

ANÁLISIS DE CUATRO MARCADORES RAPD EN 41 ACCESIONES DE AGUACATE (*Persea sp.*)

Apunte de asignatura: Genética Molecular



LILIA DANAE ARTEAGA RIOS
DR. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN

ASIGNATURA: GENÉTICA MOLECULAR
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
UAEM – CU TENANCINGO

ANÁLISIS DE CUATRO MARCADORES RAPD EN 41 ACCESIONES DE AGUACATE (*Persea sp.*)

Actualmente, para el estudio de relaciones filogenéticas entre organismos, para estimar la variación dentro de las poblaciones, así como para probar hipótesis de adaptaciones ecológicas se usan tanto datos morfológicos como moleculares. Sin embargo, numerosos estudios acusan incongruencias frecuentes entre los análisis basados en datos morfológicos y los basados en datos moleculares, dando lugar a discusiones respecto a cuáles de estos datos podrían ofrecer información adecuada para sustentar dichos estudios.

Con respecto a lo anterior, uno de los argumentos que respaldan el uso de los caracteres moleculares sobre los morfológicos es que los primeros son universales, porque se trabaja directamente con la base genética de la variación y no dependen de sí, por ejemplo, la divergencia entre linajes es temprana; además no se requiere de un tiempo de espera para analizar, e. g. variaciones estacionales o depender del estadio del ciclo de vida de los organismos de la población a analizar, además de que este tipo de marcadores pueden abarcar cientos o miles de marcadores en comparación con los morfológicos que rara vez permiten analizar más de 100 caracteres (Rentarías, 2007).

En el presente trabajo se abordarán algunos conceptos básicos para el estudio de datos moleculares y se realizará un análisis breve de la eficiencia del uso de marcadores RAPD.

CONCEPTOS BÁSICOS.

A continuación, se abordarán por orden de utilidad explicativa para este trabajo, algunos conceptos básicos necesarios para abordar el análisis de datos moleculares:

- **Genética molecular.** Campo de la genética que estudia la estructura y la función de los genes a nivel molecular, considerando a un gen como la unidad física y funcional de la herencia (los genes están compuestos por ADN y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica. Cada gen tiene una localización o locus, específica en un determinado cromosoma; el conjunto de todos los genes, contenidos en todos los cromosomas, constituye el genoma. No se debe confundir con la biología molecular, que estudia todos los

procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular (Rentaría *op. cit.*)

- **Accesión.** Unidad de conservación que comprende semillas o plantas, es una muestra distinta, singularmente identificable, que se distingue con un código alfanumérico que permite reconocerlo del resto en un banco de germoplasma. (Weising, Nybom, Wolff & Kahl, 2005).
- **Genotipo.** Se entiende por el acervo genético completo de un organismo. Comprende los factores hereditarios nucleares y extranucleares de sus células (Weising, *et. al.*, 2005)
- **Población:** Conjunto de individuos de la misma especie, que viven en un mismo espacio y tiempo determinados (Odum, 1972).
- **Polimorfismo:** Cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro de un genoma, el cual ocurre generalmente por deleciones, inversiones, inserciones o rearrreglos; estas mutaciones permiten la existencia de distintos alelos para un locus específico (Weising, *et. al.*, *op. cit.*). La palabra polimorfismo hace referencia a un sitio concreto (locus) en la molécula de ADN que puede contener diferente información o secuencias de nucleótidos entre dos o más individuos. Hay dos tipos de polimorfismos: de secuencia (el orden de los nucleótidos para un locus se ve alterado) y de longitud (son variantes del mismo locus pero se diferencian por el número de nucleótidos en el fragmento de ADN) (DNA-Didactic, 20017).
- **Diversidad genética.** es el número total de características genéticas dentro de cada población o especie, su función es mantener un reservorio de condiciones de respuesta al medio, que permita la adaptación y la supervivencia de dicha población o especie. La frecuencia de genes dentro de la población total es la resultante de la selección natural y permite los cambios evolutivos sobre la base de una reproducción selectiva (Odum, 1972).
- **Variabilidad genética.** es la tendencia que presentan los genotipos de una población a diferenciarse y permite la evolución de las especies, pues en cada generación sólo una fracción de la población sobrevive y se reproduce transmitiendo características a su progenie. Los individuos de una misma especie no son idénticos y aunque son reconocibles como pertenecientes a la misma especie, existen muchas diferencias en su forma, comportamiento y función. La variabilidad genética se origina por mutaciones, recombinaciones y

alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas) (Rentarías, 2007) (Fig. 2).

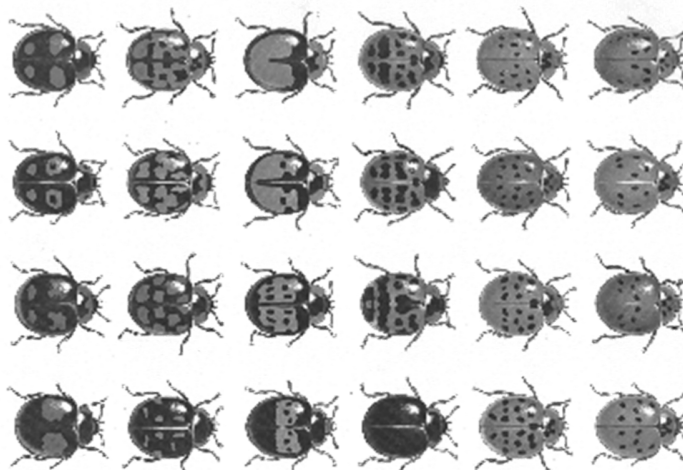


Figura 2. Representación de variabilidad genética evidente en la coloración de los élitros de la Catarina asiática (*Harmonia axyridis*).

- **Marcador genético.** Cualquier atributo que puede ser identificable en una planta o cultivar. Existen dos tipos: morfológicos y moleculares (Rentarías, *op cit.*)
- **Marcador molecular.** Son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético, permiten localizar un gen de interés con mayor exactitud respecto a los morfológicos, ya que funcionan en ausencia del efecto ambiental en la expresión de esos genes. Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos. Hay varios tipos y se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples, pueden ser dominantes o codominantes y se distinguen dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN. (Weising *et al.*, 2005)
- **Marcadores de ADN.** se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante. Dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas:

Categoría 1: métodos que **no** se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): RFLP's (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y VNTR's (número variable de repeticiones en tándem).

Categoría 2: técnicas basadas en la PCR que utilizan iniciadores (sebadores o primers) arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, MAAP (Perfiles múltiples arbitrarios de amplicones), RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar), RAMPO (Polimorfismo de microsatélites amplificados al azar).

Categoría 3: técnicas basadas en la PCR con sitio "objetivo específico". Por ejemplo, SSR ó ISSR (Inter secuencias simples repetidas) (Rentarías, 2007).

- **PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa**, técnica de biología molecular desarrollada por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis en 1983. La técnica sintetiza muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas, de donde toma su nombre comercial más conocido: taq polimerasa. La reacción de PCR simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, en un tubo especial se mezclan todos los ingredientes necesarios: la polimerasa, el ADN del organismo que se desea estudiar, oligonucleótidos necesarios para que se inicie la transcripción (llamados también primers ó iniciadores), dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, pudiendo necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa comercial) (Fig. 3).

Existen dos funciones principales de esta técnica: a) para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus) (requieren conocer la secuencia que se trabaja, por ejemplo cuando se amplifica un gen específico); y b) cuando no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, no se sabe el tamaño del fragmento o fragmentos que se esperan, se observan varios *loci* simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones; se utilizan para determinar polimorfismo genómico y son los más comunes para *fingerprint**, ya que la obtención de datos es sencilla) (Rentarías, *op cit.*).

* **Huella genómica (*Fingerprint*)**. También llamado perfil genético, se utiliza para distinguir entre individuos de una misma especie utilizando muestras de su ADN. Se atribuye su invención al Dr. Alec Jeffreys en 1984.

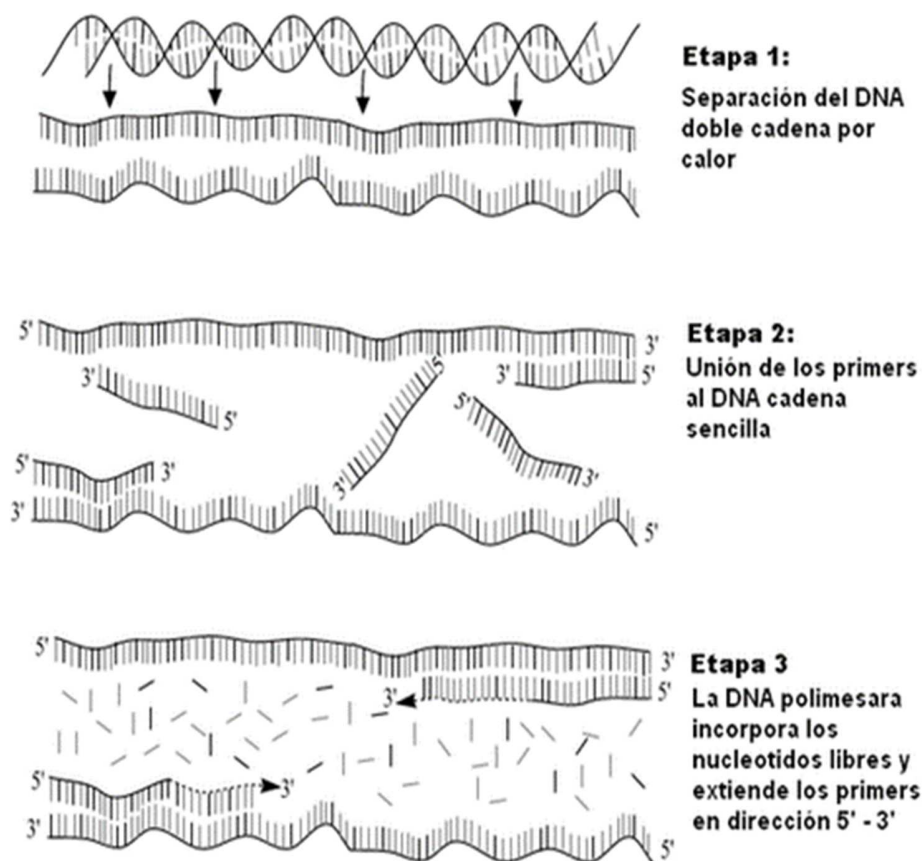


Figura 3. Representación general del proceso de PCR con sus tres etapas principales: Etapa 1, desnaturalización; Etapa 2, hibridación y Etapa 3, las cuales ocurren a temperaturas diferentes y se repiten en varios ciclos que hacen que aumente de manera exponencial la cantidad de ADN disponible si éste fue compatible con el primer utilizado.

- **RAPD.** Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies. Este análisis fue descrito por Williams et al. y Welsh & McClelland en 1990, en esencia es la misma metodología PCR, por lo que a veces se le refiere con este nombre, aunque en el análisis PCR los iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y en el análisis RAPD, el iniciador se usa para amplificar secuencias al azar de un patrón complejo de ADN.

La técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido o *primer* de 10 pares de bases a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del

oligonucleótido y por inserción o delección de los fragmentos en estos. Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden distinguir entre homocigos dominantes de heterocigos para un segmento particular, por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg que define el estado genético de una población mendeliana cuando se excluyen todos los factores que cambian las frecuencias de la población: es el estado de fuerzas cero, es decir, la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas permanecen invariables en el tiempo.

Detectan amplios grados de polimorfismo, por lo que una de sus mejores aplicaciones es la identificación genética de individuos, que incluye casos de clones, híbridos somáticos y mutantes. Otra aplicación paralela es la detección de uniformidad genética con un marcador eficiente y rápido. Además, entre las principales ventajas de los RAPDs está que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas. Es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de *loci* que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas. Los RAPDs generan un número inmenso de marcadores y, al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor.

Sin embargo, los problemas principales detectados en los RAPD's son: presencia de bandas "erróneas" (artefactos), baja reproducibilidad de los resultados y comigración de bandas. Además, muchos alelos raros presentes en las poblaciones estudiadas con RAPDs no son detectados o pueden ser mal interpretados, y al detectar loci como dominantes, los RAPDs dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes, además, la eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por factores tales como el número de ciclos de amplificación, la cantidad y calidad del ADN inicial, el iniciador utilizado y la temperatura (Phillips *et al.* 1995, citado en Rentarúa, *op cit.*).

- **Locus:** (en latín: lugar; el plural es *loci*, pronunciado **loki**) es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador (marcador genético) (Fig. 1) (Weising *et al.* 2005).

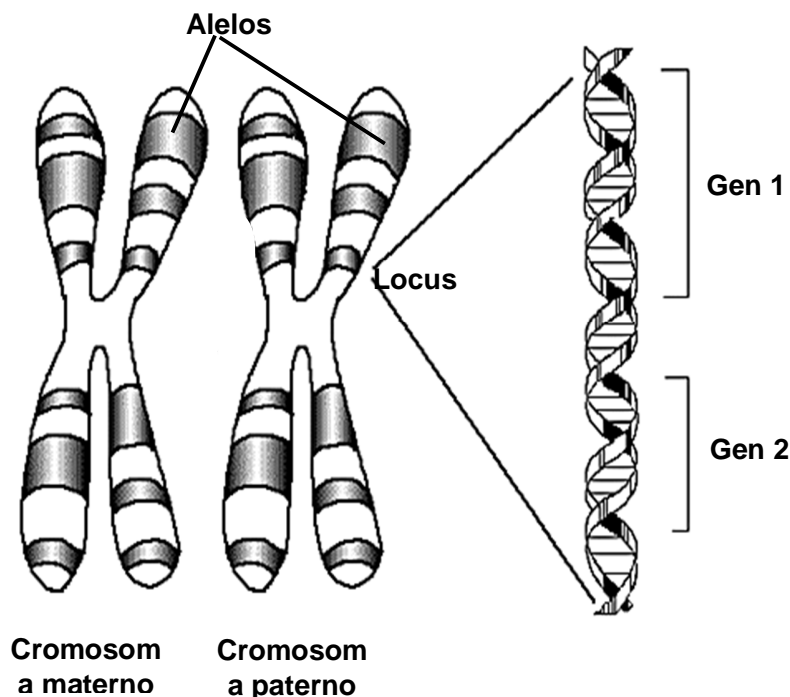


Figura 1. Representación gráfica de locus (posición de un gen en un cromosoma), también se puede observar que los alelos son dos genes en el mismo locus en cromosomas homólogos (pueden ser homocigóticos o heterocigóticos).

- **Amplicón.** Conjunto de moléculas de ADN o ARN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (pueden originarse también de la reacción en cadena de la ligasa, LRC) (Fig. 4). Esencialmente, se trata de un clon molecular, pueden ser de estructura lineal o circular, éstos últimos son duplicaciones invertidas imperfectas. Los hay de dos tipos: a) Amplicón primario: fragmento de ADN que fue amplificado de manera preferente en la PCR, debido a que los *primers* utilizados poseen homología completa para secuencias del ADN blanco (aparecen como bandas fuertes en los geles); b) Amplicón secundario: fragmento de ADN débilmente amplificado durante la PCR debido a que el primer utilizado no presenta homología completa con la secuencia blanco, por lo tanto el iniciador sólo permite una falsa amplificación con la polimerasa (aparecen como bandas débiles en los geles) (Weising *et al.*, *op. cit.*).
- **Bandas polimórficas.** Es aquella banda que está presente en una frecuencia mayor al 1% y menor al 100% (Luna-Martínez, Flores-Martínez y Ponce-Noyola, 2003) (Fig. 4).

- **Bandas monomórficas.** También llamadas no polimórficas, están presente en todos los patrones génicos, es decir, con una frecuencia del 100% (Luna-Martínez *et al.*, 2003) (Fig. 4).

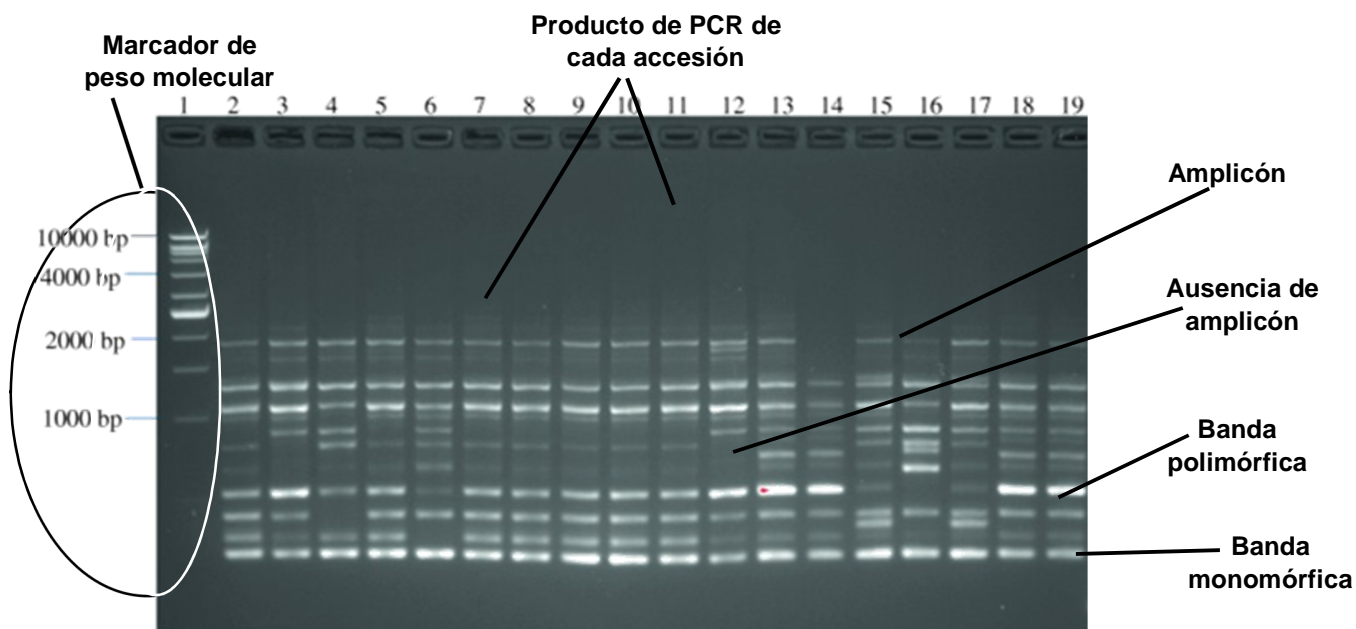


Figura 4. Partes informativas de un corrimiento en gel por electroforesis: marcador de peso molecular (guía de referencia), producto de PCR por carril, amplicón (ausente o presente), banda polimórfica y monomórfica.

- **% de contribución.** proporción de amplicones revelados por un solo *primer* dentro de un sistema de marcador molecular.
- **% de polimorfismo.** Proporción de bandas polimórficas y no polimórficas reveladas por un solo *primer*.
- **Contenido de información polimórfica (PIC).** Es una medida del grado de información que brinda un determinado marcador genético, la cual depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas.

Una vez que se ha elaborado la matriz binaria de datos, el análisis generalmente empieza averiguando el poder discriminante de cada marcador, esto se hace calculando el PIC, el cual estima el grado de polimorfismo de un marcador, es decir, la proporción de individuos que son heterocigóticos para el macador. El PIC es una buena medida de heterocigocidad.

Los marcadores que muestran pocos alelos o aquellos que muestran muchos alelos pero solo uno de ellos es frecuente entre las muestras, pueden tener un PIC bajo y ser, por tanto, de valor mínimo al analizar diversidad, estos marcadores deberían ser excluidos en posteriores análisis. En suma, este parámetro indica la habilidad de un marcador para distinguir entre genotipos y es análogo a la estimación de diversidad genética (González, Lozano, Cruz, Ochoa y Morillo, 2017).

El valor del PIC se encuentra entre 0 y 0.5 para marcadores dominantes (puesto que no permiten determinar heterocigocidad) y entre 0 y 1 para marcadores codominantes (ya que pueden detectar dos alelos por locus) (De Riek, Calsyn, Everaert, Van Bockstaele & De Loose, 2001).

En los marcadores dominantes se considera que valores menores a 0.15 son no informativos, valores entre 0.15 y 0.25 como informativos y mayor a 0.25 como altamente informativos.

El PIC para marcadores dominantes se calcula como sigue:

$$PIC = 1 - [f^2 + (1-f)^2]$$

Donde:

f = frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban presentes.

(1-f) = frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban ausentes.

- **Índice del marcador (IM).** Fue descrito por Powel *et al.* (1996) y usado por Milbourne *et al.* (1997) para comparar entre análisis hechos con RAPD, AFLP y SSR. Se usa para determinar la utilidad total de un marcador molecular determinado (Varshney, Chabane, Hendre, Aggarwal & Graner, 2005). La utilidad de un marcador determinado es un equilibrio entre el nivel de polimorfismo detectado y la medida en que un ensayo puede identificar polimorfismos múltiples.

$$MI = PIC \times (\# \text{ bandas polimórficas})$$

- **Índice de Marcador Efectivo (EMI).** Éste índice considera todos los posibles atributos tales como el contenido de información, fracción de fragmentos polimórficos, relaciones múltiples, así como los problemas cualitativos para un marcador determinado (Varshney *et al.*, 2005).

$$EMI = MI \times QND$$

Donde:

MI= índice del marcador, y

QND= naturaleza cualitativa de los datos

- **Naturaleza cualitativa de los datos (QND).** Para proporcionar un índice para los marcadores moleculares que incluya información adicional sobre la aplicación práctica de un sistema de marcador molecular (útil para los curadores y administradores de los bancos de genes), proponemos un término denominado naturaleza cualitativa de los datos. La QND depende de muchos factores, como la reproducibilidad y la capacidad de respuesta de los picos/bandas para facilitar la documentación (por ejemplo, el tamaño exacto de alelos y el almacenamiento en bases de datos) y se define como:

$$QND = DC \times QM \times PR$$

Donde:

DC = capacidad de documentación,

QM = calidad del marcador (con la siguiente escala: **1.00** marcador de buena calidad, con banda única y fuerte / pico alto; **0.75** banda débil o pico más bajo; **0.50** marcador / banda con tartamudeo; **0.25** difícil de calificar, necesita esfuerzos especiales para visualizar),

y

PR = reproducibilidad porcentual del (los) fragmento (s) / banda (s) / pico (s) del sistema de marcador dado a través de los laboratorios.

DC y PR representan el valor constante para un tipo de marcador dado, sin embargo, QM es una característica del par de cebadores para un tipo de marcador y muestra un valor variable (Varshney *et al.*, 2005).

Este parámetro no será analizado en el presente trabajo y se anota aquí solo con fines informativos.

- **Poder de resolución.** De acuerdo con sus formuladores, Prevost y Wilkinson (1999), este parámetro “se basa en la distribución de alelos dentro de los genotipos muestreados. La forma más eficiente de separar cualquier grupo de taxa con propósitos de identificación es dividiendo progresivamente el grupo en subgrupos iguales. Por ejemplo, bajo condiciones óptimas, una colección de 64 individuos podría separarse en dos subgrupos de 32, luego, subdividiendo en grupos progresivamente más pequeños de 16, 8, 4,2 y luego 1. Para muchos sistemas de huellas moleculares, la división de los genotipos en dos grupos se basa en la presencia o ausencia de una banda en una posición particular.



Idealmente, cada posición de banda podría estar presente en la mitad de los genotipos y ausente en la otra mitad. Bajo condiciones óptimas para el diagnóstico, el uso de una segunda posición de banda dividiría al taxa en cuartos. Bandas subsecuentes podrían subdividirse aún más en agrupaciones aproximadamente iguales. El sistema perfecto podría entonces contener gran cantidad de bandas que podrían cada una dividir el taxa en partes casi iguales. La habilidad de cualquiera de las dos posiciones de banda para dividir en cuartos dependería de la ausencia de vinculación y de la complementariedad de los grupos formados por cada banda individualmente.

Entre mayor sea la cantidad de bandas que se consideren, mayor será la probabilidad de que dos de ellas puedan dividir los genotipos dentro de dos mitades complementarias. Así, el valor de una técnica-*primer* estaría en función de cuantas posiciones de bandas son generadas y que tan cerca de la condición óptima (dos mitades iguales) está cada posición de banda.

El valor de una posición de banda en particular puede ser medida más fácilmente por su similitud a la condición óptima (50 % de los genotipos conteniendo la banda). **Esta “informatividad” de la banda** se puede representar en una escala del 0 al 1 por la siguiente fórmula:

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

Donde:

p = la proporción de todos los genotipos que contienen la banda

Si todas las bandas fueran óptimamente informativas, entonces el *primer* más útil sería simplemente aquel que genera la mayor cantidad de posiciones de banda. Asumiendo esto, las bandas pueden ser calificadas de acuerdo con su similitud a la informatividad óptima. La habilidad de un cebador o de una técnica para distinguir entre un número grande de genotipos podría ser representada por la suma de esos valores ajustados, esto puede ser descrito como el poder de resolución del *primer* (R_p) conde:

$$R_p = \sum I_b$$

OBJETIVOS.

- A partir de una base de datos de 41 accesiones del género *Persea sp.* obtener los diversos parámetros informativos que derivan del uso de marcadores dominantes tipo RAPD.
- Realizar un análisis básico de la eficiencia informativa de los marcadores moleculares RAPD.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se contó con una base de datos en matriz binaria dispuesta en una hoja de excell con información de 41 accesiones de Aguacate (*Persea sp.*) analizadas usando el sistema RAPD con cuatro *primers*: E18, E14, A15 y C08.

Con los datos anteriores se calcularon cuatro de los principales parámetros para analizar la efectividad de los sistemas de marcación molecular: % de contribución, Contenido de Información Polimórfica (PIC), Índice del marcador (MI) y Poder de Resolución (Rp) entre otros parámetros, también informativos pero que son complementarios a los anteriormente mencionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los datos dispuestos en matriz binaria de las accesiones de aguacate, se resumen en las Tablas 1 y 2, a continuación:

Tabla 1. Análisis general de cuatro *primers* RAPD utilizados en 41 accesiones de aguacate (número de bandas, amplicones y % de contribución).

Tipo de iniciador	Clave	# bandas/iniciador	Amplicones/iniciador	% Contribución
RAPD	E18	50	478	31.24183
	E14	42	417	27.254902
	A15	20	251	16.405229
	C08	32	384	25.098039
	TOTAL	144	1530	100
	PROMEDIO	36	382.5	



Tabla 2. Parámetros de descripción de los *primers* utilizados: número de bandas obtenidas, número de bandas polimórficas, % de polimorfismo, poder de resolución (Rp), contenido de información polimórfica (PIC) e índice del marcador (IM).

Tipo de iniciador	Clave	Total de bandas/iniciador	# bandas polimórficas/iniciador	% Polimorfismo	Poder de resolución (RP)	Contenido de información polimórfica (PIC)	Índice del marcador (MI)	
RAPD	E18	50	50	100	20.731707	0.2849256	14.24628198	
	E14	42	42	100	20.341463	0.3377241	14.18441404	
	A15	20	20	100	12.097561	0.4088043	8.176085663	
	C08	32	32	100	16.390244	0.3484533	11.15050565	
	TOTAL		144	144		69.560975	1.3799073	47.7572873
	PROMEDIO		36	36		17.3902438	0.34497683	11.9393218

Todos los cebadores empleados mostraron 100 % de polimorfismos, sin embargo se encontró que el *primer* E18 tuvo la contribución más alta al sistema de marcaje molecular utilizado (31.24 %), teniendo la contribución más baja el A15 (16.40 %), siendo congruentes con el número de amplicones y bandas obtenidos por iniciador.

En cuanto a los parámetros descriptivos, se observó que el PIC de los cuatro cebadores estuvo por encima de 0.25 lo que los catalogaría como altamente informativos, validando todo el sistema utilizado; y resaltando en el grupo, el cebador A15 obtuvo un valor de 0.4088043, aun cuando obtuvo el porcentaje de contribución más bajo, esto quiere decir que este marcador, a pesar de no ser capaz de detectar muchas bandas polimórficas tuvo el poder discriminante más elevado.

Sin embargo, los RAPD se analizan como sistema y dentro de éste sistema la utilidad total del marcador A15 pudo ser ajustada de acuerdo con el valor de su IM que lo situó por debajo de los otros tres, porque aunque tiene una capacidad discriminante más elevada amplifica un número menor de bandas; en comparación el E18 mostró el PIC más bajo (0.2849256) pero el porcentaje de contribución más elevado debido al número de bandas amplificadas (50), ambos factores influyeron en que su IM fuera el más alto (14.24628198). Los cebadores E14 y C08 quedaron en segundo y tercer puesto respectivamente.

En cuanto al poder de resolución (Rp) encontramos que la relación entre los cuatro cebadores del sistema se mantuvo igual que observando los valores de MI, es decir, el primer E18 con el valor más alto y el A15 con el más bajo, manteniéndose el E14 y el C08 como intermedios. El cálculo del Rp está basado en el índice de información que ofrece cada una de las bandas (Ib) bajo una condición óptima hipotética (50 % de los genotipos conteniendo una banda), mientras que el MI se basa en el PIC para cuyo cálculo se utilizan los valores reales obtenidos, sin embargo, en ambos parámetros influye de forma directa la cantidad de bandas obtenidas por *primer*, de tal forma que



aunque el A15 tuvo un PIC más elevado estos dos parámetros lo situaron en los niveles más bajos.

No obstante, aunque con un acomodo de valores similares, el Rp sería un parámetro más útil que el MI al resaltar la habilidad de un cebador o de una técnica (RAPD en éste caso), para distinguir entre un número grande de genotipos, así por ejemplo, Prevost y Wilkinson (1999) encontraron una fuerte relación lineal entre el Rp de cebadores hipotéticos y la proporción de cultivares de papa que cada *primer* fue capaz de distinguir sin importar el número de bandas, lo que significaría que es posible estimar el número de genotipos que podrían ser identificados simplemente calculando el Poder de resolución de un *primer* hipotético, mientras que al usar el MI no se observó ninguna relación significativa que pudiera tener esta utilidad.

CONCLUSIONES.

- El sistema de cuatro primers empleado fue útil para discriminar entre las 41 accesiones de aguacate analizadas, con un PIC promedio de 0.34.
- El primer con mayor % de contribución, MI y Rp fue el E18 por lo que sería muy útil incluirlo en análisis de genotipos de aguacate posteriores.
- El cebador A15 obtuvo el contenido de información polimórfica más elevado, afectando su valoración la poca cantidad de bandas amplificadas (podría ser recomendable probarlo con algún cambio en la técnica de PCR, para verificar si es posible hacer más eficiente su capacidad de identificar distintos loci).
- Para poder comparar la utilidad informativa de los parámetros IM y Rp se deberán realizar análisis complementarios (p. e. comparaciones con otros sistemas de marcadores o con datos teóricos).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Rentarúa, A. M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: *Ecología molecular*, Compl.: Eguiarte, L. E., Instituto Nacional de Ecología, 541-566 pp.
- Odum, E. P. 1972. *Ecología*, Ed, Interamericana, México, 639 pp.
- Weising, K., Nybom H. Wolff K. & Kahl, G. 2005. *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications*, 2ª Ed. Taylor & Francis Group Broken Sound Parkway NW, USA, 470 pp.
- DNA Didactic. 2017. Los polimorfismos y el ADN, recuperado en <http://www.dnadidactic.com/blog/tag/polimorfismos-del-adn/>.

- Luna-Martínez, F., A. Flores-Martínez y P. Ponce-Noyola. 2003. Caracterización molecular de aislados de *sclerotium cepivorum* mediante análisis de polimorfismo de los fragmentos amplificadas al azar, Elementos, Vol 49 (1): pag 53. Recuperado en <http://www.elementos.buap.mx/num49/htm/53.htm>
- González, C. C. F., M. E. L. Lozano, M. C. A. Cruz, E. I. Ochoa y C. Y. Morillo. 2016. Caracterización molecular de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., procedente de diferentes orígenes (Zaire y Camerún) usando marcadores microsatélites, Acta Agronómica, Vol. 65 (3). Recuperado en: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/48413/56907.
- Prevost, A. & M. J., Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet, Vol. 98:107-112.
- Varshney R. K., K. Chabane, P. S. Hendre, R. K. Aggarwal & A. Graner. 2005. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys, Plant Science, Vol. 173: 638-649.
- De Riek, J., E. Calsyn, I. Everaert, E. Van Bockstaele. 2001. De Loose AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. Theor Appl Genet, Vol. 103: 1254–1265.
- Mba, C. & J. Tohme. 2005. Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 395: 177-201.