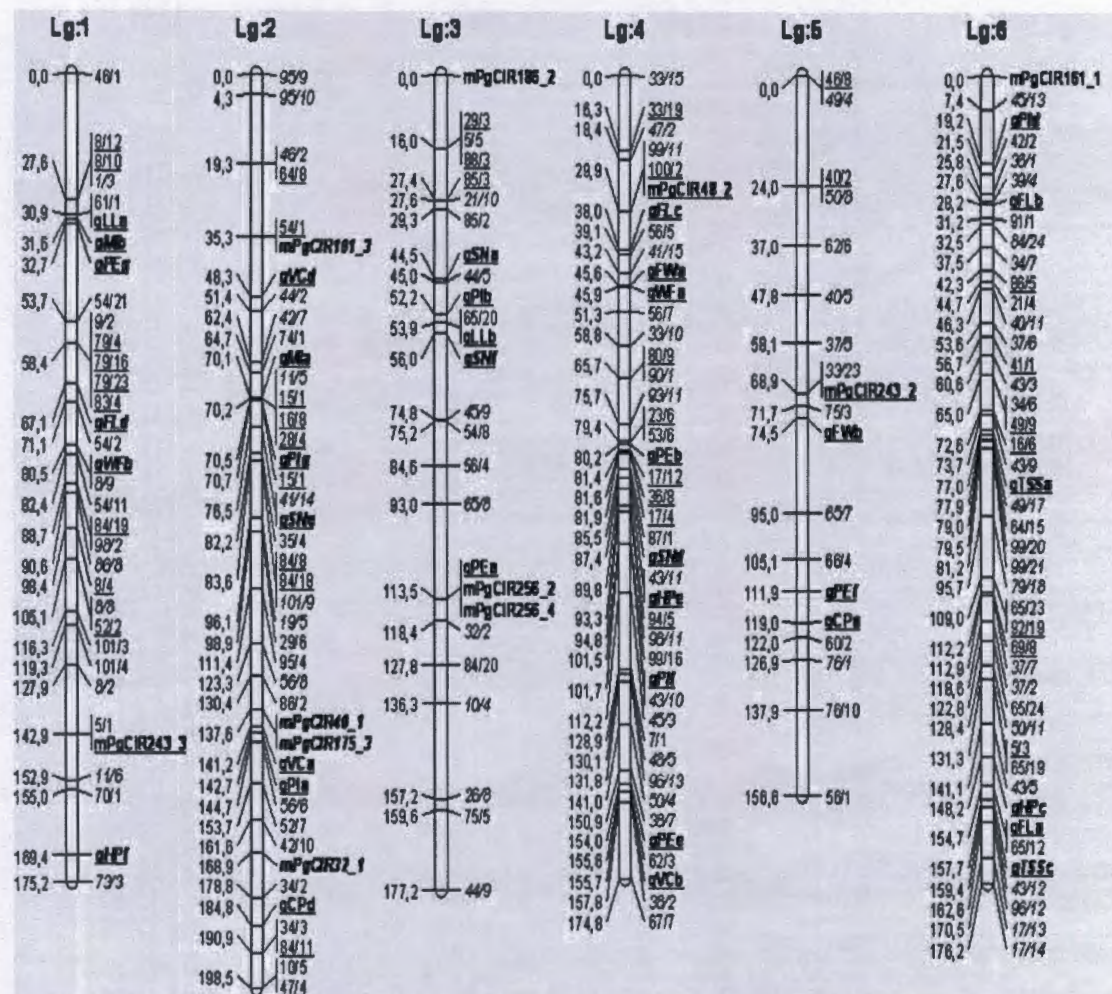


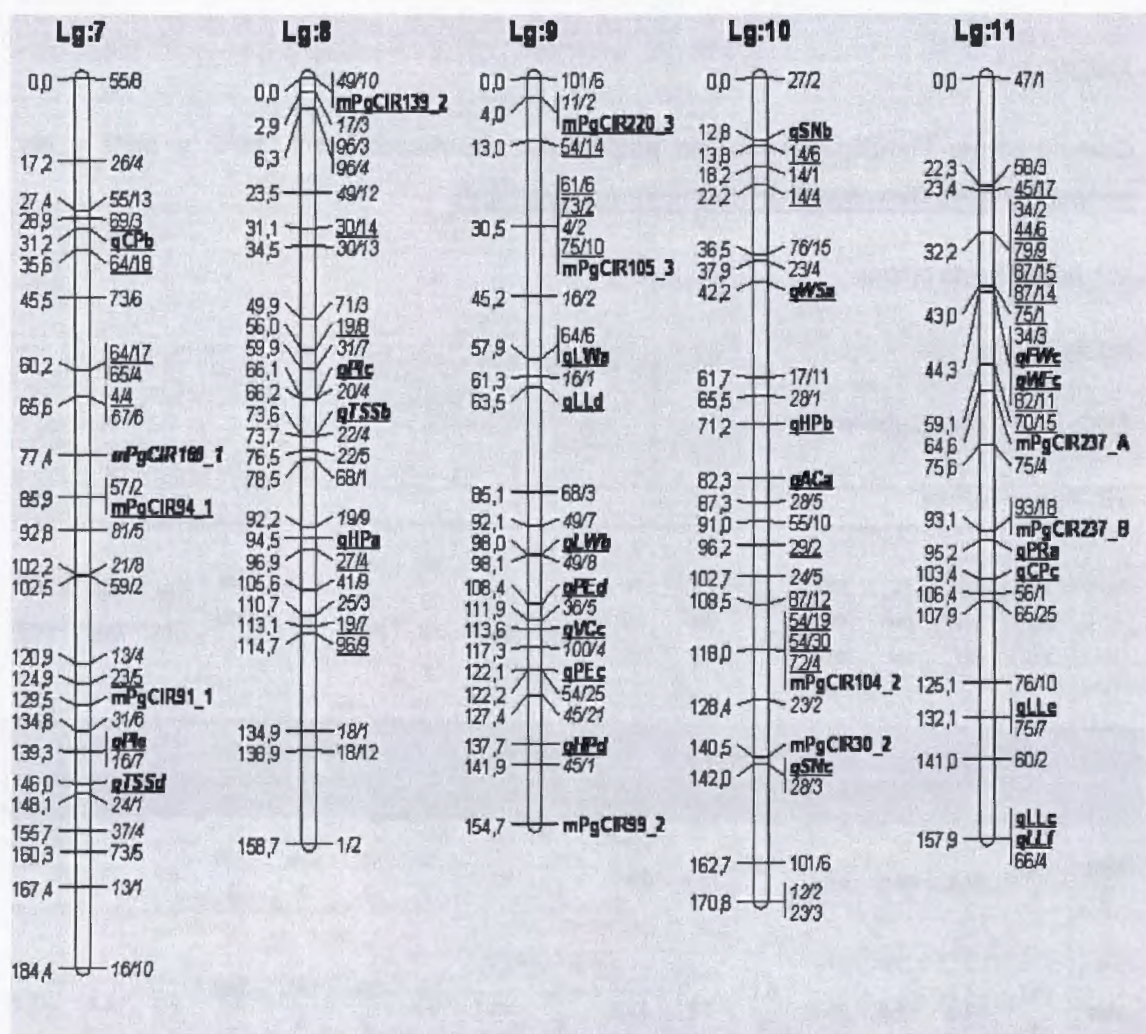
Mapa de ligamiento integrado para la cruce Enana Roja X N6 (MP1). Los SSR se muestran en negritas. Fragmentos en común se muestran subrayados. Los Fragmentos de AFLP son indicados con números (<http://www.neiker.net/neiker/guavamap/>).





Mapa de ligamiento de la cruza: Enana X Suprema Roja (MP2). Los fragmentos en común se muestran subrayados. Los fragmentos de AFLP son indicados por números, SSR son indicados con su nombre seguido del correspondiente tamaño de fragmento. Los QTL detectados son integrados al mapa. Son indicados por el prefijo "q" y están indicados en negritas y subrayados (<http://www.neiker.net/neiker/quavamap/>).





Mapa de ligamiento de la cruz: Enana x Belic L-207 (MP3). Se subrayan los fragmentos en común, los fragmentos de AFLP y SSR son indicados por su nombre seguido por el tamaño de fragmento esperado. Los QTL detectados son integrados al mapa. Son indicados por el prefijo "q" y están indicados en negritas y subrayados (<http://www.neiker.net/neiker/guavamap/>).

CAPÍTULO V

ANEXO II.

Características identificadas en las poblaciones de mapeo MP1, MP2 y MP3 y los parentales (<http://www.neiker.net/neiker/guavamap/>).

MP: población de mapeo

Ind: Individuos

ERC: Enana Roja Cubana

SR: Suprema Roja

	LL (m m)	LW (m m)	FL (m m)	FW (m m)	AC (%)	PE (m m)	PI (m m)	WF (g)	VC (mg/ 100 g)	TS S °B x	MI (%)	SN	WS (mg)	HP (m)	PR (kg)	CP (kg)
MP1																
Mean	139. 7	65.8	69.3	67.4	0.2 8	13.4	39.1	173. 7	99.3	12 7	45. 7	284. 2	0.01 2	3.7	79.3	202. 8
Min	110. 1	52.2	58.8	59.6	0.1 6	0.7	33.5	115. 4	41.7	8.3	25. 3	101. 6	0.00 7	2.2	7.7	73.7
Max	254. 5	81.7	85.4	76.7	0.4 7	17.9	47.5	245. 0	200. 6	18. 1	73. 3	486. 8	0.02 2	4.8	268. 4	446. 1
CV	13.2	10.2	9.7	6.3	22. 1	16.9	6.6	19.8	30.1	14. 4	21. 4	26.5	20.2	13. 9	51.8	32.1
MP2																

Mea	133.	61.3	72.9	67.7	0.3	14.0	38.0	183.	169.	11.	40.	236.	0.01	3.7	68.5	172.
n	6				1			6	5	4	7	3	3			2
Min	103.	44.7	57.5	55.6	0.1	10.8	28.3	115.	43.7	7.8	6.4	57.5	0.00	2.3	10.7	42.0
	0				8			5					8			
Max	163.	76.0	95.0	77.9	0.9	17.9	43.2	255.	687.	16.	68.	385.	0.02	4.7	186.	324.
	9				3			0	4	1	7	0	1		1	8
CV	837	13.3	11.0	7.1	33.	12.6	10.1	20.0	53.9	15.	24.	27.1	22.1	10.	44.2	30.4
					7					0	6			3		

MP3

Mea	133.	58.5	74.2	63.3	0.3	12.9	36.1	162.	173.	12.	37.	225.	0.01	3.6	65.3	130.
n	4				6			9	0	0	5	9	2			4
Min	113.	45.4	54.4	52.4	0.1	8.6	26.1	82.9	38.5	8.1	15.	104.	0.00	2.5	16.7	48.4
	4				9						7	4	1			
Max	167.	96.3	92.5	76.8	0.7	17.2	46.3	249.	423.	16.	69.	367.	0.01	4.3	146.	247.
	8				2			8	3	6	6	0	7		0	2
CV	8.7	13.3	11.0	7.1	33.	12.6	10.1	20.0	53.9	15.	24.	27.1	22.1	10.	44.2	30.4
					7					0	6			3		

Ind.

ERC	111.	50.2	84.5	72.1	0.1	14.9	42.6	226.	78.5	11.	68.	286.	0.02	2.8	97.3	194.
	0				5			4		9	3	0	6			1
N6	119.	59.0	58.1	63.7	0.1	11.6	38.8	126.	66.7	12.	56.	254.	0.01	4.0	91.7	180.

CAPÍTULO V

	0				0			3	0.22	4	1	2	7			0
SR	137. 1	59.4	73.0	67.2	0.2 1	14.5	38.2	185. 0	171. 1	12. 9	70. 1	219. 2	0.03 4	3.8	99.0	194. 8
Bell c	132. 6	64.3	73.2	60.2	60. 2	0.17	12.5	35.3	173. 0	8.9	61. 8	154. 9	0.01 5	3.5	138. 0	240. 0

LL = leaf length
LW = leaf width
SN = seed number
WS = average seed weight

FL = fruit length
FW = fruit width
WF = average fruit weight
HP = Plant height

PE = external pulp thickness
PI = internal pulp thickness
AC = acidity
TSS = total soluble solids (Brix)

VC = Vitamin C Contents
MI = maturity index
PR = yield 2007 per tree
CP = cumulative yield per tree