



Instituto de Innovación
en Biotecnología e Industria

MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA Y TECNOLOGIA
VICEMINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
FONDO NACIONAL DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO CIENTÍFICO
TECNOLÓGICO (FONDOCYT)



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES
DE AGUACATES CRIOLLOS (*Persea americana* var.
americana Mill.) EN LA REPÚBLICA DOMINICANA**

José R. Núñez, Ph.D. (investigador principal)
Ing. Ineko Hodai

Importancia de este Estudio

En el mercado internacional existen muy pocas variedades registradas de aguacate tipo Antillano.

Esta raza de aguacate posee características muy deseables entre los consumidores de esta fruta, en particular su natural bajo contenido de grasa el cual según datos obtenidos en los laboratorios del CEBIVE no ha pasado de 13% comparado con el promedio de un 20% de los aguacates de origen guatemalteco y mexicano.

Además, el sabor más desarrollado de los aguacates criollos lo hacen muy atractivos al consumidor.

La República Dominicana debe desarrollar su propia variedad o variedades, no sólo de aguacate sino de otros frutales con potencial de exportación si se quiere ser competitivo en los mercados internacionales.

En este proyecto se realizó un estudio poblacional de aguacates criollos (*Persea americana* var. *americana* Mill.) en todo el territorio nacional usando la técnica de PCR para el análisis de SSR o microsatélites, con el fin de determinar las relaciones filogenéticas entre las diferentes poblaciones de aguacates criollos.

Estos microsatélites se determinaron usando métodos modernos con cebadores marcados con fluorescencia en un analizador de ADN de electroforesis capilar.

Importancia Económica del Aguacate

En años recientes, el aguacate ha ido tomando una gran importancia como cultivo de exportación en la República Dominicana, alcanzando un promedio anual de más de US\$ 5,000.000.00, según datos de la FAO (FAOSTAT), pese al la devastación de muchas plantaciones causada por el huracán George en el año 1998.



Objetivo General

Conocer la diversidad genética de la población de aguacates criollos de la República Dominicana por medio de la técnica de SSR o microsatélites.



Objetivos Específicos

1. Separar los aguacates criollos de acuerdo a la variabilidad genética determinada por estudios de SSR (microsatélites).
2. Caracterizar los cultivares estudiados de acuerdo a características morfológicas y químicas.
3. Relacionar las características morfológicas y químicas con los grupos obtenidos en los dendrogramas.

Lugar de la Investigación



Las investigaciones de este proyecto se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biotecnología Vegetal (CEBIVE), entidad perteneciente al Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI).



28/10/2013

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras de este estudio se tomaron a nivel nacional en las regiones donde más se produce aguacate criollo y que fueron representativas del lugar (Cibao central, norte, nordeste, sur, este y suroeste).



De cada región se tomó un número de muestras construyendo primero un marco de muestreo para conocer la distribución de los árboles en el país haciendo viajes de exploración para identificar los lugares donde se conoce existen concentraciones importantes.

El número de muestras a tomar estuvo de acuerdo a la población existente.

Esta muestra consistió en hojas tiernas maduras pero no muy viejas.

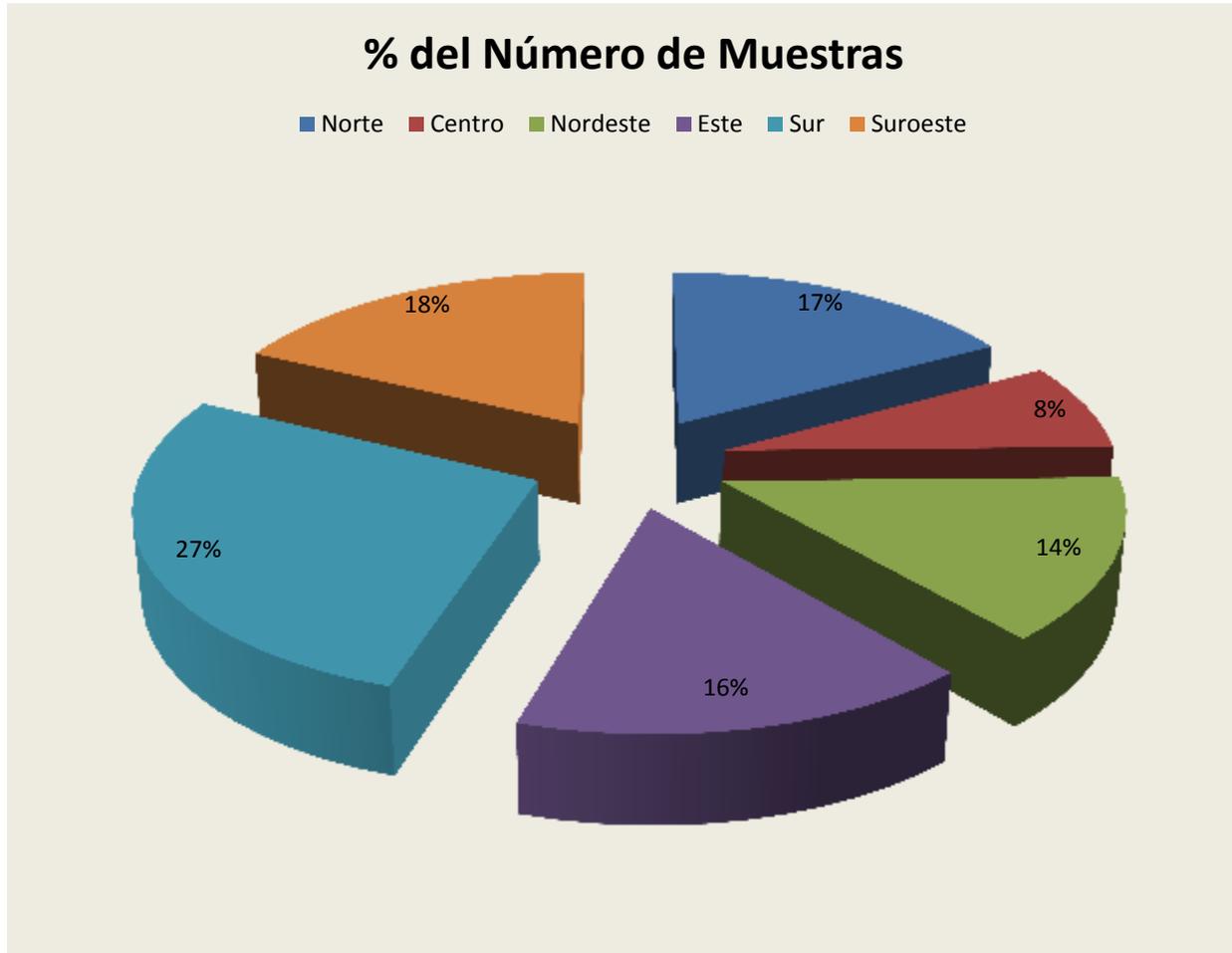
A cada árbol seleccionado se le hizo una descripción morfológica de acuerdo a los procedimientos de los descriptores para aguacate recomendados por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 1995) y se marcó su localización precisa por medio de un localizador geográfico satelital GPS (Global Positioning System) para futuras visitas de re-muestreo, para la obtención de sus frutos cuando esté en producción y/o para futura selección del árbol.

A los frutos se les hizo su descripción fenotípica/morfológica detallada también usando las recomendaciones del IPGRI, para una posible selección futura.

Número de muestras colectadas en todo el país

Región	Número de Muestras
Norte	67
Centro	30
Nordeste	55
Este	63
Sur	108
Suroeste	70
Total	393

Resultado del Muestreo realizado en toda la geografía nacional.



Extracción y purificación de ADN

Del total de muestras colectadas (393) se procesaron 375 para la extracción y purificación de ADN (95.42%). Las faltantes muestras fueron extraviadas en el laboratorio o se perdieron totalmente.

Debido a las estrictas exigencias de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la determinación de microsatélites, se usó un proceso de extracción y purificación de ADN usando un nuevo protocolo basado en el publicado por *"Daniel L. Nickren: Molecular Methods in Plant Biology, Second Edition, 1996. Department of Plant Biology Southern Illinois University"* y adaptado y modificado en nuestro laboratorio para la aplicación en aguacates. Con este protocolo se le extrajo el ADN a todas las muestras con resultados muy positivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de Microsatélites (SSR)

Para la determinación de microsatélites se analizaron 325 muestras repartidas proporcionalmente en todo el territorio nacional según se muestra más adelante.

Esto es un 82.7% de las muestras colectadas y un 86.7% de las muestras procesadas.

Se utilizaron siete cebadores (originalmente 8) marcados con fluorescencia 6-FAM™, marca registrada de Applied Biosystems (850 Lincoln Centre Drive | Foster City, CA 94404 USA).

Se prepararon alrededor de 960 muestras con dichos cebadores y se les corrió PCR usando el siguiente protocolo modificado de Barrone et al. (2006):

Amplitaq Gold® 360 Master Mix (preparación lista de Taq polimerasa)	5.0 µl/Rx
360 GC Enhancer (mejorador para reacciones difíciles)	0.25 µl/Rx
BSA (albúmina de suero bovino a 10 ng/µl)	1.0 µl/Rx
Cebador delantero a 0.1 µM	0.5 µl/Rx
Cebador reverso a 0.1 µM	0.5 µl/Rx
ADN + agua (ADN a ≈ 5 ng/ reacción)	2.75 µl/Rx
Volumen Total	10 µl/Rx

Las condiciones del termociclador fueron:

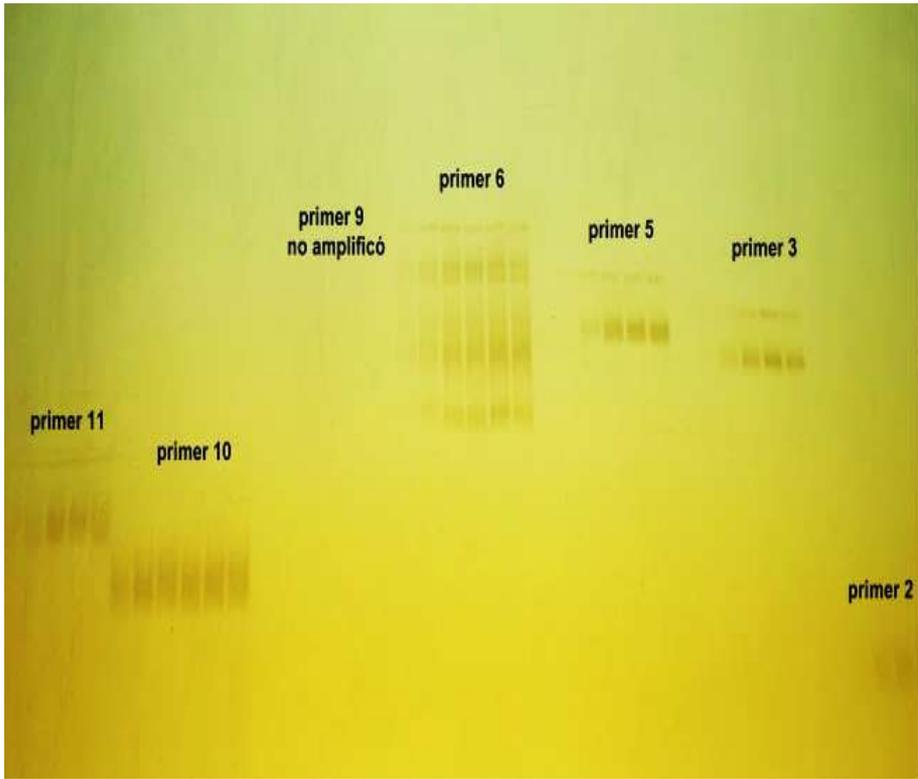
- a. 95° C, 7.5 minutos
- b. 95° C 20 segundos
- c. 60° C, 45 segundos
- d. 72° C, 1 minuto. Este ciclo se repite 5x
- e. 95° C, 20 segundos
- f. 56° C, 45 segundos
- g. 72° C, 1 minuto. Este ciclo se repite 34x
- h. 72° C, 10 minutos
- i. 4° C, ∞

Prueba Preliminar con cebadores sin fluorescencia

5 μ l de cada reacción de PCR fueron corridos en una electroforesis de gelatina de poliacrilamida para determinar el grado de amplificación de cada cebador.

Para esta prueba preliminar se corrió un total de 112 productos de PCR del total de 540 reacciones.

Prueba Preliminar con cebadores sin fluorescencia...



Gelatinas de poliacrilamida mostrando microsatélites amplificados con algunos de los cebadores analizados.

Prueba Preliminar con cebadores fluorescentes

Las fracciones fueron determinadas en un analizador automático de ADN marca Applied Biosystem Modelo ABI PRISM® 3730xl.

La preparación de las muestras para el analizador automático de ADN se hizo como sigue:

8.5 µl de Hi-Di™ Formamide (formamida especial para secuenciación)

0.5 µl de GeneScan™ - ROX™ Size Standard (escalera estándar para determinar los tamaños de las fracciones.

1.0 µl del producto de reacción de la PCR.

Esto hace un volumen total de 10µl de reacción para el analizador.

Luego de terminado el proceso de corrida en el analizador se procedió a la determinación de los fragmentos usando el programa ABI PRISM® GeneMapper™.

Este programa es específico para el genotipeado de microsatélites con una gran precisión en la determinación de éstos.

Ya afinado este protocolo se procedió a la determinación final de los microsatélites de cada muestra usando los 8 marcadores ya mencionados.

Las características de los cebadores de estos 8 marcadores son las siguientes:

No.	Locus	Secuencia	Rango de Tamaño	No. De Alelos
1	SHRSP _a 001	F: CGAGCATTGCTTTCCATATCC R: ATGTCTTTCTTCCTGTTCCCTTTC	68-75	3
2	SHRSP _a 009	F: ACCCAATCAACAAACAAACCC R: CGTTTCCCAATCCATTTCT	28-155	8
3	SHRSP _a 021	F: CACCCAACAGATGTGGATAGATAAG R: CAGATGAAAAGAACATGGCATTGA	181-187	3
4	SHRSP _a 028	F: GGACATCCAGATTCTCAGCAT R: CAGCATAAACATAAGTCGCATAC	83-88	3
5	SHRSP _a 029	F: AGGGTTTTAGGCCCAGAAG R: GTGTATTCTCTTGTAACCACCTC	94-119	7
6	SHRSP _a 060	F: TCCAAGCCCGTCACCATCG R: GCCAAACACACCAGCACCCA	193-213	6
7	SHRSP _a 067	F: ATGTGTTCTACTTCTCCTCCAA R: CATTCCAGCCATGATTCC	240-249	5
8	SHRSP _a 090	F: GGCTTTCCTTCCCTGAC R: GCTGGTGACTGATTCCGT	289-303	5

Determinación de microsatélites en la población total

Se utilizó el programa estadístico “PowerMarker V3.25” (Liu and Muse, 2005) para generar las tablas estadísticas de los microsatélites mientras que los dendrogramas fueron generados con el programa TreeView V1.6.6

(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), software de libre acceso en la internet.

Los dendrogramas generados por este programa fueron editados con el programa también de libre acceso “TreeGraph 2 versión 2.0.47-206 beta (Stöver and Müller, 2010). Este programa puede ser bajado de <http://treegraph.bioinfweb.info/>.

Para fines de análisis, el país fue dividido en seis (6) regiones como sigue:

- 1) **Región Norte:** Provincias Espaillat, Puerto Plata, Santiago y Dajabón
- 2) **Región Centro:** Provincias La Vega y Monseñor Nouel
- 3) **Región Nordeste:** Provincias Duarte y María Trinidad Sánchez
- 4) **Región Este:** Provincias Monte Plata, Hato Mayor, El Seibo y La Altagracia
- 5) **Región Sur:** Provincias Santo Domingo, San Cristóbal, Peravia, San José de Ocoa y Azua
- 6) **Región Suroeste:** Provincias Independencia, Elías Piña, Pedernales, San Juan de la Maguana y Barahona

Estadísticas para el Total de las muestras analizadas

Marcador	Frec. Alélica Mayor	No. de Genotipos	Tamaño de la Muestra	No. de obs.	No. de Alelos	Diversidad Génica	Heterocigocidad	PIC	f
Pa001(1)	0.30	30	325	325	9	0.83	0.77	0.82	0.08
Pa009(2)	0.37	39	325	325	10	0.80	0.85	0.78	-0.06
Pa021(3)	0.35	31	325	325	11	0.80	0.81	0.78	-0.01
Pa028(4)	0.29	24	325	325	9	0.80	0.71	0.78	0.11
Pa029(5)	0.28	41	325	325	9	0.84	0.87	0.83	-0.03
Pa060(6)	0.21	44	325	325	10	0.85	0.80	0.84	0.06
Pa090(8)	0.28	30	325	325	10	0.82	0.87	0.80	-0.05
Mean	0.30	34.14	325	325	11.33	0.82	0.81	0.80	0.01

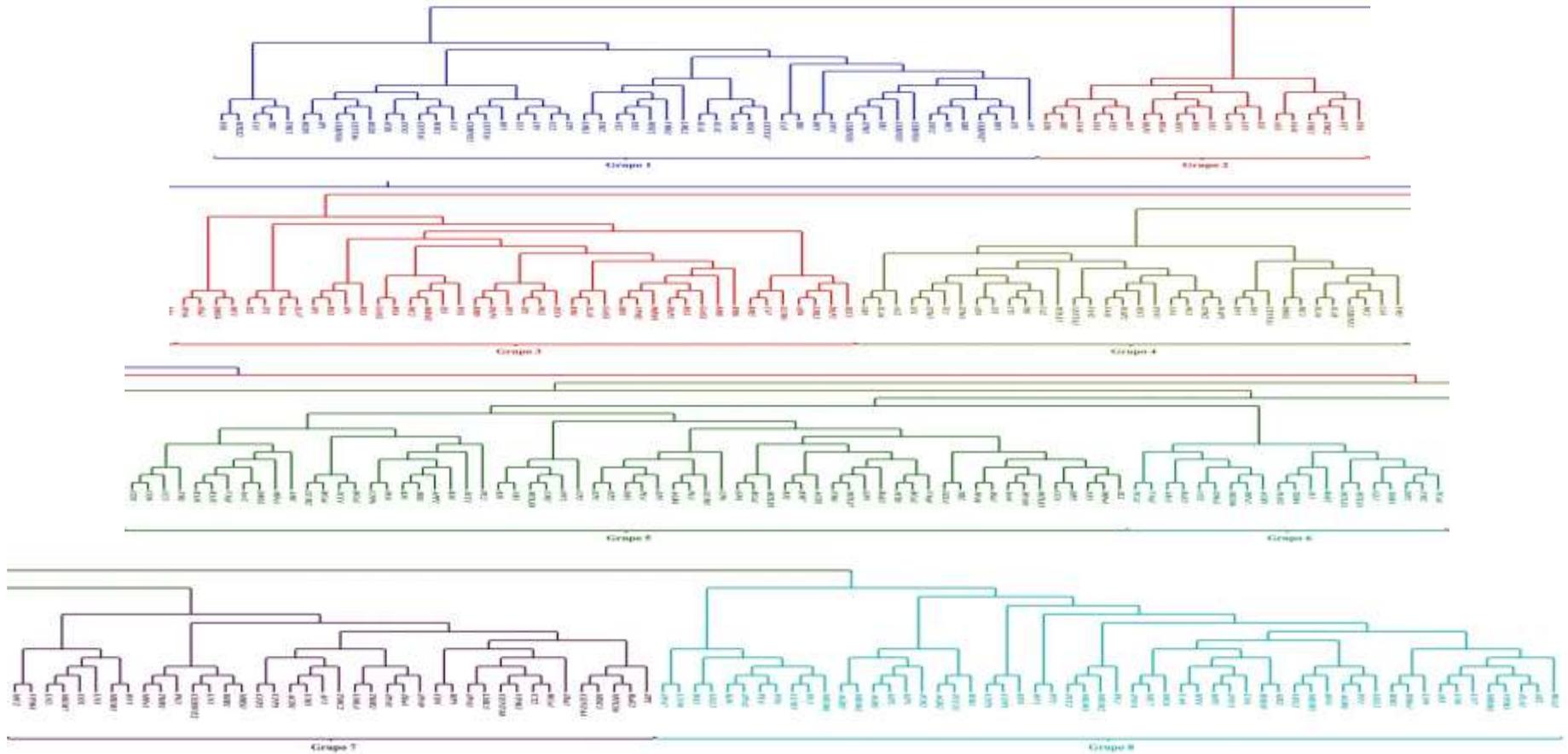
Diversidad Génica = Heterocigocidad esperada

Heterocigocidad = proporción de individuos heterocigotos en la población

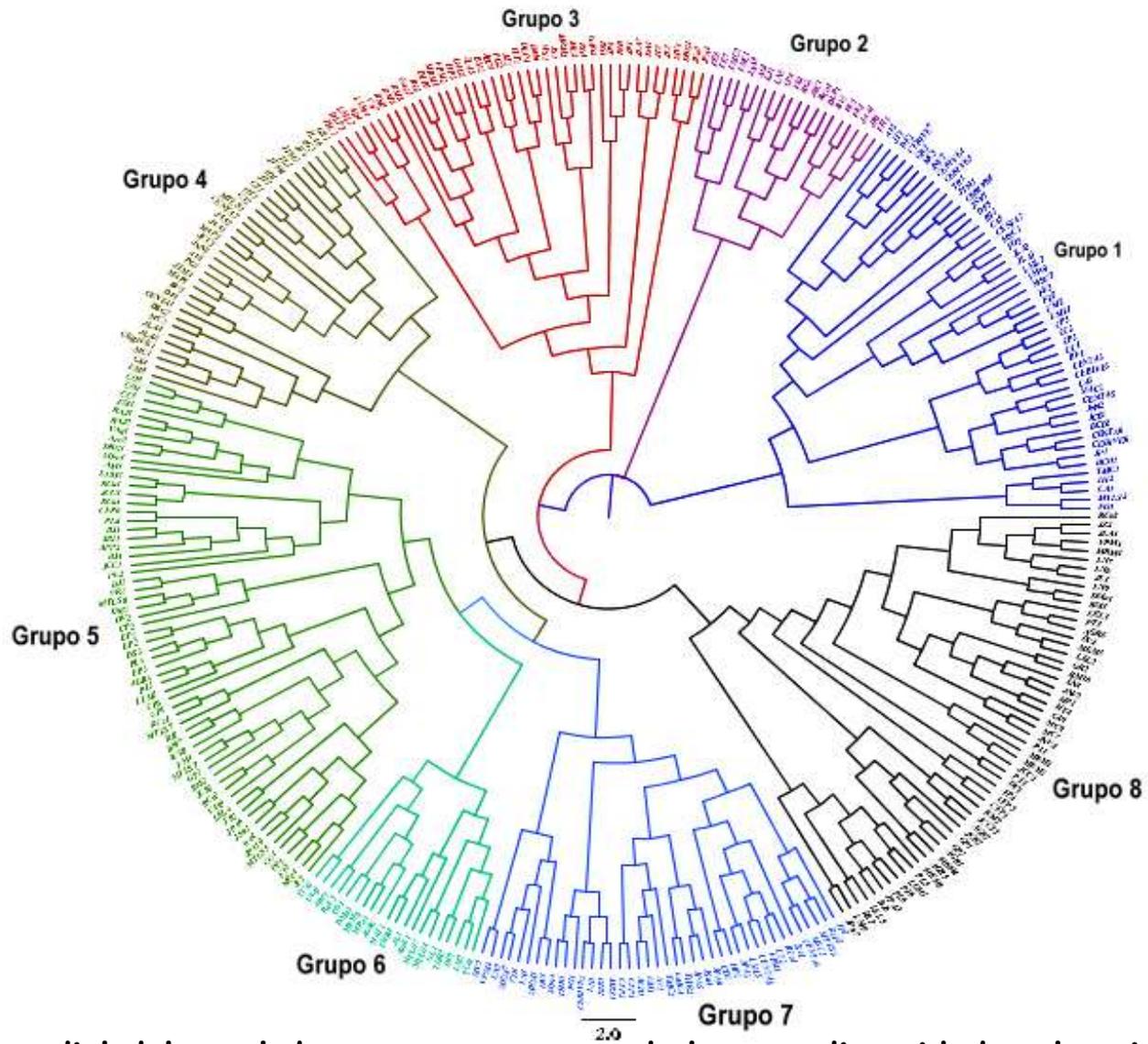
PIC = Contenido Informativo de Polimorfismo

f = Coeficiente de inbreeding

Los dendrogramas generados por el programa PowerMarker se basaron en el algoritmo de alelos compartidos y el método de agrupamiento NeighborJoining tree (NJ Tree).



Dendrograma fraccionado del total de muestras



Dendrograma radial del total de muestras mostrando la gran diversidad en los tipos de aguacates criollos.

Los grupos que nos muestran estas dos figuras fueron elegidos de acuerdo a los clados principales determinados en la generación del árbol o dendrograma por el programa PowerMarker ya mencionado.

Según este dendrograma, se pueden notar por lo menos 8 diferentes grupos.

Los grupos incluyen individuos de diferentes regiones, pero en cada grupo hay predominancia de una o dos regiones.

Distribución de las Muestras de los Diferentes Grupos del Dendrograma Total en las Regiones (%).

Grupo	muestras	Norte	Centro	Nordeste	Este	Sur	Suroeste
1	50	22.0	16.0	22.0		32.0	8.0
2	20	70.0		5.0		15.0	10.0
3	42	7.1	11.9	11.9	2.4	61.9	4.8
4	34	14.7	26.5	29.4		23.5	5.9
5	63	6.3		3.2	41.3	12.7	36.5
6	20	5.0				25.0	70.0
7	40	5.0	7.5	10.0	15.0	35.0	27.5
8	56	23.2	7.1		30.4	26.8	12.5

Conclusiones

Con este proyecto se pudo determinar que en el país existen grandes y diversas poblaciones de aguacates criollos con grandes diferencias alélicas unas de otras. Aún en regiones cercanas como la provincia Espaillat y la provincia Puerto Plata encontramos que los aguacates son muy diferentes y muestra poca similitud en constitución alélica.

Los aguacates procedentes de poblaciones más distantes y aisladas como son las de Santo Domingo, Puerto Escondido (Independencia), Agua Negra (Pedernales), El Naranjo (Padre Las Casas, Azua), Mundito de Santa Elena (Barahona), La Peñita (Capotillo, Dajabón), y Los Montones Arriba (San José de Las Matas, Santiago) entre otras, muestran gran diferencia entre sus poblaciones aunque muchos de ellos comparten características entre ellos.

Para tener una caracterización más precisa de estas poblaciones, y de otras no estudiadas, se recomienda continuar los estudios de microsatélites con nuevos y mayor número de marcadores.

Agradecimiento

A los **Técnicos de Zonas** del Ministerio de Agricultura que tan gentilmente nos prestaron su ayuda en los recorridos realizados en todo el país.

A los **Técnicos del CEBIVE** que nos ayudaron en la recolección y procesamiento de las muestras.

A **Carlos Vergara**, M.Sc. Y Técnicos del Área de Biotecnología Médica del IIBI, por la ayuda prestada en la determinación de los microsátélites.

A la **Dra. Bernarda Castillo**, por el interés que siempre mostró en el desarrollo de este proyecto.

Al **Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (Programa Fondocyt)** por el financiamiento económico de este proyecto.



Muestra Provincia Espaillat



Muestra Juan Rodríguez



Productor Juan Rodríguez
28/10/2013



Panorama cordillera Septentrional