

VARIABILIDAD GENÉTICA EN CULTIVARES DE GUAYABO (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)

GENETIC VARIABILITY IN CULTIVARS OF GUAVA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)

Deysi Tapia Pérez y Juan Porfirio Legaria Solano*

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Chapingo, Edo. de México. Tel. 01 (595) 952-1642.
*Autor para correspondencia (jlegaria@correo.chapingo.mx)

RESUMEN

Se evaluó la variabilidad genética y morfológica de 17 genotipos de guayabo (*Psidium guajava* L.), provenientes de los Estados de Nayarit, Chiapas, Morelos, Zacatecas, Michoacán, Tamaulipas y Veracruz en México, y del Brasil. Los genotipos se estudiaron mediante patrones RAPD (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar). De 226 bandas evaluadas, 84.07 % fueron polimórficas. El análisis de conglomerados de RAPD detectó una similitud genética máxima de 91.3 % entre los genotipos MOR9 y MOR10 procedentes de Morelos, y una similitud mínima de 41 % entre los genotipos JROS22 y PAL8 de Michoacán y Brasil, respectivamente. De las 40 variables morfológicas medidas, 10 presentaron fuerte contribución a la variación de los genotipos, y fueron: longitud de peciolo de hoja chica y de hoja grande, ángulo de la 3a nervadura de hoja chica y de hoja grande, ángulo de la 5a nervadura de hoja chica y de hoja grande, forma de hoja chica y de hoja grande, curvatura de la sección transversal de hoja chica y de la hoja grande. El dendrograma generado de los 15 genotipos de guayabo a partir de caracteres morfológicos construido con el método de agrupamiento de Ward y distancias euclidianas, formó siete grupos en los que los genotipos tendieron a agruparse con los de su mismo lugar de origen, lo que coincidió con los grupos formados por el dendrograma construido con los marcadores tipo RAPD.

Palabras clave: *Psidium guajava*, RAPD, polimorfismo, disimilitud, caracteres morfológicos.

SUMMARY

The genetic and morphological variability of 17 guava (*Psidium guajava* L.) genotypes from the States of Nayarit, Chiapas, Morelos, Zacatecas, Michoacán, Tamaulipas and Veracruz in México, and from Brazil, were evaluated. The genotypes were studied by obtaining RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) patterns. Of 226 bands evaluated, 84.07 % were polymorphic. The cluster analysis of RAPD detected a maximum genetic similarity of 91.3 % among the genotypes MOR9 and MOR10 from Morelos, and a minimum similarity of 41 % between the genotypes JROS22 and PAL8 from Michoacán and Brazil, respectively. Of the 40 morphological variables measured, ten of them make a strong contribution to the genotypic variability: longitude of petioles of small and big leaves, angles of the 3rd rib of small and big leaves, angles of the 5th rib of small and big leaves, forms of small and big leaves, bend of traverse section of small and big leaves. The dendrogram generated of 15 guava geno-

types by utilizing morphological traits and the Ward method of cluster and euclidian distances, showed that genotypes are grouped according to their geographical origin. This result agrees with the groups formed by utilizing RAPD markers.

Index words: *Psidium guajava*, RAPD, polymorphism, dissimilarity, morphological traits.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética que se encuentra en los cultivares y sus parientes silvestres es un tesoro biológico que constituye la materia prima para el mejoramiento genético. México es el segundo productor mundial de guayaba (*Psidium guajava* L.) después de la India, con 22 828 ha plantadas con guayabo en 2002, y un volumen de producción de 281 946 t (SAGARPA, 2004). La producción comercial de México se obtiene principalmente de genotipos procedentes de poblaciones nativas o introducidas de unas regiones a otras, pero cuya variación genética se desconoce, a diferencia de Estados Unidos de Norteamérica y la India donde utilizan 50 variedades mejoradas (González *et al.*, 2002).

En el país son pocos los trabajos donde se ha caracterizado la diversidad morfológica y agronómica del guayabo, la cual sería útil para identificar una especie o cultivar. Padilla *et al.* (2002) evaluaron 12 selecciones de guayabo cultivado en la región Calvillo-Cañones mediante caracteres morfológicos y observaron que éstos, a pesar de la variabilidad encontrada, tendieron a ser similares a los tipos 'China' y 'Media China' que son las variedades genéricas más cultivadas en dicha región, por lo que concluyeron que el guayabo 'Media China' tiene una reducida variabilidad fenotípica. Luego, al evaluar 24 selecciones de guayabo con base en características cualitativas de hoja, Padilla *et al.* (2003) encontraron que la mayor parte de las selecciones tuvieron hojas de forma oblonga, cordadas de la

base y obtusas del ápice; aunque en la curvatura de la sección transversal observaron las tres variantes (débil, media y fuerte), el nivel fuerte fue el que predominó en todas las selecciones. Por su parte, Hernández *et al.* (2003) observaron una amplia variabilidad fenotípica en características de la planta de guayabo entre y dentro de 12 árboles seleccionados procedentes de cuatro plantaciones analizadas.

Según Picca *et al.* (2002), los marcadores genético-moleculares son un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. Con la identificación genética se pueden asociar marcadores moleculares a los fenotipos y al comportamiento de los cultivos en el campo. En México Padilla *et al.* (2002) utilizaron marcadores moleculares RAPD y 12 selecciones de guayabo 'Media China'; observaron una similitud genética de 88 a 96 % entre las selecciones, lo que indicó una reducida variabilidad genotípica. Con la técnica RAPD, Martínez de Lara *et al.* (2004) detectaron diversidad genética en germoplasma de guayabo colectado en la región Calvillo-Cañones en Aguascalientes entre y dentro de árboles procedentes de cuatro huertas distintas; estos autores sugieren que probablemente la diversidad genética encontrada se debe a la obtención de plantas vía reproducción sexual para el establecimiento de estos huertos.

Prakash *et al.* (2002), al estudiar la variabilidad molecular de 41 genotipos de guayabo, que incluyeron cinco especies de *Psidium*, 23 variedades, 12 selecciones y un híbrido, concluyeron que a pesar de que la base genética de los guayabos de la India es reducida, varios cultivares no fueron genéticamente idénticos y mostraron diversidad y orígenes independientes. Hernández *et al.* (2003), al evaluar la diversidad genética de árboles de guayabo de cuatro huertas de San Tadeo, Calvillo, Aguascalientes mediante la técnica RAPD, encontraron una amplia variabilidad genética entre los árboles dentro y entre las plantaciones, pues resultó un agrupamiento no muy definido con base en las huertas de origen.

En este trabajo de investigación se caracterizaron 17 cultivares de guayabo mediante técnicas basadas en marcadores moleculares tipo RAPD y algunas variables morfológicas, y se determinó la eficiencia de los marcadores moleculares *vs.* variables morfológicas para diferenciar genotipos. El propósito fue monitorear la variabilidad existente en genotipos de guayabo cultivados en México, dado que este país es un centro de origen de dicho frutal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se evaluaron 17 cultivares de guayabo colectados en tres localidades de Nayarit (NAY3, NAY4 y NAY5) provenientes de semilla; tres de Brasil,

variedad 'Paluma' (PAL8) y 'Sassaoka' (SASS15 y SASS16) obtenidos de estacas herbáceas; dos de Tlayacapan, Morelos (MOR9 y MOR10); tres de Chiapas (CHI11, CHI12A y CHI24); dos de Tamaulipas (TAM13 y TTAM26); un criollo de Zacatecas (CZAC21); un criollo blanco de Eytepequez, Veracruz (CVER12) y dos de Michoacán (JROS22 y RMICH25), propagados a partir de semilla.

Extracción y amplificación del ADN. El ADN de cada genotipo se purificó mediante el protocolo descrito por De la Cruz *et al.* (1997). Se usaron 0.3 g de tejido de hojas jóvenes y frescas, que se desinfectaron con etanol 70 % y agua estéril. El tejido se secó antes de congelarse en N₂ líquido. El ARN se eliminó por adición de 2 μ L de una solución de 10 mg mL⁻¹ de ARNasa A por muestra. El ADN se resuspendió en un amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), y la concentración de cada muestra se cuantificó con la absorbancia a 260 nm, mediante un espectrofotómetro Jenway 6305 UV/vis. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2 % (p/v) teñidos en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹). Se hicieron diluciones del ADN a una concentración de 10 ng μ L⁻¹, cantidad necesaria para amplificar los RAPD.

Los 17 genotipos de guayabo se analizaron con la técnica RAPD. Se usaron 15 iniciadores para el análisis de los genotipos (OPA-02, OPA-04, OPA-05, OPA-07, OPA-08, OPA-12, OPA-18, OPA-19, OPB-01, OPB-03, OPB-04, OPB-05, OPB-06, OPB-09 y OPB-10; Operon Technologies, Alameda, Cal. EE. UU.). La amplificación al azar del ADN genómico de los genotipos se hizo mediante la reacción en cadena de la Taq ADN-polimerasa (PCR), en 25 μ L de solución que contenía 3.2 μ L de agua bidestilada estéril, 2.5 μ L de amortiguador de PCR (10 X), 10.0 μ L de dNTP's (500 μ M), 1.0 μ L de MgCl₂ (50 mM), 3.0 μ L de oligonucleótidos (10 pmol μ L⁻¹), 0.3 μ L de Taq ADN Polimerasa (5 U μ L⁻¹) de *Invitrogen* y 5.0 μ L de ADN genómico (10 ng μ L⁻¹). La amplificación consistió de un ciclo de pre-desnaturalización de 9 min a 94 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 37 °C, y 1 min a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de 7 min a 72 °C de extensión final. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Techne TC-412. La electroforesis se hizo en geles de agarosa 1.2 %. Las bandas amplificadas y separadas en el gel se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 mg mL⁻¹, y se observaron y fotografiaron con un transiluminador de luz UV y una cámara Kodak EDAS 290.

Evaluación de caracteres morfológicos. De los 17 genotipos caracterizados a nivel molecular, en 15 de ellos se evaluaron caracteres morfológicos. Para cada genotipo se eligieron ocho hojas chicas y ocho grandes, las cuales se

escanearon y mediante el programa Image Tool Ver. 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002) se cuantificaron las variables presentadas en el Cuadro 1. Las tres primeras variables se cuantificaron con la regla que proporciona el programa al prolongar una línea vertical de la punta del ápice hasta la base de la hoja, y una línea horizontal en la parte media de la hoja. Para el peciolo se prolongó una línea de la base de la hoja hasta el punto de corte del peciolo. Los ángulos de la tercera y quinta nervaduras se determinaron al prolongarlas con la ayuda del icono de ángulos del programa. La cuantificación de las variables índice de redondez y compactación, área foliar, ángulo del eje mayor, ángulo del eje menor, elongación y diámetro feret la hizo automáticamente el programa con sólo seleccionar cada hoja. La variable ángulo de inserción del peciolo se midió con ayuda de un transportador, cuya parte central se colocó en la rama del árbol. Adicionalmente a la medición proporcionada por el Image Tool versión 3.0 para determinar el área foliar, se utilizó un integrador de área foliar (LI-3000, Inc. Lincoln, Nebraska, EE. UU.), mientras que el número de nervaduras se contó visualmente. A las mismas hojas se les evaluaron cuatro caracteres morfológicos cualitativos (Cuadro 2), que se calificaron según la lista de descriptores morfológicos de la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades de Plantas (UPOV, 1987).

Cuadro 1. Caracteres morfológicos cuantitativos evaluados en 15 genotipos de guayabo.

| Carácter | Claves para hoja chica | Claves para hoja grande |
|--|------------------------|-------------------------|
| Ángulo de inserción (°) | AICH | AIGR |
| Área foliar (cm ²). Integrador | AFICH | AFIGR |
| Área foliar (cm ²). Image Tool | AFCH | AFGR |
| Longitud del peciolo (cm) | LPCH | LPGR |
| Número de nervaduras | NCH | NGR |
| Perímetro (cm) | PECH | PEGR |
| Índice de redondez | REDCH | REDGR |
| Índice de compactación | COMCH | COMGR |
| Ángulo de la tercera nervadura (°) | A3NCH | A3NGR |
| Ángulo de la quinta nervadura (°) | A5NCH | A5NGR |
| Longitud del eje mayor (cm) | LEMACH | LEMAGR |
| Longitud del eje menor (cm) | LEMECH | LEMEGR |
| Ángulo del eje mayor (°) | AEMACH | AEMAGR |
| Ángulo del eje menor (°) | AEMECH | AEMEGR |
| Elongación (cm) | ELOCH | ELOGR |
| Diámetro feret | DIFECH | DIFEGR |

Análisis estadístico

Patrones RAPDs. A partir de los patrones de bandeo generados por los productos de los iniciadores se construyó una matriz base de datos (MBD). Con la información de la MBD se calculó una matriz de similitud con el coeficiente de Jaccard (citado por Sokal y Sneath, 1963), misma que se usó para construir un dendrograma con el programa NTSYS-Pc versión 2.1 (Rohlf, 1992). Posteriormente, con la misma MBD se hicieron 1000 remuestreos con el programa FreeTree versión 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001) pa-

ra obtener un dendrograma de mayor robustez, el cual se graficó con el programa TreeView versión 1. 6. 6 (Page, 1996). Las colectas distintas provenientes de un mismo estado se consideraron como miembros de una sola población y se les hizo un análisis de poblaciones con el programa Popgen ver. 3.1 (Yeh *et al.*, 1999), y así se evaluaron las poblaciones de Nayarit, Morelos, Chiapas, Tamaulipas, Michoacán y Brasil. Los genotipos procedentes de Veracruz y Zacatecas no se analizaron debido a que no se contó con al menos dos individuos.

Caracteres morfológicos. Las variables morfológicas se seleccionaron mediante componentes principales a partir de una matriz de correlación de los datos. Con los primeros vectores propios de este análisis se determinó la importancia de los caracteres con respecto a la variabilidad de los datos, con el procedimiento PROC PRINCOMP de SAS ver. 8.0 (SAS Institute, 1999). Con las variables seleccionadas y estandarizadas se hizo un análisis de agrupamiento mediante el uso de distancias euclidianas cuadradas y la técnica de varianza mínima de Ward para la construcción del dendrograma. La altura de corte para definir los grupos se determinó con base en el criterio cúbico de agrupamiento y la T² de Hotelling (Johnson, 2000), mediante el procedimiento PROC CLUSTER y PROC TREE de SAS. Con los grupos formados en el punto anterior considerados como clases categóricas, se aplicó un análisis discriminante canónico mediante el procedimiento PROC DISCRIM de SAS, con el propósito de corroborar dichos agrupamientos y detectar las variables con mayor importancia que diferenciaran los grupos generados (Bowley, 1999). Con las variables seleccionadas y estandarizadas se realizó un segundo análisis de agrupamiento mediante el uso de distancias euclidianas cuadradas y la técnica de varianza mínima de Ward, para detectar relaciones fenotípicas entre genotipos, y se construyó el dendrograma correspondiente con el programa PROC CLUSTER y PROC TREE de SAS. Finalmente, se aplicó esta misma metodología a los datos moleculares con base en la distancia genética de Nei (1972), para obtener el dendrograma respectivo y compararlo con el generado a partir de las variables morfológicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis RAPD

Los 15 iniciadores analizados en el análisis RAPD amplificaron un total de 226 bandas, de las cuales 84.07 % mostraron polimorfismo (Cuadro 3). Este resultado supera al encontrado por Padilla *et al.* (2002), quienes de un total de 107 bandas RAPD evaluadas sólo 60 % fueron polimórficas. Los iniciadores OPA02 y OPA18 (Figuras 1A-02 y 1A-18) revelaron un polimorfismo de 41.66 y 60 %, mientras que los iniciadores OPB09 y OPB10 (Figuras 1B-

09 y 1B-10) detectaron 93.33 y 95.65 % de polimorfismo respectivamente, entre los genotipos evaluados. Lo anterior sugiere la existencia de diferencias genéticas entre los

genotipos de guayaba evaluados, que fueron colectados en distintos estados de la República Mexicana y del Brasil.

Cuadro 2. Caracteres morfológicos cualitativos evaluados en 15 genotipos de guayabo, según la lista de descriptores de la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades de Plantas (UPOV, 1987).

| Carácter | Clave para hojas chicas | Clave para hojas grandes | Escala de medición |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| Forma de la hoja | FORCH | FORGR | 1 = Redonda, 2 = Ovalada 3 = Obovada, 4 = Lanceolada 5 = Oblanceolada, 6 = Oblonga |
| Curvatura de la sección transversal | CUSTCH | CUSTGR | 3 = Débil, 5 = Media 7 = Fuerte |
| Forma de la base | FBACH | FBAGR | 1 = Obtusa, 2 = Redonda 3 = Acorazada |
| Forma del ápice | FAPCH | FAPGR | 1 = Acuminado, 2 = Apiculado, 3 = Agudo, 4 = Obtuso, 5 = Redondo |

Cuadro 3. Número de bandas amplificadas con los iniciadores de las series A y B de Operon® en 17 genotipos de guayabo.

| Iniciador | Secuencia (5'-3') | Productos amplificados | | % de polimorfismo | % de bandas monomórficas |
|-----------|-------------------|------------------------|--------------|-------------------|--------------------------|
| | | Totales | Polimórficos | | |
| A02 | TGC CGA GCT G | 12 | 5 | 41.7 | 58.3 |
| A04 | AAT CGG GCT G | 20 | 18 | 90.0 | 10.0 |
| A05 | AGG GGT CCT G | 21 | 17 | 80.9 | 19.0 |
| A07 | GAA ACG GGT G | 24 | 22 | 91.7 | 8.3 |
| A08 | GTG ACG TAG G | 12 | 9 | 75.0 | 25.0 |
| A12 | TCG GCG ATA G | 4 | 2 | 50.0 | 50.0 |
| A18 | AGG TGA CCG T | 5 | 3 | 60.0 | 40.0 |
| A19 | CAA ACG TCG G | 1 | 1 | 100.0 | 0.0 |
| B01 | GTT TCG CTC C | 21 | 18 | 85.7 | 14.3 |
| B03 | CAT CCC CCT G | 9 | 9 | 100.0 | 0.0 |
| B04 | GGA CTG GAG T | 20 | 16 | 80.0 | 20.0 |
| B05 | TGC GCC CTT C | 18 | 16 | 88.9 | 11.1 |
| B06 | TGC TCT GCC C | 21 | 18 | 85.7 | 14.3 |
| B09 | TGG GGG ACT C | 15 | 14 | 93.3 | 6.7 |
| B10 | CTG CTG GGA C | 23 | 22 | 95.6 | 4.3 |
| | | 226 | 190 | 84.1 | 16.0 |

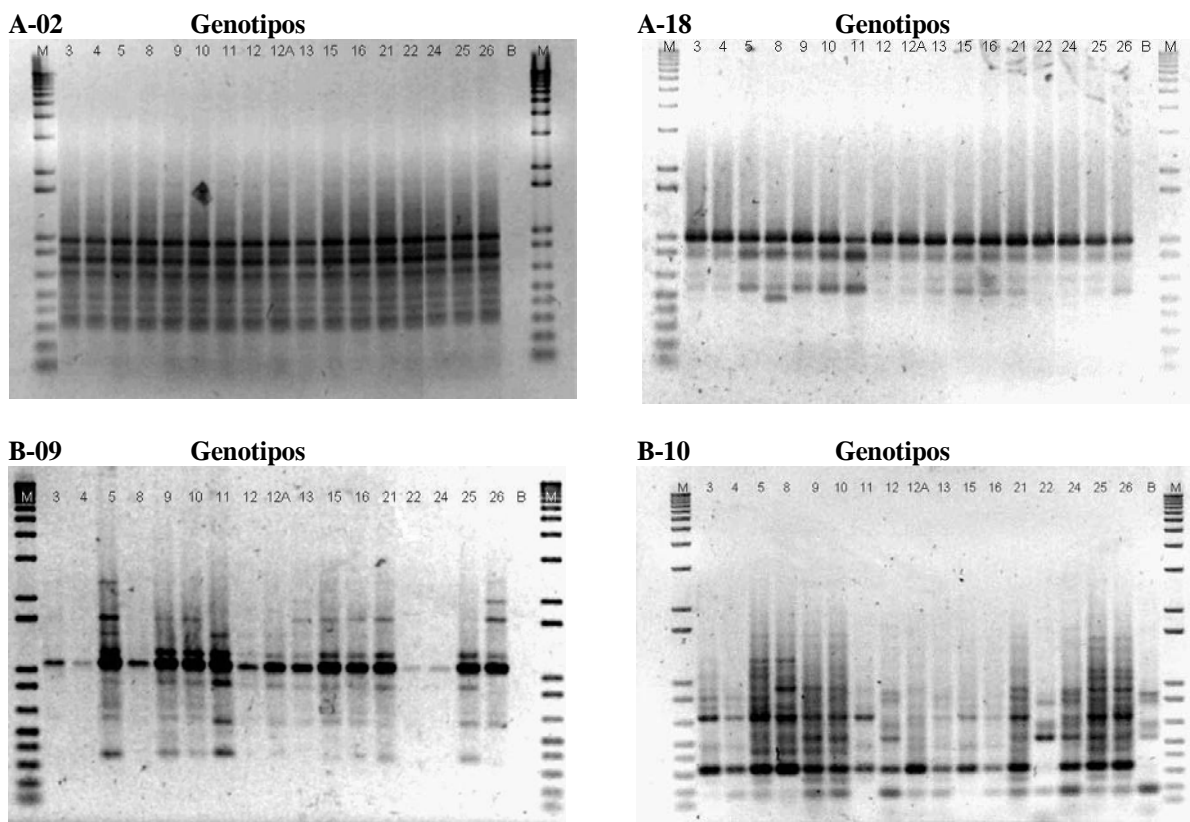


Figura 1. Amplificación de los iniciadores RAPD A-02, A-18, B-09 y B-10 en 17 genotipos de guayabo. Genotipos: 3 = NAY3, 4 = NAY4, 5 = NAY5, 8 = PAL8, 9 = MOR9, 10 = MOR10, 11 = CHI11, 12 = CVER12, 12A = CHI12A, 13 = TAM13, 15 = SASS15, 16 = SASS16, 21 = CZAC21, 22 = JROS22, 24 = CHI24, 25 = RMICH25, 26 = TTAM26. M = Marcador de peso molecular 1 kb plus; B = Blanco.

La Figura 2 muestra la robustez del agrupamiento obtenido mediante un análisis de 1000 remuestros con el programa Free Tree Ver. 0.9.1.50. El árbol de consenso obtenido corroboró los grupos formados en el dendrograma de similitud (no mostrado), e indica con ello la consistencia de los grupos detectados. Estos resultados muestran en un mismo grupo a algunos genotipos originarios de una región; tal fue el caso de NAY3 y NAY4 del grupo I, los genotipos MOR9 y MOR10 del grupo III, CHI12A y CHI24 del grupo IV, y SASS15 y SASS16 del grupo V, lo que indica que están genéticamente emparentados. Sin embargo, algunos genotipos resultaron agrupados con genotipos de otras regiones, lo que sugiere la posibilidad de flujo genético. Tal es el caso del grupo II que contiene genotipos de Nayarit y Chiapas; el grupo III que contiene dos genotipos de Morelos, uno de Zacatecas, uno de Michoacán y uno de Tamaulipas, respectivamente; el grupo IV con dos genotipos de Chiapas y uno de Veracruz; un genotipo de Tamaulipas con dos de Brasil conforman el grupo V. Los materiales JROS22 de Michoacán y PAL8 de Bra-

sil formaron grupos individuales (VII y VI, respectivamente).

Los genotipos genéticamente más alejados entre sí fueron JROS22 de Michoacán, NAY5, PAL8 y CHI11 de Nayarit, Brasil y Chiapas, respectivamente, con un valor de similitud de 41 %, mientras que los genéticamente más relacionados fueron MOR9 y MOR10 procedentes de Morelos, con 91 % de similitud. Los valores de similitud encontrados abarcaron un rango mayor al encontrado por Padilla *et al.* (2002) que fue de 88 a 97 %, lo cual muestra que los genotipos evaluados en el presente trabajo presentaron una mayor variabilidad genética entre ellos, probablemente debido a que se incluyeron genotipos procedentes de varios estados del país, así como del Brasil. En cambio, Padilla *et al.* (2002) evaluaron materiales procedentes de una sola región del país. Se puede inferir entonces que existe intercambio de genotipos entre diferentes regiones del país y entre países; dicho intercambio pudo haberse llevado a cabo mediante el transporte de semillas por aves

migratorias; sin embargo, la explicación más plausible es que los productores hayan transportado semillas o esquejes de genotipos para propagarlos.

Análisis de poblaciones

Las poblaciones genéticamente más cercanas fueron las de Chiapas y Brasil (0.88 de identidad de Nei) (Figura 3),

lo que indica que los materiales de Chiapas poseen variantes alélicas semejantes a las de los materiales brasileños; las genéticamente más alejadas fueron Morelos y Michoacán (0.72 de identidad de Nei), lo cual sugiere que entre dichas poblaciones ha existido menor intercambio genético (Figura 3).

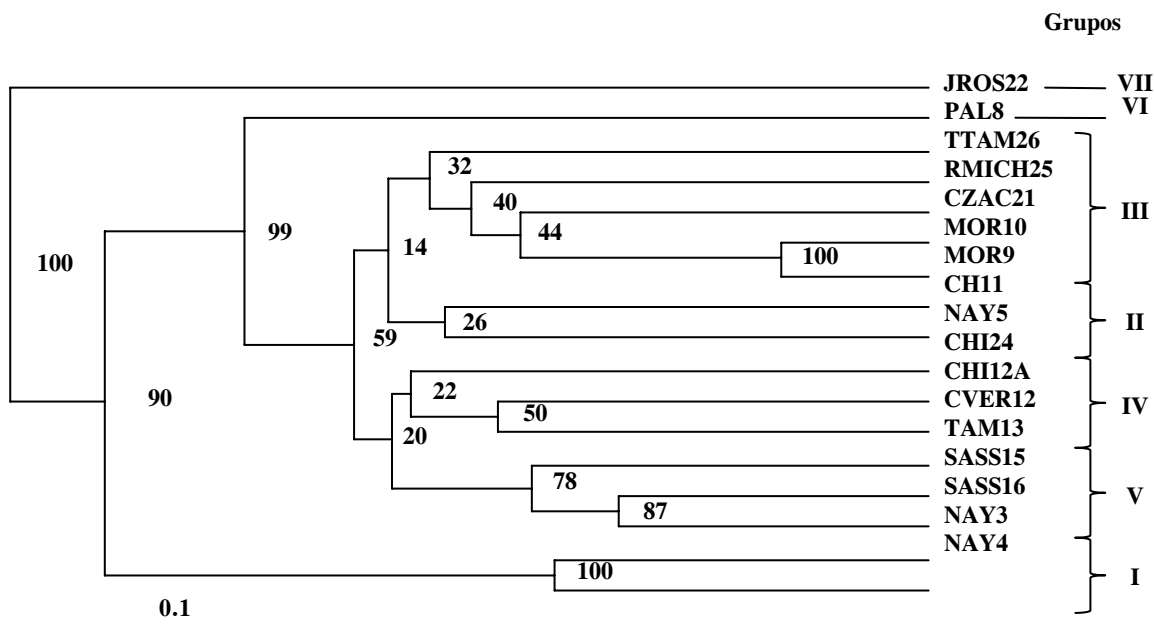


Figura 2. Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenida mediante el coeficiente de Jaccard de los productos RAPD de 17 genotipos de guayabo. Los números en las ramas indican el número de veces en porcentaje en que la topología de una rama particular se repite. Genotipos procedentes de Nayarit (NAY3, NAY4 y NAY5), Morelos (MOR9 y MOR10), Chiapas (CHI11, CHI12A y CHI24), Veracruz (CVER12), Tamaulipas (TAM13 y TTAM26), Michoacán (JROS22 y RMICH25), Zacatecas (CZAC21) y Brasil (PAL8, SASS15 y SASS16). La longitud de la línea indica una disimilitud = 0.1.

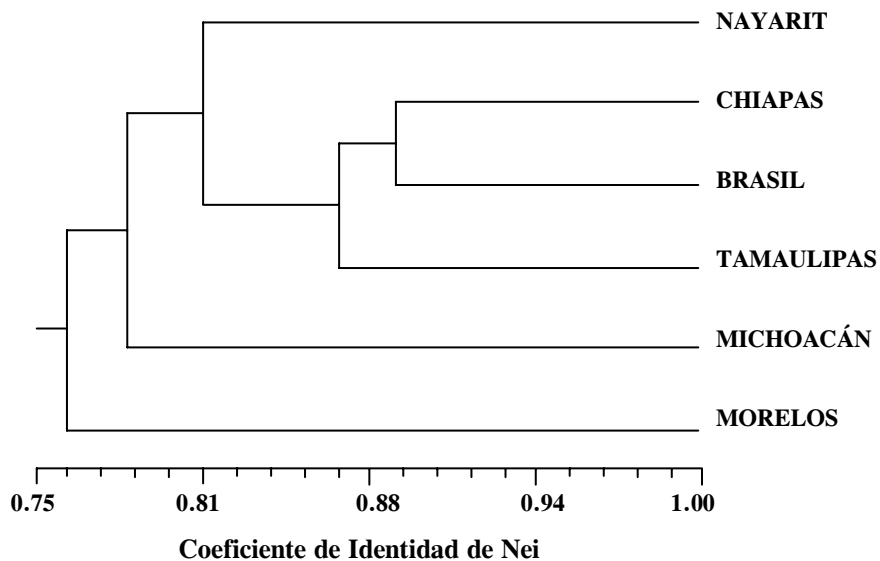


Figura 3. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones de guayabos procedentes de Brasil, Chiapas, Michoacán, Morelos, Nayarit y Tamaulipas.

El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ($G_{ST} = 0.52$) (Cuadro 4) indicó que aproximadamente 52 % de la variabilidad genética se presenta entre poblaciones y el resto (48 %) dentro de poblaciones. El grado de flujo génico (Nm) de 0.44 sugiere que existe menos de un migrante entre poblaciones por generación (Cuadro 4), lo que puede ocasionar que las poblaciones tiendan a la homogeneidad y hacerse susceptibles a cambios ambientales, plagas y enfermedades y que con el paso del tiempo desaparezcan, o bien se diferencien y formen nuevas especies.

Las poblaciones de Nayarit y Brasil presentaron el mayor porcentaje de *loci* polimórficos (43.36 %), lo cual puede indicar que con estos materiales ocurre una mayor frecuencia de intercambio de genotipos o que predomina la propagación por semilla, mientras que con los genotipos de Morelos que es la menos diversa (6.19 %) (Cuadro 4) no se ha dado con frecuencia el intercambio de materiales o se han propagado en su mayoría por hijuelos de raíz o acodo. El índice de diversidad de Nei indicó una baja diversidad tanto al nivel de especie (interpoblacional) (0.27) como intrapoblacional. El índice de Shannon que es un indicador de los cambios en la diversidad de las especies (Pla y Matteucci, 2001; Daniel, 1998), tuvo un valor de 0.41 para el total de las poblaciones, lo que revela una baja diversidad entre las poblaciones. Los valores del índice de Shannon (S) para cada población también indican una baja diversidad dentro de poblaciones.

Variables morfológicas

Componentes principales. Fueron necesarios 13 componentes principales (CP) para explicar 81 % de la variabilidad observada para las variables morfológicas evaluadas (Cuadro 5). Con la suma de los coeficientes correspon-

dientes a cada variable, se identificaron los caracteres que tuvieron la mayor contribución a la variabilidad para discriminar genotipos, que fueron: longitud de peciolo de hoja chica y de hoja grande, ángulo de la 3a nervadura de hoja chica y de hoja grande, ángulo de la 5a nervadura de hoja chica y de hoja grande, forma de hoja chica y de hoja grande, curvatura de la sección transversal de hoja chica y de la hoja grande. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Andrés *et al.* (2004) quienes al caracterizar desde el punto de vista morfométrico a hojas de nueve selecciones y ocho cultivares de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.), observaron que la longitud del peciolo y el ángulo de la quinta nervadura fueron descriptores que contribuyeron de forma importante a la variabilidad entre genotipos y presentaron un buen nivel de independencia. Por su parte, UPOV (1987) señala a la forma y curvatura de la sección transversal de la hoja como buenos descriptores para diferenciar genotipos de guayabo.

Descripción de grupos. El análisis de agrupamientos mostró que las 10 variables morfológicas seleccionadas permitieron agrupar de manera aceptable a la mayoría de las ocho repeticiones consideradas dentro del genotipo correspondiente. Tanto el análisis del criterio cúbico de agrupamiento como la T^2 de Hotelling, indicaron que los 15 genotipos estudiados podrían agruparse en siete grupos. El análisis discriminante canónico corroboró la pertinencia de los grupos sugeridos por el análisis de agrupamiento, y se identificaron las variables que tuvieron mayor importancia en la definición de éstos; dicho análisis determinó que dos funciones discriminantes canónicas describieron 93 % de la variabilidad presente en los grupos (Cuadro 6), con variación individual de 74 y 19 %.

Cuadro 4. Variabilidad genética entre y dentro de poblaciones de *Psidium guajava* L., con base en sus patrones RAPD.

| Parámetro genético | Población | | | | | | | M | S |
|--------------------|-----------|---------|---------|------------|-----------|--------|------|------|---|
| | Nayarit | Morelos | Chiapas | Tamaulipas | Michoacán | Brasil | | | |
| p | 43.4 | 6.2 | 39.4 | 25.2 | 38.9 | 43.4 | 32.7 | 14.6 | |
| A | 1.4 | 1.1 | 1.4 | 1.2 | 1.4 | 1.4 | 1.3 | 0.1 | |
| Ae | 1.2 | 1.0 | 1.3 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | 0.1 | |
| S | 0.2 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | |
| H | 0.1 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | |
| G_{ST} | | | | | | | | 0.5 | |
| Nm | | | | | | | | 0.4 | |
| N_{loci} | 226 | 226 | 226 | 226 | 226 | 226 | | | |

P = % de *loci* polimórficos; A = Número de alelos por locus; Ae = Número efectivo de alelos por locus; S = Índice de Shannon; H = Diversidad genética de Nei (1973); G_{ST} = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; Nm = Grado de flujo génico; N_{loci} = Número de *loci*; M = Media; S = Desviación estándar.

Cuadro 5. Valores propios y proporción explicada de 13 componentes principales, obtenidos a partir de 40 variables morfológicas de guayabo.

| CP | Valor propio | Diferencia | Proporción | Proporción acumulada |
|----|--------------|------------|------------|----------------------|
| 1 | 7.40 | 2.28 | 0.19 | 0.19 |
| 2 | 5.12 | 1.51 | 0.13 | 0.31 |
| 3 | 3.61 | 0.62 | 0.09 | 0.40 |
| 4 | 2.99 | 0.80 | 0.07 | 0.48 |
| 5 | 2.20 | 0.23 | 0.05 | 0.53 |
| 6 | 1.97 | 0.17 | 0.05 | 0.58 |
| 7 | 1.79 | 0.21 | 0.04 | 0.63 |
| 8 | 1.59 | 0.22 | 0.04 | 0.67 |
| 9 | 1.36 | 0.18 | 0.03 | 0.70 |
| 10 | 1.19 | 0.04 | 0.03 | 0.73 |
| 11 | 1.14 | 0.06 | 0.03 | 0.76 |
| 12 | 1.08 | 0.10 | 0.03 | 0.79 |
| 13 | 0.98 | 0.08 | 0.02 | 0.81 |

CP = Componente principal.

Cuadro 6. Valores propios de funciones discriminantes canónicas de siete grupos de genotipos de guayabo.

| Variable discriminante | Valor propio | Proporción | Proporción acumulada |
|------------------------|--------------|------------|----------------------|
| VDC1 | 7.58 | 0.74** | 0.74 |
| VDC2 | 1.95 | 0.19** | 0.93 |
| VDC3 | 0.45 | 0.07 | 1.00 |

VDC1, VDC2, VDC3 = Variables discriminantes canónicas 1, 2, 3, respectivamente.

**= Diferente de cero, con $\alpha \leq 0.01$

La estructura total canónica que representa a las correlaciones lineales entre las funciones discriminantes generadas con las medias de las 10 variables seleccionadas, determinó que la variable discriminante canónica 1 (VDC1) tuvo mayor asociación positiva con los caracteres ángulo de la 3a nervadura hoja chica, ángulo de la 5a nervadura hoja chica y curvatura de la sección transversal hoja chica, y asociación negativa con longitud de peciolo hoja chica, longitud de peciolo hoja grande y forma de hoja grande. Es decir, valores altos de VDC1 representan a genotipos con mayor expresión de ángulo de la 3a nervadura hoja chica, ángulo de la 5a nervadura hoja chica y curvatura de la sección transversal hoja chica y valores bajos de longitud de peciolo hoja grande, longitud de peciolo hoja chica y forma de hoja grande (Cuadro 7). Respecto a la VDC2, los caracteres con los que tuvo mayor asociación positiva fueron ángulo de la tercera nervadura hoja grande y ángulo de la 5a nervadura hoja grande, y asociación negativa con forma de hoja grande y curvatura de la sección transversal hoja chica.

Cuadro 7. Estructura canónica de variables discriminantes canónicas definidas a partir de genotipos de guayabo.

| Variable | Coeficiente canónico | |
|---------------------------------------|----------------------|--------|
| | Can 1 | Can 2 |
| Longitud del peciolo hoja chica | -0.193 | 0.209 |
| Longitud del peciolo hoja grande | -0.154 | 0.107 |
| Angulo 3ª nervadura hoja chica | 0.329 | 0.615 |
| Angulo 3ª nervadura hoja grande | 0.271 | 0.631 |
| Angulo 5ª nervadura hoja chica | 0.395 | 0.301 |
| Angulo 5ª nervadura hoja grande | 0.185 | 0.839 |
| Forma de la hoja chica | 0.006 | -0.861 |
| Forma de la hoja grande | -0.165 | -0.033 |
| Curva sección transversal hoja chica | 0.454 | -0.340 |
| Curva sección transversal hoja grande | -0.180 | -0.247 |

La Figura 4 presenta las variables discriminantes con base en las medias por genotipos. El cuadrante I que separa a los genotipos con mayores ángulo de la 3a nervadura hoja chica, ángulo de la tercera nervadura hoja grande, ángulo de la 5a nervadura hoja chica y ángulo de la 5a nervadura hoja grande, agrupa a los genotipos NAY3, NAY4, NAY5, PAL8, MOR9, MOR10, SASS15, SSAS16, CHI12A y TAM13. Ocho de estos diez genotipos están agrupados por su lugar de origen: Nayarit, Morelos, Brasil, Chiapas y Tamaulipas, respectivamente; los genotipos CHI12A y TAM13 se salen del agrupamiento por origen pero comparten características morfológicas similares al resto de los genotipos del cuadrante I. El cuadrante II corresponde a genotipos con hojas grandes y chicas con menor longitud de peciolo y forma de la hoja grande obovada, e incluye a los genotipos JROS22, CHI24 y RMICH25, donde dos de ellos coinciden en lugar de origen, en este caso Michoacán; el genotipo CHI24 que

proviene de Chiapas comparte características fenotípicas similares a los otros dos genotipos. El cuadrante III está definido por hojas grandes con curvatura media de la sección transversal, dentro del cual sólo se ubica el genotipo CZAC21 proveniente de Zacatecas, características que no compartió con los genotipos restantes, por lo que formó un grupo de un individuo. Situación similar ocurrió en el cuadrante IV definido por los caracteres hojas chicas ovoides con curvatura pronunciada de la sección transversal, donde sólo el genotipo TTAM26 de Tamaulipas presentó dichas características.

Agrupamiento de genotipos por caracteres morfológicos. El dendrograma de la Figura 5 muestra la formación de siete grupos, lo cual coincide con el número de grupos predichos según el análisis de agrupamiento que considera todas las repeticiones. En el grupo I se encuentran los genotipos NAY3, NAY4 y NAY5 procedentes de Nayarit; el grupo II está conformado por el genotipo brasi-

leño PAL8; el grupo III contiene a los genotipos SASS15 y SASS16, mientras que el grupo IV engloba a los genotipos MOR9, MOR10, CZAC21 y RMICH25 procedentes de Morelos, Zacatecas y Michoacán, respectivamente. El grupo V incluyó los genotipos CHI24 de Chiapas y TAM13 de Tamaulipas; el grupo VI se formó con los genotipos CHI12A de Chiapas y TTAM26 de Tamaulipas. Finalmente, el genotipo JROS22 de Michoacán formó el grupo VII.

Los grupos I, III y IV incluyeron genotipos procedentes del mismo lugar de origen, que además fueron semejantes en características morfológicas. No obstante, el grupo IV además de incluir a los genotipos MOR9 y MOR10, agrupó a genotipos procedentes de otros estados de la República Mexicana, lo que puede deberse al intercambio de material genético. Los grupos V y VI presentaron un menor grado de concordancia en relación al lugar de origen de los

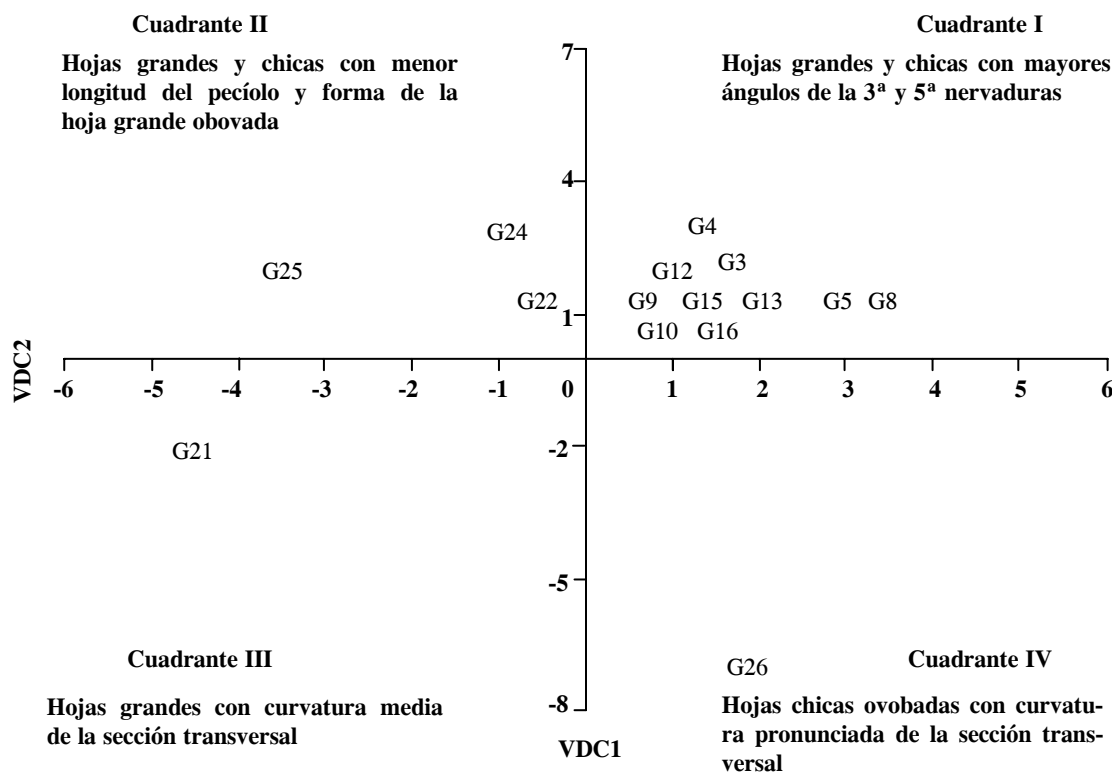


Figura 4. Representación gráfica de variables discriminantes para medias de quince genotipos de guayabo. Donde: G3 = NAY3, G4 = NAY4, G5 = NAY5, G8 = PAL8, G9 = MOR9, G10 = MOR10, G12 = CHI12A, G13 = TAM13, G15 = SASS15, G16 = SASS16, G21 = CZAC21, G22 = JROS22, G24 = CHI24, G25 = RMICH25 y G26 = TTAM26.

genotipos, ya que contienen a los genotipos de Chiapas y Tamaulipas. Estos resultados nuevamente sugieren la existencia de intercambio de genotipos de una región a otra. El material brasileño PAL8 y el JROS22 de Michoacán fueron morfológicamente muy diferentes al resto de los genotipos evaluados, por lo que formaron grupos individuales.

Análisis de agrupamiento de caracteres morfológicos vs. moleculares. Los dendrogramas generados a partir de caracteres morfológicos (Figura 5) y marcadores moleculares tipo RAPD (Figura 6) mostraron similitud en los agrupamientos dado que ambos forman siete grupos en general, tres de ellos bien diferenciados según el origen de los genotipos. De los genotipos destacan los brasileños SASS15 y SASS16, los de Morelos MOR9 y MOR10, y los genotipos NAY3 y NAY4 de Nayarit. Aunque en el dendrograma construido con datos morfológicos los tres genotipos de Nayarit formaron un sólo grupo, en el dendrograma construido con datos RAPD (Figura 6) el genotipo NAY5 formó un grupo aparte con el PAL8 de Brasil, por lo que estos genotipos deben compartir información genética.

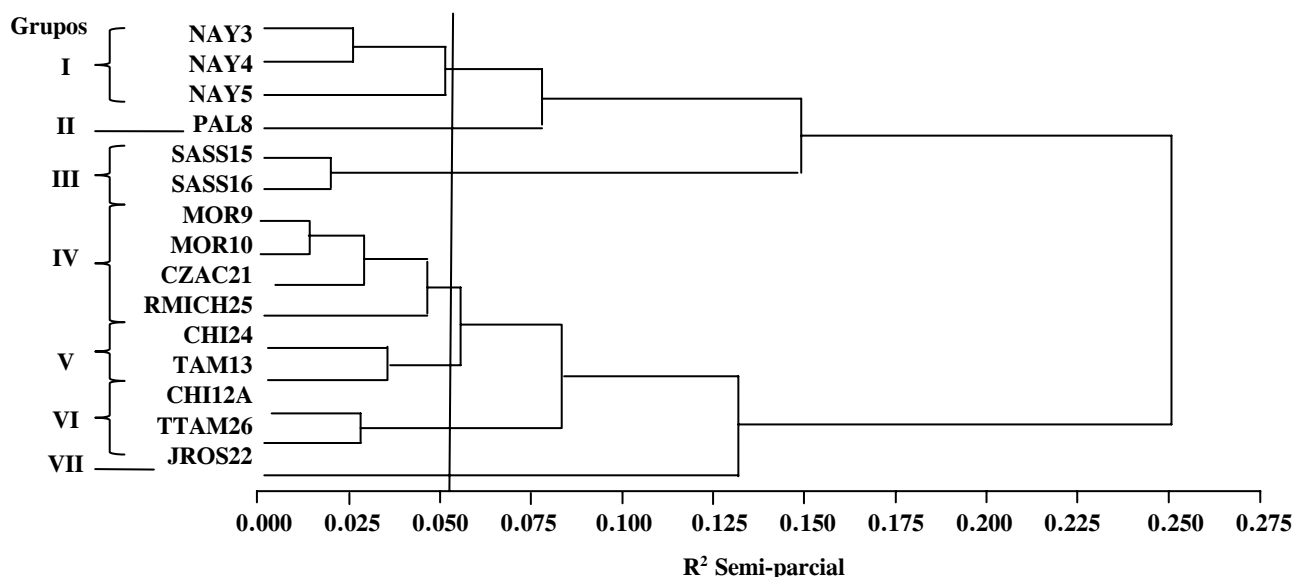


Figura 5. Dendrograma de 15 genotipos de guayabo construido a partir de caracteres morfológicos mediante el método de agrupamiento de Ward usando la R^2 semi-parcial calculada a partir de distancias euclidianas.

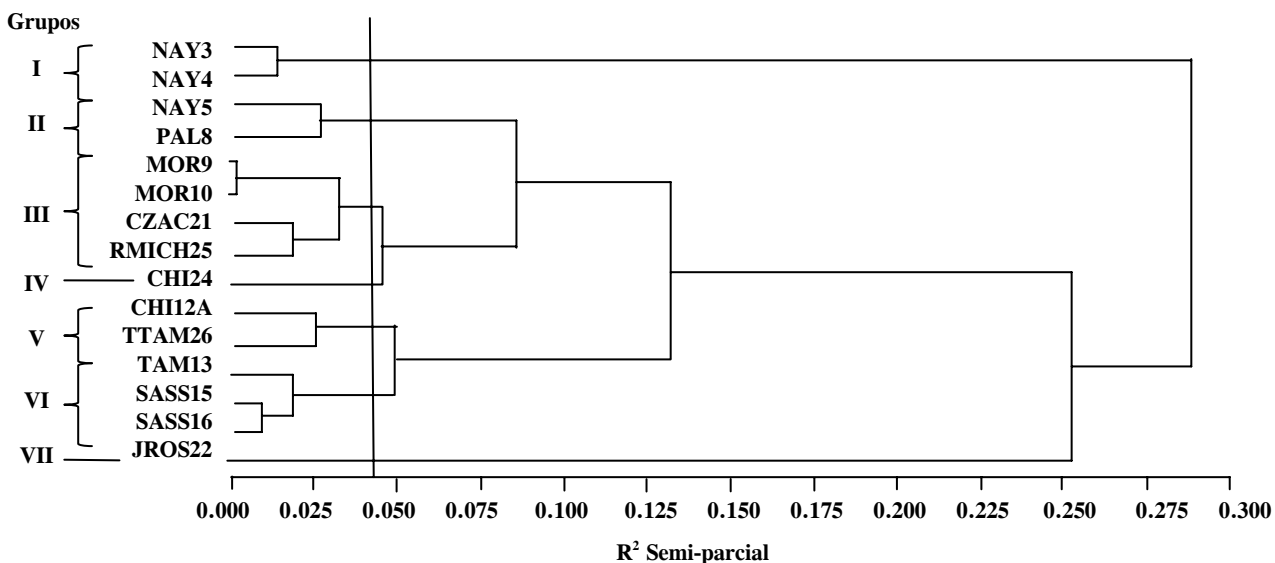


Figura 6. Dendrograma construido mediante el método de agrupamiento de Ward usando la R^2 semi-parcial generada por patrones de bandas RAPD obtenido de 15 genotipos de guayabo. Genotipos procedentes de Nayarit (NAY3, NAY4 y NAY5), Morelos (MOR9 y MOR10), Chiapas (CHI12A y CHI24), Tamaulipas (TAM13 y TTAM26), Michoacán (JROS22 y RMICH25), Zacatecas (CZAC21) y Brasil (PAL8, SASS15 y SASS16).

Tanto en el dendrograma morfológico como en el molecular, se observa que la mayoría de los genotipos tendieron a agruparse con genotipos del mismo lugar de origen. También se observa que genotipos procedentes de Tamaulipas y Chiapas formaron un grupo, probablemente debido a que comparten cierto grado de información genética que los hace molecularmente muy parecidos y que además, se expresan morfológicamente de manera muy similar.

Aún cuando las relaciones genéticas determinadas a partir de marcadores moleculares deben ser más confiables debido a que no interactúan con el ambiente, los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que los caracteres morfológicos evaluados generaron agrupamientos semejantes a los generados por marcadores moleculares, por lo que en este caso resultaron ser igualmente confiables.

CONCLUSIONES

La mayoría de los cultivares de guayabo procedentes de la misma región tendieron a agruparse juntos, pero algunos formaron parte de otros grupos lo que probablemente se deba al intercambio de material genético entre regiones de México y del Brasil. Diez variables morfológicas utilizadas para diferenciar los cultivares permitieron formar grupos semejantes a los obtenidos mediante los marcadores moleculares, por lo que ambos métodos podrían considerarse confiables y utilizarse en estudios posteriores para diferenciar cultivares de guayabo.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrés A J, R Nieto, A F Barrientos, M T Martínez, A F González, L S Segura, C J Cruz, C V Gallegos (2004)** Variación morfológica de la hoja del chirimoyo. *Rev. Chapingo S. Hort.* 10:103-110.
- Bowley R S (1999)** *A Hitchhiker's Guide to Statistics in Plant Biology*. Ampersand Printing. Guelph, Ontario, Canada. pp:193-221.
- Daniel O (1998)** Subsídios al uso del índice de diversidad de Shannon. *In: Congreso Latinoamericano IUFRO*, 1. Yema 3, CD-ROM. Valdivia, Chile. pp:1-10.
- De la Cruz M, F Ramírez, H Hernández (1997)** DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 319-325.
- González G E, R J Padilla S, M L Reyes, M A De la C, V F Esquivel (2002)** Guayaba: su Cultivo en México. Libro Técnico No. 1. Campo Experimental Pabellón. INIFAP-SAGARPA, Pabellón, México. 182 p.
- Hapl V, A Pavlíček, J Flegr (2001)** Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *Internatl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:731-735.
- Hernández D S, J de L Martínez, J S Padilla R, N Mayek P (2003)** Diversidad genética de *Psidium sp* en la Región Calvillo-Cañones, México. *In: Memoria 1er Simp. Internal. de Guayaba*. S Padilla R, L Reyes M, E González G, MA Perales C (eds). Aguascalientes, México. pp:71-83.
- Johnson D E (2000)** *Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos*. Internacional Thompson Editores S. A. de C. V. México. 566 p.
- Martínez de Lara J, L M Barrientos C, M L Reyes, D S Hernández, J S Padilla R, N Mayek P (2004)** Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes. *Rev. Fitotec. Mex.* 27:243-249.
- Nei M (1972)** Genetic distance between populations. *In: NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1)*. F J Rohlf (ed). State University of New York, New York. pp:1-25.
- Padilla R J S, G E González, V F Esquivel, S E Mercado, D S Hernández, N Mayek P (2002)** Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 393-399.
- Padilla R J S, G E González, M L Reyes, M A De la C, S E Mercado, N Mayek P (2003)** Caracterización de germoplasma de guayabo de la Región Calvillo-Cañones. *In: Memorias Primer Simposio Internacional de la Guayaba*. S Padilla R J, L Reyes M, E González G, A Perales M (eds). Aguascalientes, México. pp:54-70.
- Page R D M (1996)** Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Applic. Biosci.* 12:357-358.
- Picca A, M Helguera, N Salomón, A Carrera (2002)** Marcadores moleculares. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. V Echenique, C Rubinstein, L Mroginski (eds). INTA, Rivadavia. Buenos Aires, Argentina. pp:61-68.
- Pla L, S D Matteucci (2001)** Intervalos de confianza bootstrap del índice de biodiversidad de Shannon. *Rev. Fac. Agron (Luz)* 18:222-234.
- Prakash D P, P Narayanaswamy, S N Sondur (2002)** Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *J. Hort. Sci. Biotech.* 77:287-293.
- Rohlf F J (1992)** *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1)*. State University of New York, New York. pp:1-30.
- SAGARPA (2004)** Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Versión 1.1 SAGARPA. pp:3-10.
- SAS (1999)** *Statistics Analysis System for Windows version 8*. SAS Institute, Inc. Cary, N. C. USA. pp:1-40.
- Sokal R R, P H A Sneath (1963)** *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco. 359 p.
- UPOV (1987)** Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability. Guava (*Psidium guajava* L.). Geneva, Switzerland. 27 p.
- Wilcox D, B Dove, D Mc David, D Greer (2002)** Image Tool for Windows ver. 3.0. University of Texas Health Science Center in San Antonio, USA. pp:1-30.
- Yeh F C, R C Yang, T I Boyle (1999)** Popgene ver. 1.3. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Alberta, Canada. 28 p.