SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS CRIOLLOS DE ZAPOTE NEGRO (*Diospyros digyna* Jacq.) CULTIVADOS EN YUCATÁN

TESIS

Que presenta:

Laura Nataly Matos Díaz

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:

Dr. Rubén Humberto Andueza Noh

Conkal, Yucatán, México, Mes, 2019 año

TecNM

EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO
Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México, a 27 de enero de 2020.

El comité de tesis del candidato a grado: **Laura Nataly Matos Díaz**, constituido por los CC. **Dr. Rubén Humberto Andueza Noh, M.C. Daniel Eduviges Cituk Chan, Dr. René Garruña Hernández y Dr. Luis Leonardo Pinzón López** habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS CRIOLLOS DE ZAPOTE NEGRO (*Diospyros digyna* Jaq.) CULTIVADOS EN YUCATÁN,** que presenta como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en ciencias en Horticultura Tropical**, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Rubén Humberto Andueza Noh
Director de Tesis

M.C. Daniel Eduviges Cituk Chan
Asesor de tesis

Dr. René Garruña Hernández
Asesor de Tesis

Dr. Luis Leonardo Pinzón López
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán a 27 de enero de 2020

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Laura Nataly Matos Díaz

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos los que colaboraron en mi formación profesional. Y por el apoyo que han brindado en la realización de este trabajo.

Al Consejo de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad de poder contar con la ayuda financiera durante toda la maestría.

Al Instituto Tecnológico de Conkal, por la pertinencia de formar parte del programa de maestría ciencias.

Agradeciendo igual a todos los maestros que forman parte del Instituto Tecnológico de Conkal y son importantes en los estudios de formación académica de los alumnos.

Al Dr. Rubén Andueza Noh por ser mi director de tesis, por darme todo su apoyo incondicional al igual que la paciencia al brindarme tiempo de calidad durante todo el proceso de investigación de este trabajo y enseñarme con dedicación los programas estadísticos utilizados en estudios moleculares.

Al Mc. Daniel Eduviges Cituk Chan, por ser mi asesor, mostrarme su apoyo, aconsejándome, dándome libros y material importantes para mi formación académica.

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico principalmente a Dios por darme vida y guiarme en todos mis pasos y darme parte de él como lo fue el amor eh inspirarme para continuar durante este proceso deseado, dándome salud en todo momento para poder asistir a todas las clases y no dejarme nunca.

A mi madre Laura Beatríz Matos Díaz por el apoyo incondicional que mostro conmigo y todo el amor que me brindo al igual que la paciencia que me tuvo.

A mi papito el mejor abuelito del mundo Porfirio Matos García, por darme muchos consejos y ejemplos en vida que me motivo a seguir en este camino hasta lograr terminar y obtener el título deseado.

A mi compañero de vida Eliseo Noceda Uc por su amor, trabajo y sacrificio durante estos años que me apoyo en todo momento y aconsejo para un bien, para lograr una meta más en mi vida académica y estar en los momentos difíciles.

A mis mejores amigas Christian Lucely Pérez Chablé y Carolina Isabel Basto Pool por darme consejos y apoyo moral para mejorar como persona y por alegrar día a día cada momento que compartimos juntas durante los dos años que duro la maestría.

A mi compañero David Hernández Pinto por el apoyo que me dio y la paciencia que tuvo al irme enseñando los procesos del laboratorio para poder realizar este estudio.

A todos se los dedico con un inmenso amor, por apoyarme y motivarme a salir adelante, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURA III

ÍNDICE DE CUADROS IIV

CAPITULO 1 6

1.1 INTRODUCCIÓN 6

1.2 ANTECEDENTES 7

1.2.1 Los recursos fitogenéticos e importancia 7

1.2.2 Los recursos fitogenéticos en México 7

1.2.3 Los recursos genéticos frutícolas en México 8

1.2.4 La fruticultura en Yucatán 9

1.2.5 Modelo de estudio 10

1.2.6 Diversidad y estructura genética 13

1.2.7 Marcadores genéticos 13

1.2.8 Estudios de caracterización y diversidad genética en *Diospyros* spp. . 14

1.3 HIPÓTESIS 16

1.4 OBJETIVOS 16

1.4.1 Objetivo General 16

1.4.2 Objetivos Específicos 16

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 17

1.6 BIBLIOGRAFÍA 18

CAPÍTULO 2. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL ZAPOTE NEGRO (*Diospyros digyna* JACQ.) CULTIVADO EN YUCATÁN 23

2.1 RESUMEN 23

2.2 INTRODUCCIÓN 24

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS 25

2.3.1 Material vegetal 25

2.3.2 Extracción de ADN y amplificación de marcadores ISSR 25

2.3.3 Analís de datos 26

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27

2.4.1 Estructura genética de dos genotipos de zapote negro. 27

2.4.2 Relaciones genéticas. 29

2.4.3 Diversidad genética. 32

2.5 CONCLUSIONES 33
2.6 LITERATURA CITADA 33

ÍNDICE DE FIGURA

CAPÍTULO 2 **PÁGINA**

Figura 1. Estimación del número de grupos genéticos de zapote negro con base en el índice delta K, utilizando valores de K = 1-5 y 10 simulaciones para cada valor de K……..Error! Bookmark not defined.

Figura 2. Análisis de asignación de individuos entre dos genotipos de zapote negro, que muestra la formación de dos grupos genéticos y los niveles de ancestría compartida entre los 18 individuos evaluados…….Error! Bookmark not defined.

Figura 3. Dendrograma UPGMA de dos genotipos criollos de zapote negro obtenido con el coeficiente de similitud de Dice..... Error! Bookmark not defined.

Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de dos genotipos de zapote negro cultivados en Yucatán, México. Rombos negros=grupo 1; círculos negros=grupo 2. ..... Error! Bookmark not defined.

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 2 **PÁGINA**

Cuadro 1. Análisis de Varianza molecular (AMOVA) de dos genotipos de zapote negro cultivados en Yucatán, México…….....Error! Bookmark not defined.

Cuadro 2. Estimadores de riqueza alélica y diversidad genética de dos genotipos de zapote negro cultivados en Yucatán, México..... Error! Bookmark not defined.

CAPITULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

México posee una extraordinaria riqueza biológica, ubicándose entre los cinco países con mayor biodiversidad (Sarukhán *et al*., 2009; CONABIO, 2006; Espinoza *et al*., 2008; Pimm *et al*., 1995). Para el caso de los recursos genéticos de frutales, se han identificado alrededor de 621 especies, entre estas se estima que solamente 65 especies frutícolas han sido explotadas comercialmente, de las cuales se ha señalado que 32 son especies nativas, mientras que 33 son especies introducidas (Borys y Leszczyñska, 2001; Segura-Ledesma *et al*., 2009). Como se puede apreciar, la riqueza de especies frutales en el país está bien documentada, pero su base genética aún no lo está, lo que no ha permitido potencializar su aprovechamiento especialmente en las especies nativas, este es el caso del zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) en la Península de Yucatán, donde es muy apreciado por las comunidades rurales debido a su excelente sabor y a sus propiedades nutricionales; aunque su cultivo aún no es de forma comercial, esta especie puede llegar a ser de importancia económica para México. El zapote negro pertenece a la familia Ebenaceae, es nativo del sur de México y América central. En México se distribuye de forma silvestre en zonas tropicales y subtropicales por la vertiente del océano pacífico de Jalisco a Chiapas y de Veracruz a Yucatán por la costa del golfo en donde es frecuentemente cultivado (Duarte y Paull, 2015). Es un árbol de hoja perenne con una altura aproximada de 25 m, su fruto es una baya de forma globosa de color verde brillante cuando aún no madura y cuando se encuentra maduro cambia su color de verde oliva a verde fangoso; su mesocarpio (pulpa) va de color café a negro muy abundante dulce y suave, presenta de 10 a 14 semillas (Morton, 1987). Por sus características organolépticas los frutos se consumen en estado fresco solo o en combinación con otras frutas en jugos, mermeladas y helados, es una buena fuente de vitamina C superando incluso a los cítricos, además contiene carbohidratos y minerales (Miller *et al*., 1998). La corteza y hojas trituradas se utilizan como una cataplasma de ampollas o como veneno para peces en las Filipinas. En Yucatán, la cocción de hojas del árbol se emplea como un astringente, además diversas preparaciones se utilizan contra la lepra, la tiña y comezón en la piel (Miller *et al*., 1998; Morton, 1987). El fruto del zapote negro es ampliamente consumido en los mercados regional y local, en el mercado internacional es apreciado como un fruto exótico por sus características nutricionales (Yahia *et al*., 2011). A pesar de su importante aceptación en diversos mercados regionales y su gran potencial de comercialización como

fruto exótico para el mercado nacional e internacional, actualmente no se cuenta con información ni se han realizado estudios sobre la diversidad genética de la especie, la existencia y desarrollo de variedades locales y su potencial uso agrícola. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo consistirá en caracterizar la diversidad y estructura genética de dos genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) cultivados en el estado de Yucatán.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Los recursos fitogenéticos e importancia

Con el origen de la agricultura y domesticación de plantas desarrollado por el ser humano aproximadamente 10,000 años atrás, el proceso evolutivo ha generado una gran diversidad de especies que a través de la selección y manejo permanente se han adaptado a las diferentes condiciones del mundo, esta variabilidad genética acumulada ha jugado un papel esencial para el equilibrio del planeta y constituye lo que actualmente se denomina germoplasma. Dentro del germoplasma, los recursos fitogenéticos se definen como la diversidad genética correspondiente al Reyno vegetal e involucra tanto plantas cultivadas como a sus parientes silvestres (Fowler y Hodgkin, 2004). Son considerados de gran valor para las generaciones presentes y futuras por el papel que desempeñan en la seguridad alimentaria y el desarrollo humano, ya que contribuyen de forma importante a la capacidad de la agricultura para responder a los cambios ya sean de tipo ambiental o socioeconómico, además de ser fuente de genes de interés que confieran resistencia a plagas, enfermedades o condiciones ambientales desfavorables, con los que se puede obtener, mediante mejora genética variedades mejor adaptadas a las nuevas condiciones (Esquinas-Alcazar, 1993; FAO, 2019). Debido a la importancia mundial que representan estos recursos, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define los recursos fitogenéticos como: cualquier material de origen vegetal, que incluye tanto material reproductivo como de propagación vegetativa que contienen unidades funcionales de la herencia y poseen valor real o potencial presente o futuro para la alimentación y la agricultura (Maselli, 2013).

1.2.2 Los recursos fitogenéticos en México

México es un centro importante de domesticación y diversidad de numerosos cultivos, algunos de gran importancia global; como el maíz, el trigo, el arroz, la cebada, el centeno y la avena, estos cultivos se originaron mediante el proceso de domesticación que llevaron a cabo los antiguos habitantes de Mesoamérica. Esta diversidad de especies

cultivadas no es el resultado solamente de eventos biológicos, sino de la interacción, durante cientos de generaciones, entre poblaciones humanas, factores ambientales y las plantas; estas poblaciones humanas, a raíz de sus necesidades, intereses, prácticas y conocimientos han ido conformando y manteniendo esta diversidad (Bellon *et al*., 2009). La cual ha sido estimada entre 20,000 y 30,000 especies diferentes (Rzedowski, 2006; Bellón, 2009); de las cuales únicamente 50 son utilizadas con fines agrícolas, sin embargo, si tomamos en cuenta que también existen muchas especies subutilizadas de interés regional o con algún valor de uso en las comunidades, que no han sido aprovechadas con fines comerciales y le sumamos el número de especies introducidas que han contribuido de manera importante en la producción agrícola del país, el número de especies se incrementa de 50 a 226 de esta manera, podemos darnos cuenta de la gran riqueza de recursos fitogenéticos que existen y que pueden ser aprovechados en México.

De acuerdo con Ortega *et al*., (2000): los recursos fitogenéticos de México pueden ser clasificados en tres grandes grupos: a) los autóctonos, b) los introducidos y c) los exóticos con potencial de ser introducidos. Los autóctonos los define como aquellas plantas que son originarias del país, que por lo general presentan gran diversidad y constituyen la base genética de la producción y del mejoramiento genético; ejemplo de estos son: el maíz (*Zea mays* L), el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), las Calabazas (*Cucurbita* spp) y el Chile (*Capsicum annuum* L). Los introducidos son recursos fitogenéticos que se usan en el país sin ser originarios del mismo; con frecuencia se trata de cultivos de enorme importancia económica y cultural; entre estos podemos mencionar al trigo (*Triticum aestivum* L), algunas especies de chile como son el chile manzano (*Capsicum pubescens*), el café (*Coffea arábica*), etc. Finalmente, están los recursos fitogenéticos exóticos con potencial para convertirse en nuevos cultivos de importancia económica. Por ejemplo: las Sapotáceas, anonáceas, el nopal tunero, la pitahaya vainilla, chaya, entre otros.

1.2.3 Los recursos genéticos frutícolas en México

En el sureste de México se reportan 87 especies con presencia de frutos de uso alimenticio con un porcentaje del 58.8 % de especies nativas y un 41.2% de especies introducidas. Las nativas son: *Sambucus nigra* var. *canadensis* (L.) Bolli, *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L., *Annona diversifolia* Saff., *Annona muricata* L., *Crescentia alata* Kunth, *Parmentiera aculeata* (Kunth) Seem., *Bromelia karatas* L., *Carica papaya* L., *Jacaratia mexicana* A. DC., *Jarilla heterophylla* (Cerv. ex La Llave) Rusby, *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Melothria pendula* L., *Diospyros digyna* Jacq.,

Arbutus xalapensis Kunth, *Comarostaphylis discolor* (Hook.) Diggs, *Inga jinicuil* Schltdl., *Inga vera* Willd., *Leucaena diversifolia* (Schltdl.) Benth., *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé ex DC.) Benth., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Leucaena macrophylla* Benth., *Leucaena pulverulenta* (Schltdl.) Benth., *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth., *Vitex mollis* Kunth, *Persea americana* Mill., *Persea hintonii* C. K. Allen, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Malpighia mexicana* A. Juss., *Ceiba aesculifolia* (Kunth) Britten & Baker f., *Psidium guajava* L., *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied., *Passiflora foetida* (Desv. ex Ham.) Mast., *Ardisia compresa* Kunth, Crataegus mexicana DC., *Fragaria vesca* L., *Prunus serotina* Ehrh. subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh, *Rubus adenotrichus* Schltdl., *Casimiroa edulis* La Llave & Lex., *Xylosma flexuosum* (Kunth) Hemsl., *Manilkara sapota* (L.) P. Royen, *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, *Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn, *Styrax argenteus* C. Presl, *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Solanum americanum* Mill., *Symplocos citrea* Lex. ex La Llave & Lex., *Celtis caudata* Planch., *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg., *Vitis tiliifolia* Humb. & Bonpl. ex Roem. & Schult., y las introducidas son: *Mangifera indica* L., *Annona cherimola* Mill., *Annona squamosa* L., *Cocos nucifera* L., *Ananas comosus* (L.) Merr., *Inga edulis* Mart., *Tamarindus indica* L., *Juglans regia* L., *Punica granatum* L., *Ficus carica* L., *Morus nigra* L., *Musa acuminata* Colla, *Musa paradisiaca* L., *Musa sapientum* L., *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora ligularis* Juss, *Passiflora tarminiana* Coppens & V. E. Barney, *Macadamia integrifolia* Maiden & Betche, *Cydonia oblonga* Mill., *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl., *Prunus armeniaca* L., *Prunus persica* (L.) Batsch, *Pyrus communis* L., *Pyrus malus* L., *Rubus idaeus* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Coffea arabica* L., *Citrus aurantifolia* Swingle, *Citrus aurantium* L., *Citrus limetta* Risso, *Citrus limon* (L.) Osbeck, *Citrus medica* L., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Arriaga *et al*., 2014).

1.2.4 La fruticultura en Yucatán

Desde 1959 se empieza a dar de manera regular la fruticultura en Yucatán en los municipios de Muna, Ticul, Oxkutzcab, Akil y Tekax dentro de los huertos familiares y de forma comercial en las quintas donde se fueron implementando sistemas de riego dentro de los cultivos, empezando a figurar la producción de frutales con el 2.3 % en la agricultura, en las regiones henequeneras y milperas empieza a figurar en conjunto la fruticultura con la horticultura como una zona de producción de frutas tropicales ya en 1983 la producción subió a 5.6 % por el implemento de sistemas de riego por gravedad y

aspersión para la producción principalmente de cítricos como el limón, la naranja dulce al igual que de aguacate, mango, papaya y tamarindo (Novelo, 1983).

Augusto Pérez Toro (1972) impulso la fruticultura en Yucatán realizando los primeros trabajos donde propone que "*Yucatán es tierra para árboles*" promoviendo proyectos productivos que involucrarán especies frutales nativas o introducidos, promoviendo de esta manera el cultivo de especies frutales nativas como: : aguacate, anonas, guanábana, saramuyo, nance, sapotes, chicozapote, mamey rojo, zapote amarillo, zapote blanco, zapote negro, papayo, bonete, cocoyol, guayabo, ciricote, pepino de árbol, huano, pitaya, piñuela. Entre las especies introducidas que tuvieron éxito en Yucatán podemos mencionar: el caimito, mamey, naranja dulce, naranja agria, limones y toronjas todas estas especies frutales se empezaron a implementar para la alimentación cuando las milpas eran destruidas por langostas y cuando el henequén dejo de producirse a gran escala.

1.2.5 Modelo de estudio

El zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) pertenece a la familia *Ebenaceae*, es nativo del sur de México y América central. Es un árbol de hoja perenne con una altura aproximada de 25 cm, su fruto es una baya de forma globosa de color verde brillante cuando aún no madura y cuando se encuentra maduro cambia su color a verde fangoso; su mesocarpio (pulpa) va de color café a negro, es muy abundante dulce y suave, presenta de 10 a 14 semillas (Morton, 1987). Por sus características organolépticas los frutos se consumen en estado fresco, solo o en combinación con otras frutas, en jugos, mermeladas y helados, siendo una buena fuente de vitamina C, superando incluso a los cítricos, además contiene carbohidratos y minerales (Miller *et al*., 1998). La corteza triturada y hojas se utilizan como un cataplasma para ampollas o como veneno para peces en las Filipinas. En Yucatán, es muy apreciado por las comunidades rurales debido a su excelente sabor y a sus propiedades nutricionales, la cocción de hojas del árbol se emplea como un astringente, además diversas preparaciones se utilizan contra la lepra, la tiña y comezón en la piel (Miller *et al*., 1998; Morton, 1987). El fruto del zapote negro es ampliamente consumido en los mercados regional y local, en el mercado internacional es apreciado como un fruto exótico por sus características nutricionales (Yahia *et al*., 2011).

1.2.5.1 Origen y distribución

Se cree que *Diospyros* se originó de Gondwana occidental de acuerdo al análisis panbiogeográfico con una distribución de 1452 sitios de colectas de las 20 especies dentro de Global Biodiversity Information Facility, con el análisis de parsimonia se incluyen dos grupos el primero perteneciente a la provincia de Yucatán, Petén, Golfo de México, Depresión de Balsas, Costa de Pacífico, Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transversal, Sierra Madre del Sur y el segundo grupo que incluye Oaxaca y el Altiplano Zacatecano Potosino y en el análisis de trazos individuales se agrupa en un espacio que incluye el centro de Veracruz y un espacio que engloba la zona nororiente de la península de Yucatán en ambos análisis se detectó que se encuentran distribuidos en dos zonas una en el centro y otra en el sur del México, dado los resultados obtenidos se cree que las especies de *Diospyros* migran de la región Neotropical pasando a la Zona Mexicana debido a la dispersión y a los factores geológicos existentes en las zona (García *et al*., 2015).

Morton, 1987 menciona la existencia de el zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) como un cultivo que se originó en las costas de México y América central perteneciente a la familia de las Ebenaceae el cual fue disperso aproximadamente en 1692 por los españoles llevado a Amboina, filipinas, Malaca, Hawái, Cuba, Puerto rico, Brasil y la Republica Dominicana (Morton, 1987; Carranza, 2000). En un análisis realizado de filogenética del género *Diospyros* perteneciente a la familia de las Ebenaceae se determinó los orígenes biogeográficos de esta especie endémicas de Nueva Caledonia, utilizando secuencias de ADN de ocho regiones plástidas con sus accesiones se obtuvo que son monofilias de *Diospyros* colonizando con cuatro linajes difiriendo en su grado de diversificación según los datos moleculares obtenidos en donde se demuestra que tiene un linaje paleoendémico derivándose de su ancestro más antiguo perteneciente a la especie Australia (Duangjai *et al*., 2009). Según Carranza *et al*., (2000) menciona que las Ebenaceae es una familia perteneciente a dos géneros uno grande llamado *Diospyros* el cual se encuentra distribuido en la zona pantropical incluyendo 475 especies con gran importancia en México y otro género más pequeño conformado por 12 especies el cual se encuentra distribuido por las zonas de África donde es apreciado por la madera que posee.

1.2.5.2 Clima y suelo

Aunque se cree que el zapote negro no es de clima tropical rigurosamente no lo es ya que de acuerdo con su condición de tolerancia a las inundaciones y sensibilidad a la

sequía han permitido que crezcan en suelos drenados permitiendo la variabilidad y diversidad de la especie como es el caso de Florida donde los frutos no son de la misma forma como se diera en la tierra de origen eso se debe a la temperatura baja y a nivel de mar (Morton, 1987).

1.2.5.3 Usos y consumo

El uso más frecuente se da en la utilización de sus hojas hervidas como astringentes, para curar la lepra, tiña y daños leves en la piel (Morton, 1987). En sus semillas se encuentran sustancias que son utilizadas para curar la Leucemia (SAGARPA, 2016). *Diospyros* spp. es utilizado en usos medicinales ya que contiene compuestos que permiten a la planta brindar beneficios a la salud humana, estos compuestos se deben a la asociación fúngica endófita detectada en Alemania en hojas y raíces de la planta donde se encuentran la presencia del hongo *Colletotrichum gloeosporioide* fungiendo como colonizador de los tejidos de la planta de forma simbiótica brindándole una asociación mutua para la producción de bioactivos (Clovis y Langer; 2012).

Carranza (2000) menciona que el uso también se le atribuyen por la importancia que tiene la madera de ébano y por sus cualidades aparte que algunas especies de esta gran familia se usa de forma comestible. Gracias a la importancia que tiene este fruto *Diospyros digyna* Jacq. en México se consume machacando el fruto con la adición de brandy y jugo de naranja como lo hacen en florida fermentando el fruto con piña para obtener un licor espumoso, en las Filipinas se realizan postres como son helados y pasteles a base de leche y jugo de naranja utilizando la pulpa de los frutos.

Con base a los grandes beneficios que tiene el consumo de este frutos G.G. Gastélum *et al*., 2008 originaron el desarrollo de un puré de zapote negro a una humedad alta, ya que contiene ácido ascórbico y posee una limitada duración el fruto, es por ello que en su estudio realizaron tres formulaciones las cuales consisten en ajustes de agua con sacarosa con una disminución del pH del 4.1 junto con el ácido cítrico administrándoles 500 ppm de sorbato de potasio para ser envasados durante diez días a 4°C para verificar por medio de los aspectos fisicoquímicos y microbiológicos comprobando que la duración máxima del puré consistía cuando este se encontraba procesado.

1.2.5.4 Importancia del cultivo

El zapote negro contiene compuestos fenólicos como ácido sinapic, miricetina, ácido ferúlico y catequina obteniendo una capacidad alta en antioxidante en comparación

a otros frutales, es de ahí la importancia que se le da a este fruto del cual se recomienda utilizarlo en la dieta por sus grandes beneficios en el consumo fresco (Yahia, 2010). También contiene una fuente alta de vitamina C y de calcio, hierro, fosforo, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico por ese motivo se comercializa esta fruta por los beneficios que brinda en la nutrición (Carranza, 2000; Celik, 2008; Morton, 1987).

1.2.6 Diversidad y estructura genética

La diversidad genética es definida como la variación de los genes de las especies, es decir la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos y es generada por las variaciones que ocurren en la secuencia del ADN. La variabilidad genética entre individuos o poblaciones es la base de la adaptación y evolución y juega un rol importante en la tolerancia a los diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos (Crawford y Whitney, 2010; Luque y Herráez, 2000). La estructura genética se define como la distribución de la variación genética (frecuencias alélicas) dentro y entre poblaciones y está relacionada fuertemente con el flujo génico, el tamaño efectivo de la población y la selección natural, factores que tienden a incrementar los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones (Freeland, 2005). Ambos parámetros de diversidad y estructura genética pueden ser estimados mediante el uso de marcadores genéticos.

1.2.7 Marcadores genéticos

De acuerdo con Valadez y Kahl (2000) definen un marcador genético como algún gen que al expresarse concede un alcance fenotípico que puede ser localizado con facilidad. Estos marcadores genéticos se clasifican en tres tipos, los marcadores morfológicos, los marcadores bioquímicos, y los marcadores moleculares. Los marcadores morfológicos, suelen ser afectados por el ambiente y la fenología de la planta. los patrones que se estudian con este marcador son de carácter sencillo y están basados en las leyes de la herencia Mendeliana (Clegg *et al*., 1999). Los marcadores bioquímicos también denominados marcadores proteicos, se basan en las propiedades migratorias de las proteínas (proteínas de reserva) y enzimas (isoenzimas). Estos marcadores se obtienen mediante electroforesis y se detectan mediante tinciones histoquímicas específicas de las enzimas que se quieren analizar (IPGRI and Cornell University, 2003). Entre sus principales desventajas se mencionan, los bajos niveles de variación que pueden detectar y que se ven afectados por modificaciones postranscripcionales o postransduccionales por ser producto de la expresión génica. Los marcadores moleculares son definidos como fragmentos de ADN que revelan variaciones en la secuencia de ADN (Jiang, 2017). Son

una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además, se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante entre los dominantes se encuentran los RAPD, AFLP, ISSR, RAHM o RAMPO y entre los codominantes encontramos a los RFLP y SSR (Azofeifa, 2006; Eguiarte *et al*., 2007).

1.2.7.1 Marcadores ISSR (Secuencias Repetidas Intersimples)

Los marcadores ISSR son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los marcadores ISSRs han demostrado su utilidad para desarrollar estudios en la resolución de múltiples problemas biológicos. Los polimorfismos que se obtienen con este tipo de marcador, permiten aplicarlos en la identificación de individuos, identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridización, distinción de individuos con origen clonal y sexual, así como también han sido empleados para distinguir variedades intraespecíficas (particularmente en especies con importancia económica) (Zietkiewicz *et al*., 1994; Pradeep *et al*., 2002).

1.2.8 Estudios de caracterización y diversidad genética en *Diospyros* spp.

De manera general la mayoría de los estudios que se han analizado en especies del género *Diospyros* se han enfocado en analizar las relaciones genéticas entre las especies del generó y muy pocos estudios se han desarrollado para evaluar aspectos de diversidad y estructura genética a nivel intraespecífico. Yýldýz *et al*., 2007 evaluaron la diversidad genética de poblaciones de *Diospyros Kaki* cultivados en Turquía utilizando marcadores RAPD y sugieren que existen diferencias genéticas entre las poblaciones de *D. kaki* cultivados en Turquía. Por su parte, Guo *et al*., 2006 al estudiar los niveles de diversidad en *Diospyros kaki*, utilizando marcadores SSR, encontraron niveles de diversidad genética moderados. Con base en sus resultados, estos autores señalan que es necesario realizar un estudio más detallado que les permita determinar los niveles de diversidad reales de la especie, de igual manera, estos autores señalan que los marcadores SSR

pueden ser una herramienta útil en la identificación de nuevos cultivares dentro del género *Diospyros*. Guan *et al*., 2019 realizaron un análisis comparativo del transcriptoma de *Diospyros*, en busca de genes relacionados con la domesticación de la especie y reportan la existencia de divergencia genética interespecífica, así como la existencia de genes candidatos que pueden ser cruciales para la adaptación, domesticación y especiación de *Diospyros.* Turner *et al*., 2013 al utilizar marcadores AFLPs, para estudiar la diversidad genética en diferentes especies de *Diospyros,* indican que la divergencia observada entre las especies analizadas no corresponde a ninguna hipótesis taxonómica, ecológica o patrón geográfico, por lo que sugieren realizar más estudios que involucren tanto datos morfológicos como ecológicos. Provance *et al*., 2013 al analizar la estructura genética de poblaciones de *Diospyros rioje* Gómez Pompa, encontraron altos niveles de estructura genética y señalan que el alto valor de diferenciación genética observado está relacionado con la ubicación geográfica de los genotipos evaluados. Naval *et al*., 2010 y Turner *et al*., 2013 reportan altos niveles de diversidad genética entre diferentes especies de *Diospyros* e indican que la mayor diversidad genética de sus genotipos evaluados se distribuye al interior de los genotipos y la menor diversidad es distribuida entre los genotipos. Como puede verse existen estudios que resaltan la importancia de las especies del género *Diospyros*, de importancia económica, sin embargo, aún hace falta realizar estudios de diversidad genética en especies del género *Diospyros* que son consumidas y comercializadas a nivel local y regional y que pueden ser de importancia, así como fuente de genes de importancia para el mejoramiento genético como es el caso de *Diospyros digyna* Jacq.

1.3 HIPÓTESIS

Las dos poblaciones criollas de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) estudiadas se encuentran genéticamente diferenciadas.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

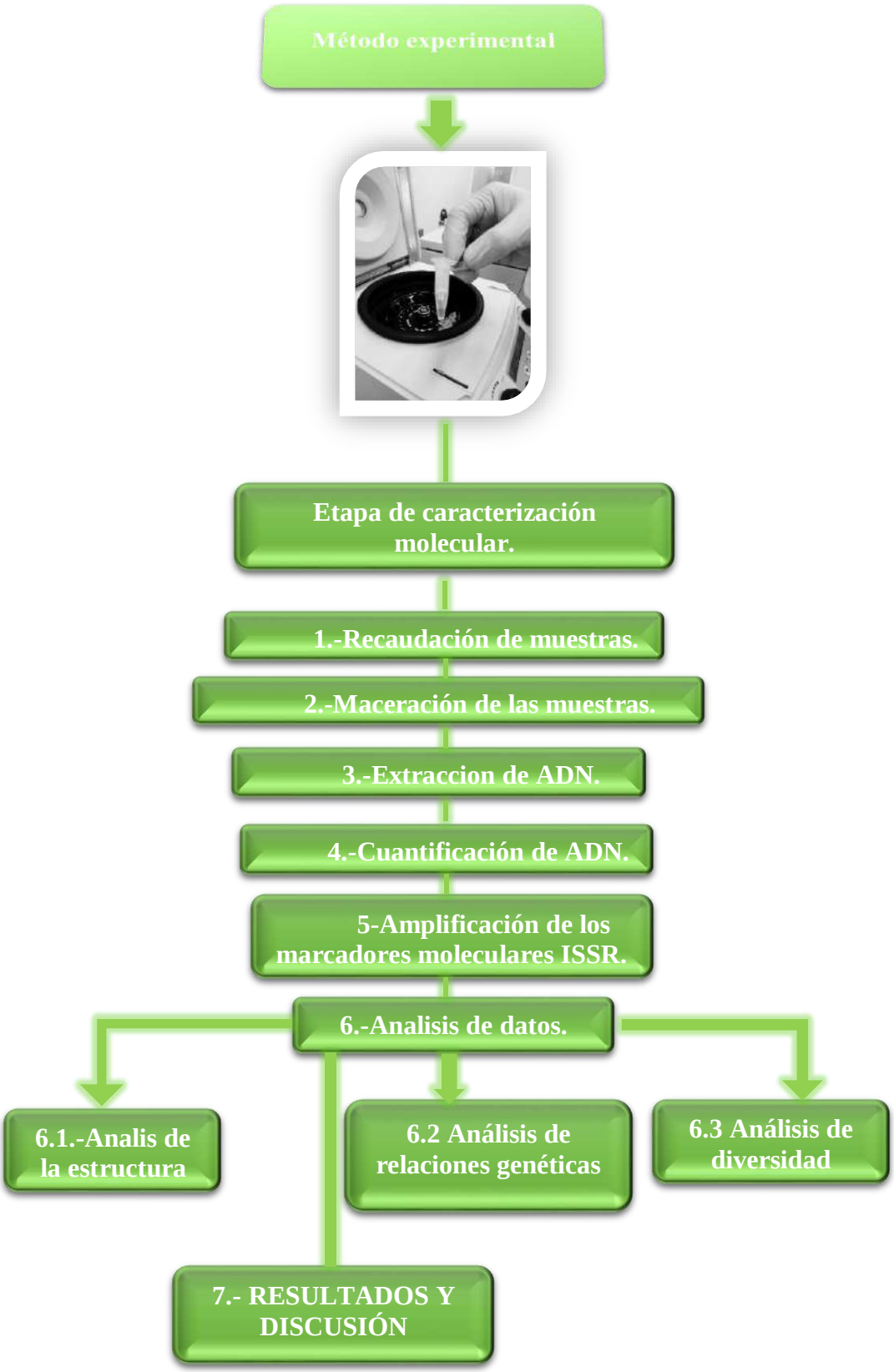
Caracterizar la variabilidad y estructura genética de dos genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) cultivados en el estado de Yucatán.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la diversidad genética de dos genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.).

- Identificar patrones de estructura genética interpoblacional en dos genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.).

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



1.6 BIBLIOGRAFÍA

Arriaga-Martín, R., I. Martínez-De La Cruz, A. Gonzales-Huerta, D. Pérez-López, J. G. Cruz-Castillo y N. Guadarrama-Martínez1. 2014. Catálogo de especies frutales en el sureste del Estado de México. México. REMEXCA 5(8): 1509-1517.

Azofeifa, D. Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Costa Rica Alajuela. Agronomía Mesoamericana pp. 221-241.

Bellon, M.R., A.F. Barrientos-Priego, P. Colunga-GarcíaMarín, H. Perales, J.A. Reyes Agüero, R. Rosales Serna, D. Zizumbo-Villarreal et al. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 355-382.

Borys, M.W. y B.H. Leszczyñska. 2001. El potencial genético frutícola de la República Mexicana. (CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas). México: Fundación Salvador Sánchez Colin. pp. 99.

Carranza, G. E. 2000. Flora del Bajío y de regiones Adyacentes. Michoacán. Bot. 24(8): 244-251.Fascículo 83.

Celik, A., S. Ercisli. 2008. Persimmon cv. Hachiya (*Diospyros kaki* Thumb.) fruit: some physical, chemical and nutritional properties. Turkia. International Journal of food Sciencies and Nutrition 59 (7-8): 599-606.

Clegg y colaboradores. 1999. The use of molecular marks in the management and improvement of avocado (*Persea amaricaca* Mill.). Chapingo. Seri horticultura: 5(Esp.): 227-231.

Clovis, D. M., E. Langer. 2012. Diversity and phylogeny of fungal endophytes associated wiht *Diospyros Crassiflora*. Alemania. Mycology 3 (3): 175-187.

CONABIO. 2006. *Capital natural y bienestar social*. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Crawford, K.M. y K.D. Whitney. 2010. Population genetic diversity influences colonization success. Mol. Ecol. 19: 1253-1263.

Duangjai, S., R Samuel, J. Munzinger, F. Forest, B. Wallnofer, H. J. Michael, B. G. Fischer y M. W. Chase. 2009. A multi-locus plastid phylogenetic analysis of the

pantropical genus *Diospyros* (*Ebenacea*), with an emphasis on the radiation and biogeographic origins of the New Caledonian endemic species. Vienna, New Caledonia. Molecular Phylogenetics and Evolution 52: 602-620.

Duarte, O. y R.E Paull. 2015. Exotic fruits and nuts of the new world. Tracy head editors. 317p.

Eguiarte, L.E. Suza V. Aguirre X. 2007. Ecologia Molecular. Instituto Nacional de Ecologia, Semarnat. 573p.

Espinosa, D., S. Ocegueda y colaboradores. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. *In*: Conabio *Capital Natural de México, Volumen I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.

Esquinas-Alcázar, J.T. 1993. La diversidad genética como material básico para el desarrollo agrícola. En: La Agricultura del Siglo XXI. J.I. Cubero y M.T. Moreno. Madrid. Mundi-Prensa, pp. 79-102.

FAO. 2019. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. http://www.fao.org/cgrfa/topics/plants/es/. Consultado 14/11/2019

Fowler, C., Hodgkin, T. 2004. Plant genetic resources for food and agriculture: assessing global availability. Annu. Rev. Environ. Resourc. 29:143-179.

Freeland J.R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd. 373p.

Gastélum-Reynoso, G.G., R. Ávila-Sosa y J.A. Guerrero-Beltrán. 2008. Desarrollo de un producto de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) de alta humedad. Puebla. Temas selectos de Ingeniería de alimentos 2-2: 69-78.

García-Díaz, R., J. A. Cuevas-Sánchez, S. Segura-Ledesma y F. B. P. Francisco. 2015. Análisis panbiogeográfico de *Diospyros* spp. (Ebenaceae) en México. México. REMEXCA 6(1): 187-200.

Guan, C. L. S., W. Mengke, J. Hao, R. Xiaofeng, W. Renzi and Y. Yong. 2019. Comparative transcriptomic analysis reveals genetic divergence and domestication genes in *Diospyros*. BMC Plant Biology 19: 227.

Guo, D., H. Zhang, Z. Luo. 2006. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. And

related species revealed by IRAP and REMAP analysis. China. Plant Science 170: 528-533.

IPGRI and Cornell University. 2003. Módulo de aprendizaje. Tecnología de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas. *In*: Janick, J., and R. E. Paull (eds). The encyclopedia of fruit and nuts. CAB International, Wallingford, UK.

Jiang, G. 2017. Molecular Markers. *In*: Brian T., B. G. Murray and D. J. Murphy (eds). Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Virginia State University, Petersburg. pp. 207-214.

Luque J., A. Herraéz. 2000. Biología Molecular e Ingeniería Genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier, España. 469p.

Maselli-Conde S. 2013. Recursos fitogenéticos: elementos clave para el desarrollo y la seguridad alimentaria. Rev. de la universidad del valle de Guatemala, 26: 56-59.

Miller, W.R., J.L. Sharp y E. Baldwin. 1998. Quality of irradiated and nonirradiated black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.) after storage and ripening. Agricultural Research Service TEKTRAN 110: 215-218.

Morton, J. F. 1987. Fruits of Warm Climates. Publ. Miami, Fl. U. S. A. pp: 416-418.

Naval, M., E. Zuriaga, S. Pecchioli, G. Llácer, E. Giordani y M. L. Badenes. 2010. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes, 6: 677–687.

Novelo-Coello C. G. 1983. Algunos aspectos de la fruticultura Yucateca. UACH. Yucatán. pp. 43-75

Ortega P.R., A.M.A. Martínez, G.J.J. Sánchez. 2000. Recursos Fitogenéticos Autóctonos. En: P. Ramírez V., R. Ortega P., A. López H., F. Castillo G., M. Livera M, F. Rincón S. y F. Zavala G. (eds). 2000. Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura, Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. Chapingo, México.

Pimm, S. L., J. R. Gareth, J. L. Gittleman y T. M. Brooks. 1995. The Future of

Biodiversity. SCIENCE, 269.

Pradeep, R., N. Sarla y E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its aplication in plant breeding. Euphytica, 128(1): 9-17

Provance, M. C., I. García-Ruiz, C. Thommes y J. Ross-Ibarra. 2013. Population genetics and ethnobotany of cultivated *Diospyros riojae* Gómez Pompa (Ebenaceae), an endangered fruit crop from Mexico. Genetic Resource and Crop Evol, 60: 2171–2182.

SAGARPA. 2016. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. http://www.siap.sagarpa.gob.mx, accesada 21/02/18

Sarukhán, J., y colaboradores. 2009. *Capital natural y bienestar social. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Segura-Ledesma S., D. Zavala-Robles, C. Equihua-Cervantes, J. Andrés-Agustín y E. Yepez-Torrez. 2009. Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. Rev. Chapingo,15 (3): 297-305.

Silva C. R., I. Vilar de Morais Oliveira, F. V. Moro, A. B. G. Martines. 2010. Caracterização Morfológica do fruto, semente e morfofuncão de plântulas de sapoteira-preta (*Diospyros Ebenaster* Retz). Brasil. Comunicata Scientiae, 1(1): 9-14.

Turner, B., O. Paun, J. Munzinger, S. Duangjai, W. C. Mark y S. Rosabelle. 2013. Analyses of amplified fragment length polymorphisms (AFLP) indicate rapid radiation of *Diospyros* species (Ebenaceae) endemic to New Caledonia. Evolutionary Biology, 13: 269.

Valdez y Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa México.

Yahia, E. M., F. Gutiérrez, C. Arvizu de León. 2011. Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). Queretaro. Food Research International 44: 2210-2216.

Yýldýz, M., B. Safder, C. Suna y A. Sümer.2007. Molecular diversity in persimmon (*Diospyros kaki* L.) cultivars growing around Hatay province in Turkey. African

Journal of Biotechnology 6 (20): 393-2399.

RZEDOWSKI, J. 1998. La vegetación de México. México: Ed. LIMUSA, 341 p.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL ZAPOTE NEGRO (*Diospyros digyna* Jacq.) CULTIVADO EN YUCATÁN

Laura Nataly Matos-Díaz[1], Rubén Humberto Andueza-Noh[2], Daniel Eduviges Cituk-Chan[1], René Garruña-Hernández[2], Luis Leonardo Pinzón-López[1]

[1]Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico s/n Conkal, Yucatán. [2]CONACYT-Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico s/n Conkal Yucatán.

2.1 RESUMEN

En la Península de Yucatán se cuenta con una amplia diversidad de frutales nativos que son cultivados y consumidos por las personas de las comunidades rurales y que podrían ser cultivos de importancia económica. Sin embargo, la falta de atención hacia estos recursos fitogenéticos no ha permito que puedan ser explotados a nivel comercial y aún menos existe información básica que permita tener un mejor aprovechamiento de las mismas. Dentro de toda esta gran diversidad de recursos nativos se encuentra el zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq), especie que posee un enorme potencial económico gracias a sus características nutricionales. Sin embargo, en la actualidad existen muy pocos estudios sobre la especie y la mayoría han sido dirigidos sobre sus propiedades fisicoquímicas, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad y estructura genética de dos genotipos criollos de zapote negro cultivados en Yucatán, utilizando nueve marcadores moleculares ISSR. Los resultados del análisis de estructura y relaciones genéticas indican que los genotipos evaluados se encuentran diferenciados genéticamente y podrían ser considerados en un futuro como nuevas variedades de zapote negro si continúan bajo selección y propagación clonal. A nivel de genotipos, el genotipo dos presentó mayor porcentaje de loci polimórficos (% P = 36) y mayor diversidad genética, en ambos estimadores de diversidad (Hbay = 0.34 y I = 0.19). A nivel total se observaron niveles de diversidad genética que pueden ser considerados altos para la especie estudiada (0.56).

2.2 INTRODUCCIÓN

México posee una extraordinaria riqueza biológica, ubicándose entre los cinco países con mayor biodiversidad (CONABIO, 2006; Piñeiro *et al*., 2008; Pimm *et al*., 1995). Para el caso de los recursos genéticos frutícolas, se han identificado alrededor de 621 especies, entre estas se estima que solamente 65 especies de frutales han sido explotadas comercialmente, de las cuales 32 son especies nativas y 33 introducidas (Borys y Leszczyñska, 2001; Segura-Ledesma *et al*., 2009). Como se puede apreciar, la riqueza de especies frutales en el país está bien documentada, pero su base genética aún no lo está, lo que no ha permitido potencializar su aprovechamiento especialmente en las especies nativas, este es el caso del zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq) en la Península de Yucatán, donde es muy apreciado por las comunidades rurales debido a su excelente sabor y a sus propiedades nutricionales, aunque su cultivo aún no es de forma comercial, esta especie puede llegar a ser de importancia económica para México. El zapote negro pertenece a la familia Ebenaceae, es nativo del sur de México y América central. En México se distribuye de forma silvestre en zonas tropicales y subtropicales por la vertiente del océano pacífico de Jalisco a Chiapas y de Veracruz a Yucatán por la costa del golfo, donde frecuentemente es cultivado (Duarte y Paull, 2015). Es un árbol de hoja perenne con una altura aproximada de 25 cm, su fruto es una baya de forma globosa de color verde brillante cuando aún no madura y cuando se encuentra maduro cambia su color a verde fangoso; su mesocarpio (pulpa) va de color café a negro, es muy abundante dulce y suave, presenta de 10 a 14 semillas (Morton, 1987). Por sus características organolépticas los frutos se consumen en estado fresco, solo o en combinación con otras frutas, en jugos, mermeladas y helados, siendo una buena fuente de vitamina C, superando incluso a los cítricos, además contiene carbohidratos y minerales (Miller *et al*., 1998). La corteza triturada y hojas se utilizan como una cataplasma para ampollas o como veneno para peces en las Filipinas. En Yucatán, la cocción de hojas del árbol se emplea como un astringente, además diversas preparaciones se utilizan contra la lepra, la tiña y comezón en la piel (Miller *et al*., 1998; Morton, 1987). El fruto del zapote negro es ampliamente consumido en los mercados regional y local, en el mercado internacional es apreciado como un fruto exótico por sus características nutricionales (Yahia *et al*., 2011). A pesar de su importante aceptación en diversos mercados regionales y su gran potencial de comercialización como fruto exótico para el mercado nacional e internacional, actualmente no se cuenta con información ni se han realizado estudios sobre la diversidad genética de la especie, la existencia y desarrollo de variedades locales y su potencial uso

agrícola. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la diversidad y estructura genética de dos genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.) cultivados en el estado de Yucatán.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Material vegetal

El material vegetal consistió en dos genotipos criollos de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.), colectados en el estado de Yucatán, pertenecientes a la colección base del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. La principal diferencia entre los dos genotipos evaluados es la presencia y ausencia de semillas en los frutos (genotipo 1 frutos sin semilla o partenocárpicos y genotipo dos frutos con semilla). Para la caracterización molecular, debido a la escasez de árboles, nueve árboles por genotipo fueron muestreados.

2.3.2 Extracción de ADN y amplificación de marcadores ISSR

El ADN genómico se extrajo de un total de nueve individuos por genotipo, a partir de hojas jóvenes, libres de plagas y enfermedades y sin daño mecánico. La extracción del ADN se realizó con el kit de extracción para plantas Mini Kit DNeasy® (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. La calidad del ADN fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en una solución amortiguadora de TBE al 0.5X.

Para la amplificación por PCR, se utilizaron nueve iniciadores ISSR universales que han demostrado resultados eficientes con elevados niveles de amplificación y alto porcentaje de polimorfismo en diferentes especies estudiadas (Yao *et al*., 2008, Días *et al*., 2013). Las amplificaciones por PCR, se realizaron en un volumen total de 20 µL conteniendo: 10µL de iTaqTM Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad), 2µL de iniciador ISSR, 1µL de muestra de ADN, suspendido en 7µL de agua ultra pura. Los ciclos de amplificación fueron corridos en un termociclador BioRad (C1000 Touch) programado para 4 min. a 94 º C de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos a 94 º C durante 2 min, 1.5 min., de alineamiento con el rango de temperaturas de 54 a 56 ° C dependiendo del iniciador usado, 1 min., a 72 º C y un periodo de extensión final de 7 min. a 12 º C. Los productos de las amplificaciones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con 1µL de buffer de reacción (Uview 6X loading dye de la marca BioRad), en una solución amortiguadora TBE al 1X. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal a 110 volts constante durante 45 min., y un marcador

de peso molecular de un 1 kb como referencia para las lecturas. La visualización de los fragmentos se realizó en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager, de la marca BioRad.

2.3.3 Analís de datos

Los datos fueron analizados mediante la evaluación de la estructura genética, el análisis de las relaciones genéticas y el análisis de la diversidad genética. La estructura genética fue analizada mediante una prueba de asignación de individuos, un análisis de varianza molecular (AMOVA) y con el estimador de diferenciación genética Fst. Primero se realizó la prueba de asignación de individuos con el programa STRUTURE 2.3.4 (Pritchard *et al*., 2000), para inferir el número de K poblaciones, utilizando el modelo de ancestría mezclado con frecuencias alélicas correlacionadas. Para cada valor de K (K=1 a 5) un total de 10 simulaciones independientes fueron corridas, cada simulación consistió en un período de calentamiento de 100,000 iteraciones y una longitud de corrida de 1,000,000 de iteraciones bajo el modelo de las Cadenas de Marcov Monte Carlo (MCMC). El valor óptimo de K se obtuvo de acuerdo con Evanno *et al*. (2005) usando el programa Structure Harvester versión 0.6.94 (Earl and VonHoldt, 2012). Por último, se generaron las gráficas de ancestría para el valor óptimo de K usando STRUCTURE. El análisis de varianza molecular (AMOVA), se realizó considerando tres niveles jerárquicos: total (incluyendo a todas las muestras) entre genotipos y dentro de genotipos.

2.3.3.1 Análisis de relaciones genéticas

Las relaciones genéticas fueron analizadas mediante la construcción de un dendrograma usando el método UPGMA y la distancia euclidiana con 1,000 repeticiones bootstrap, con el programa PAST (Hammer *et al*., 2001). Para dar soporte a los resultados observados con el UPGMA se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) usando el método de covarianza no estandarizado con el programa GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse, 2006).

2.3.3.2 Análisis de diversidad genética.

La diversidad genética fue evaluada a nivel de genotipos y a nivel total, con los índices de riqueza alélica: porcentaje de loci polimórficos (%P), numero de alelos observados (na), numero de alelos efectivos (ne) e índices de diversidad genética: índice de Shannon (I) y la heterocigosidad promedio, mediante el cálculo de la H bayesiana (HBay), obtenidos con los programas POPGENE (versión 1.31) (Yeh *et al*., 1999) y AFLP SURV ver. 1.0 (Vekemans, 2002).

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Estructura genética de dos genotipos de zapote negro.

La prueba de asignación de individuos mostró que de las 10 simulaciones corridas para cada valor de K = 1 a 5, el punto de inflexión mayor ocurrió en K=2, lo que indica la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados (Figura 1).

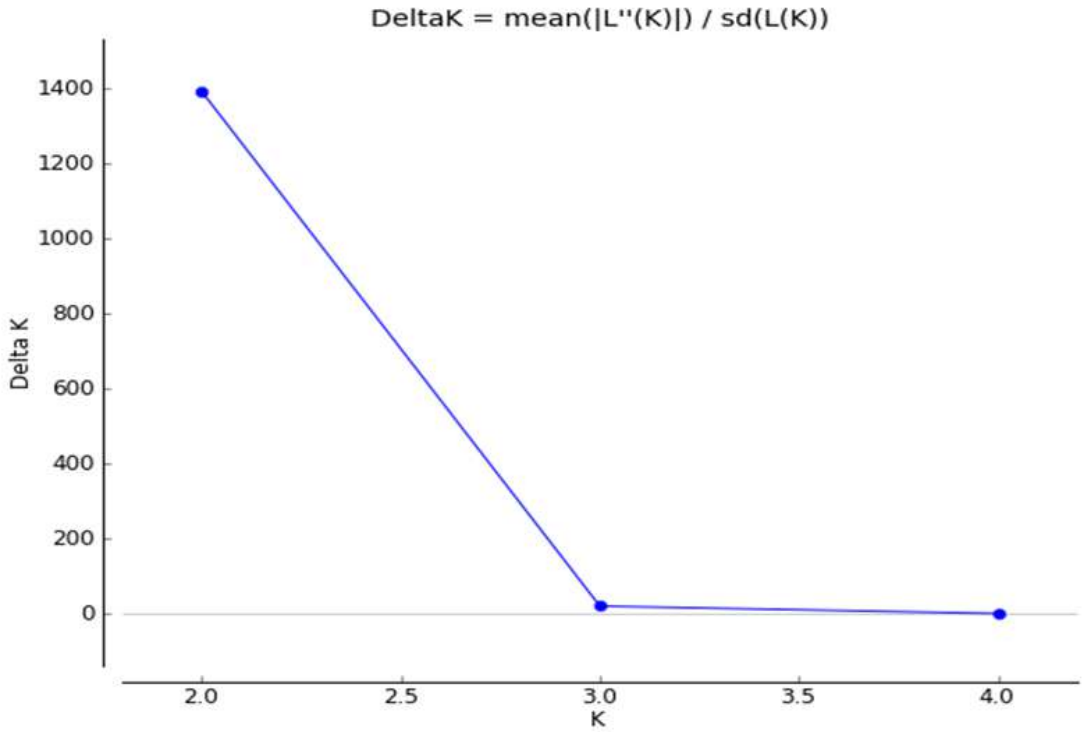


Figura 1. Estimación del número de grupos genéticos de zapote negro con base en el índice delta K, utilizando valores de K = 1-5 y 10 simulaciones para cada valor de K.

En la Figura 2, se observa los coeficientes de ancestría de las 18 muestras analizadas en los dos genotipos estudiados, se aprecia que los individuos del genotipo uno que poseen fruto sin semilla (partenocárpicos) formaron el grupo uno y los individuos del genotipo dos que poseen frutos con semilla formaron el grupo dos. Este resultado indica que los genotipos evaluados se encuentran en un proceso de diferenciación genética y que existe bajo o nulo flujo génico entre los individuos de cada genotipo, aspectos que pueden atribuirse al echo, de que los individuos pertenecientes al grupo uno, al no presentar semillas característica que es deseable para los productores, están siendo seleccionados y propagados de forma clonal, lo cual podría estar generando cambios en la arquitectura de su genotipo o generar reducción de su diversidad genética, y por lo tanto, repercute de

forma directa en la diferenciación genética con respecto a los individuos del grupo dos (Mckey *et al*., 2010). Otro aspecto que pue estar involucrado en los altos niveles de estructura genética de los genotipos es su origen geográfico ya que los individuos del grupo uno, fueron colectados en la región sur del estado de Yucatán, mientras que los individuos del grupo dos fueron colectados en la región centro-norte del estado, lo cual limita el flujo genético que puede ocurrir entre los individuos de ambos grupos. Resultados similares son reportados por Yýldýz *et al*., (2007) al observar dos grupos genéticos bien diferenciados en *Diospyros kaki*, una especie hermana del zapote negro. Turner *et al*., (2013) al utilizar marcadores AFLPs, encontraron resultados similares al estudiar la diversidad genética en diferentes especies de *Diospyros* e indican que la divergencia observada no corresponde a ninguna hipótesis taxonómica, ecológica o patrón geográfico, por lo que sugieren realizar más estudios que involucren tanto datos morfológicos como ecológicos. Por otro lado, Guan *et al*., (2019), reportaron la formación de tres grupos genéticos, al evaluar la diversidad y estructura genética de 228 poblaciones de *Diospyros Kaki* Thunb., colectadas en diferentes regiones geográficas y resaltan la existencia de estructura geográfica al observar que las relaciones genéticas más estrechas, se dieron entre las poblaciones más cercanas geográficamente.

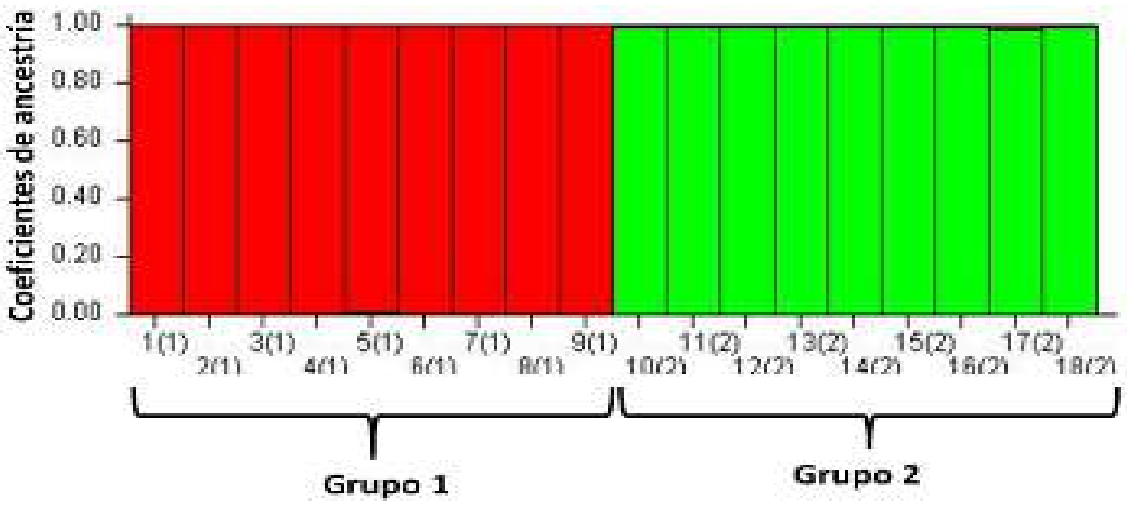


Figura 2. Análisis de asignación de individuos entre dos genotipos de zapote negro, que muestra la formación de dos grupos genéticos y los niveles de ancestría compartida entre los 18 individuos evaluados.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que el 75% de la diversidad genética total se distribuye entre los genotipos y el 25% dentro de los genotipos (Cuadro 1). Este resultado concuerda con el alto valor de diferenciación genética observado (Fst= 0.435), e indica que la estructura genética es alta entre los genotipos evaluados y da soporte a los dos grupos observados en el análisis bayesiano (Figura 2). Resultados similares, fueron observados en poblaciones de *Diospyros rioje* Gómez Pompa (Provance *et al*., 2013) y *Diospyros kaki* (Guang *et al*., 2019), estos autores señalan que el alto valor de diferenciación genética está relacionado con la ubicación geográfica de los genotipos evaluados. Naval *et al*. (2010) y Turner *et al*. (2013) reportan resultados contrastantes a los reportados en este estudio, al observar que la mayor diversidad genética de sus genotipos se distribuye al interior de los genotipos y la menor diversidad es distribuida entre los genotipos. La Mayor distribución de la diversidad genética entre los genotipos observada en este estudio, puede ser un indicativo de la existencia de un alto nivel de selección, efecto fundador o por efecto de la deriva genética a la que pueden estar sujetas las poblaciones (Yonemori *et al*., 2008).

Cuadro 1. Análisis de Varianza molecular (AMOVA) de dos genotipos de zapote negro cultivados en Yucatán, México.

Fuente	df	SC	CM	Variación estándar	%
Entre genotipos	1	90.222	90.222	9.674	75
Dentro de genotipos	16	50.444	3.153	3.153	25
Total	17	140.667		12.827	100

df = grados de libertad; SC = suma de cuadrados; CM = cuadrados medios; % = porcentaje de variabilidad genética.

2.4.2 Relaciones genéticas.

En la figura 3, se muestra un patrón de agrupamiento general basado en la constitución genética de cada genotipo y su origen geográfico, se observa la conformación de dos principales grupos. El grupo 1 quedó integrado por los individuos del genotipo uno y el grupo 2, se integró con los individuos del genotipo dos. El PCoA indicó que las

dos primeras coordenadas principales explicaron el 88 % de la variación total acumulada dando soporte al análisis. La coordenada principal uno (PCoA 1), explicó 82 % de la variación, mientras que la segunda PCoA 2 explicó el 6 % (Figura 4). El resultado obtenido en el PCoA confirma el resultado del dendograma UPGMA al generar la formación de dos grupos principales con un 100% de similitud de correspondencia entre ambos análisis. La formación de los dos grupos en ambos análisis confirma que los genotipos se están diferenciando genéticamente y que podrían ser considerados en un futuro como nuevas variedades de zapote negro si continúan bajo selección y propagación clonal. Sin embargo, es necesario desarrollar más estudios sobre aspectos de morfología, productividad y evaluación del comportamiento en campo de estos dos genotipos evaluados, para poder ser considerados como variedades.

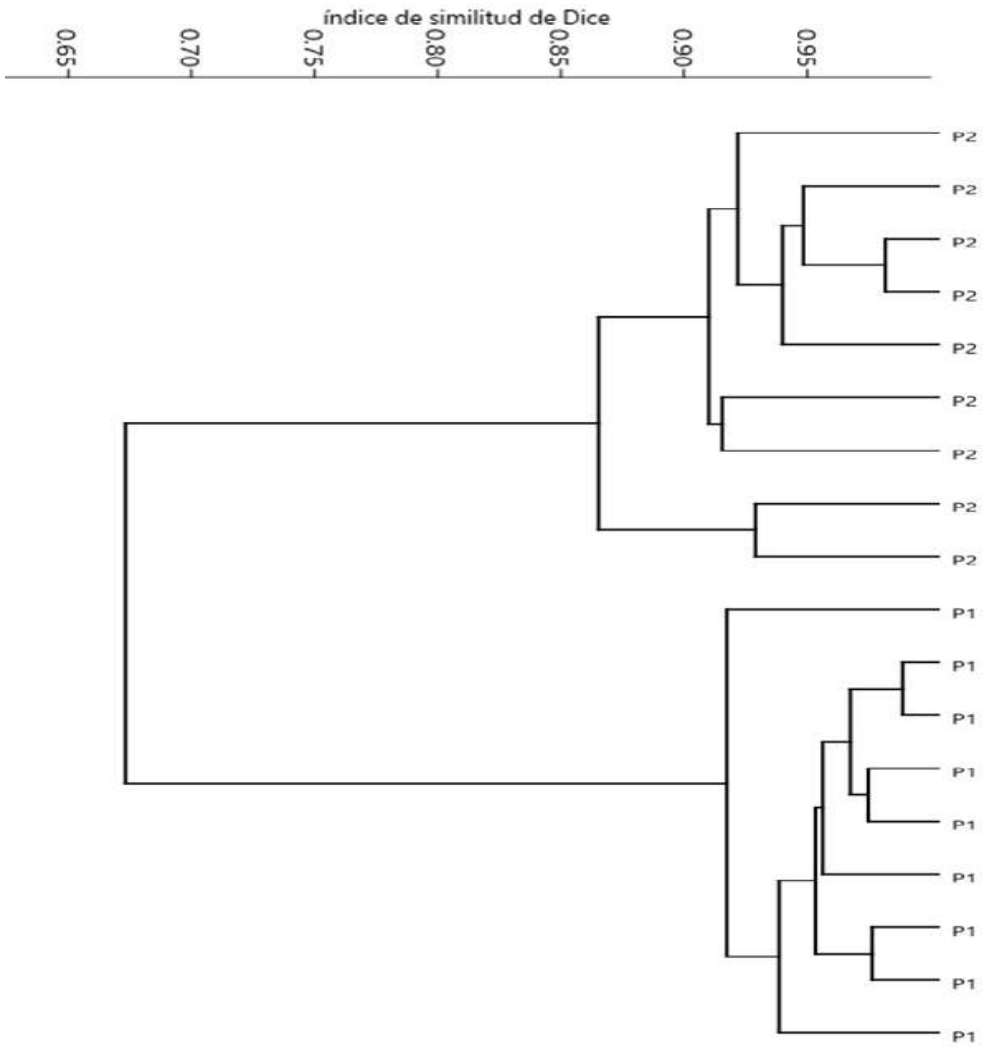


Figura 3. Dendrograma UPGMA de dos genotipos criollos de zapote negro obtenido con el coeficiente de similitud de Dice.

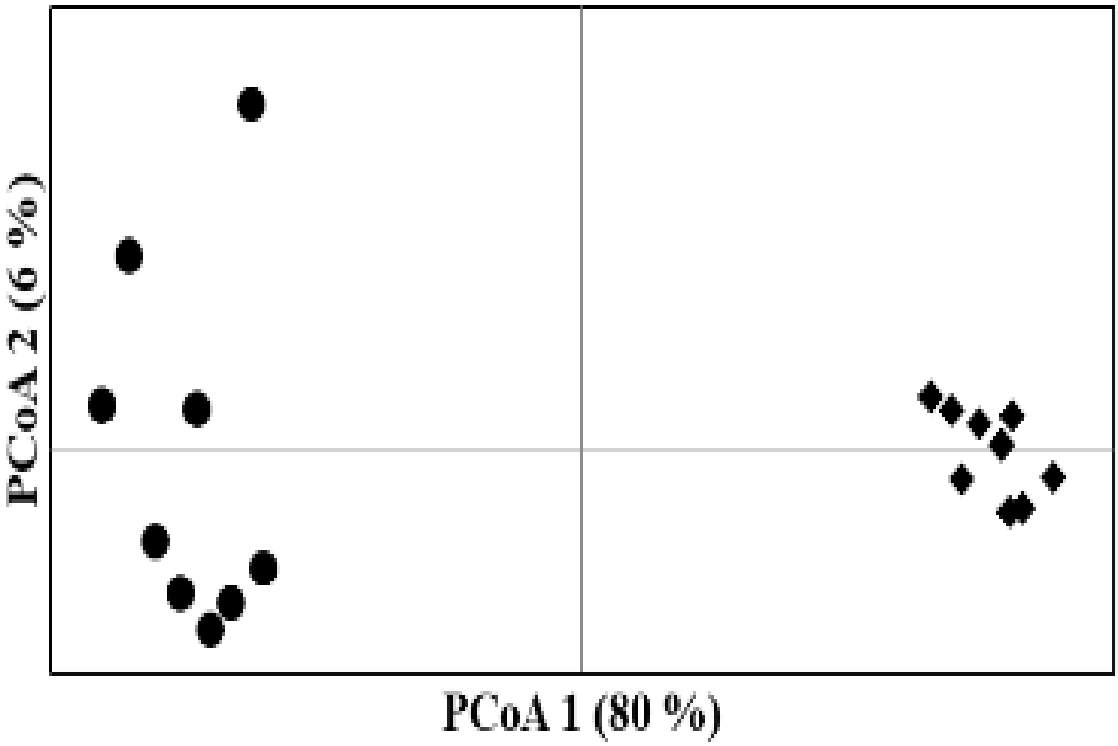


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de dos genotipos de zapote negro cultivados en Yucatán, México. Rombos negros=grupo 1; círculos negros=grupo 2.

2.4.3 Diversidad genética.

Los 9 iniciadores ISSR evaluados, generaron un total de 59 loci, de los cuales 26 % fueron polimórficos. La diversidad genética fue analizada a nivel de genotipo y a nivel total (Cuadro 2). A nivel de genotipo, el genotipo dos presentó mayor porcentaje de loci polimórficos (% P = 36) y mayor diversidad genética, en ambos estimadores de diversidad (H_{bay} = 0.34 y I = 0.19). A nivel total se observaron niveles de diversidad genética que pueden ser considerados altos para la especie estudiada (0.56). Los niveles de diversidad observados a nivel genotipo son similares a los reportados por Guan *et al*. (2019) al estudiar la diversidad genética de *Diospyros kaki* Thunb, provenientes de diferentes regiones geográficas de China con marcadores SSR. Pero son superiores a lo reportado por Deng *et al*. (2015) al estudiar los niveles de diversidad y relaciones genéticas en variedades locales y poblaciones naturales de cuatro especies de *Diospyros* con marcadores SCoT. A nivel total los resultados de diversidad genética observados superan lo reportado en estudios previos realizados en diferentes especies del género *Diospyros* (Guan *et al*., 2019; Deng *et al*., 2015).

Cuadro 2. Estimadores de riqueza alélica y diversidad genética de dos genotipos de zapote negro cultivados en Yucatán, México.

Genotipo	**N**	**Na**	**Ne**	**T. Loci**	**%P**	**H_{bay}**	**I**
Genotipo 1	9	0.81±0.09	1.10±0.03	59	17	0.29413±0.03	90±0.02
Genotipo 2	9	1.22±0.08	1.22±0.04	59	36	0.34313±0.03	95±0.03
Total	18	1.07±0.06	1.16±0.02	59	26	0.565±0.02	42±0.01

Na= número de alelos observados; Ne= número de alelos esperados; T. loci= Número total de loci observados; %P= porcentaje de loci polimórficos; Hbay= diversidad genética de Nei con enfoque bayesiano; I= índice de diversidad genética de Shannon Weaver.

2.5 CONCLUSIONES

Los marcadores ISSR permitieron, distinguir dos grupos diferenciados con base en su perfil genético que corresponden a cada uno de los genotipos evaluados. El análisis de varianza molecular indicó que la mayor diversidad está distribuida entre los genotipos y no dentro de los genotipos como se ha observado en otras especies de *Diospyros*. Se observaron niveles altos de diversidad genética en ambos genotipos, con la mayor diversidad presente en el genotipo dos. A nivel total se observaron niveles de diversidad genética que pueden ser considerados altos para la especie estudiada. Estos resultados podrían ayudar en la clasificación y determinación de nuevas variedades de zapote negro, así como para la conservación y utilización de los recursos de *D. digyna* Jacq. Se sugiere realizar más estudios que involucren datos morfológicos y fisicoquímicos en estos dos genotipos que puedan permitir clasificarlos como nuevas variedades de zapote negro.

2.6 LITERATURA CITADA

Borys, M.W. y B.H. Leszczyñska. 2001. El potencial genético frutícola de la República Mexicana. (CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas). México: Fundación Salvador Sánchez Colin. 99p.

CONABIO. 2006. *Capital natural y bienestar social*. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Deng, L., Q. Liang, X. He, C. Luo, H. Chen y Z. Qin. 2015. Investigation and Analysis of Genetic Diversity of Diospyros Germplasms Using Scot Molecular Markers in Guangxi. PLos ONE 10(8): 1-13.

Díaz, G. B., V. M. Gomes, T. M. S. Morales, U. P. Zottich, G. R. Rabelo, A. O. Carvalho, M. Moulin, L. S. A. Goncalves, R. Rodrigues and M. D. Cunha. 2013. Characterization of Capsicum species using anatomical and molecular data. Genetics and Molecular Research 12 (4): 6488-6501.

Duarte, O. y R.E Paull. 2015. Exotic fruits and nuts of the new world. Tracy head editors. 317p.

Earl, D. A., M. Vonholdtb. 2012. Structure harvester: a web site and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4(2): 359–361.

Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611-2620..

Guan, C., S. Liu, M. Wang, H. Ji, X. Ruan, R. Wang and Y. Yong. 2019. Comparative transcriptomic analysis reveals genetic divergence and domestication genes in *Diospyros*. BMC Plant Biology 19: 227p.

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

Miller, W.R., J.L. Sharp y E. Baldwin. 1998. Quality of irradiated and nonirradiated black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.) after storage and ripening. Agricultural Research Service TEKTRAN 110: 215-218.

Morton, J. F. 1987. Fruits of Warm Climates. Publ. Miami, Fl. U. S. A. 416-418 pp.

McKey, D. M. Elias, B. Pujol, A. Duputié. 2010. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. New Phytologist. 186: 318–332.

Naval, M., E. Zuriaga, S. Pecchioli, G. Llácer, E. Giordani, M. L. Badenes. 2010. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes 6: 677–687.

Peakall, R., P. E. Smouse. 2006. GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28: 2537–2539.

Pimm, S. L., J. R. Gareth, J. L. Gittleman, T. M. Brooks. 1995. The Future of Biodiversity. SCIENCE 269.

Piñero, D., et al. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.

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

Provance, M. C., I. García-Ruiz, T. Casper y J. Ross-Ibarra. 2013. Population genetics and ethnobotany of cultivated *Diospyros riojae* Gómez Pompa (Ebenaceae), an

endangered fruit crop from Mexico. Genet Resour Crop Evol. 60: 2171–2182.

Segura-Ledesma, S., D. Zavala - Robles, C. E. Cervantes, J. A. Agustín, E. Y. Torrez. 2009. Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. Rev. Chapingo15 (3): 297-305.

Turner, B., O. Paun, J. Munzinger, S. Duangjai, W. C. Mark y S. Rosabelle. 2013. Analyses of amplified fragment length polymorphisms (AFLP) indicate rapid radiation of *Diospyros* species (Ebenaceae) endemic to New Caledonia. Evolutionary Biology 13:269

Vekemans, X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Yahia, E. M., F. Gutiérrez, C. Arvizu de León. 2010. Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). Queretaro. Food Research International 44: 2210-2216.

Yao, H., Y. Zhao, D. F. Chen, J. K. Chen, T. S. Zhou. 2008. ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of *Glycyrrhiza uralensis*. BIOLOGIA PLANTARUM 52 (1): 117-120.

Yeh, F. C., T. J. Boyle .1999. POPGENE v. 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research,

Yonemori, K., C. Honsho, A. Kitajima, M. Aradhya, E. Giordani, E.Bellini, D.E. Parfitt. 2008. Relationship of European persimmon (Diospyros kaki Thunb.) cultivars to Asian cultivars, characterized using AFLPs. Genet. Res. Crop. Evol. 55, 81–89.

Yýldýz, M., S. Bayazıt, S. Cebesoy y A. Sümer. 2007. Molecular diversity in persimmon (*Diospyros kaki* L.) cultivars growing around Hatay province in Turkey. African

Journal of Biotechnology 6 (20): 2393-2399.