

## Variación genética en guayaba mediante RAPDs y descriptores morfológicos en Calvillo, Aguascalientes\*

### Genetic variation in guava using RAPDs and morphological descriptors in Calvillo Aguascalientes

Luis Lorenzo Valera-Montero<sup>1§</sup>, Adriana Hernández-Dávila<sup>1</sup>, Héctor Silos-Espino<sup>1</sup> y Silvia Flores-Benítez<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Instituto Tecnológico El Llano. Carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, km 18. Aguascalientes, México. CP. 20330. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: lvalera2003@gmail.com y sfbenitez@gmail.com.

#### Resumen

Se muestrearon frutos y hojas de 140 árboles seleccionados al azar de guayaba procedentes de igual número de huertas de Calvillo Aguascalientes en el periodo 2012-2013 con el fin de obtener marcadores moleculares tipo RAPD y compararlos con descriptores morfológicos de fruto y hojas de los individuos seleccionados mediante fenogramas. La similitud encontrada para los datos de morfología va de 87 a 100%, en tanto, la similitud para los datos de RAPD osciló entre 25 y 100%. A las cinco clades principales generadas con los datos de morfología de fruto y hoja, no fue posible asociarles con las bandas generadas mediante RAPD. Por lo tanto, los análisis de ambos tipos de datos fueron realizados por separado. Aun así, se considera que la técnica RAPD puede ser utilizada para caracterizar genotipos de guayaba sobresalientes que pueden ser útiles en los programas de mejoramiento genético asistido de esta especie en México. No se descarta el caso de tener huertas con un aceptable grado de uniformidad para efecto de tener un perfil genético reconocible que puede llevar a dictaminar la autenticidad del origen de los frutos de dicha huerta.

#### Abstract

The fruits and leaves of 140 randomly selected guava trees from the same number of orchards of Calvillo, Aguascalientes were sampled in the period 2012-2013 in order to obtain RAPD type molecular markers and to compare them with fruit and leaves morphological descriptors of selected individuals by phenograms. The similarity found for the morphology data ranges from 87 to 100%, while the similarity for the RAPD data ranged from 25 to 100%. To the five main clades generated with the data of fruit and leaf morphology, it was not possible to associate them with the bands generated by RAPD. Therefore, analyzes of both types of data were performed separately. Even so, it is considered that the RAPD technique can be used to characterize outstanding guava genotypes that may be useful in the assisted genetic improvement programs of this species in Mexico. The case of having orchards with an acceptable degree of uniformity is not ruled out in order to have a recognizable genetic profile that can lead to the authenticity of the origin of the fruits of the orchard.

\* Recibido: febrero de 2017  
Aceptado: marzo de 2017

**Palabras clave:** *Psidium guajava*, diversidad genética, guayaba, RAPD.

**Keywords:** *Psidium guajava*, genetic diversity, guava, RAPD.

## Introducción

La guayaba (*Psidium guajava*, L.) es una fruta de importancia nacional, pues está integrada a la dieta del mexicano tanto como fruta fresca o sus derivados en forma de dulces regionales, mermeladas, galletas y licores, que además son exportados a los mercados latinos en el extranjero (Varela, 2010). En México se cultivan 20 899 ha de este frutal, de las cuales 30% pertenecen a huertos ubicados en el estado de Aguascalientes. De igual manera a nivel nacional se producen 302 719 t, de las cuales el 32% son producidas en dicho estado (SIAP, 2015). Estos datos de producción nacional colocan a México como el tercer productor de guayaba después de la India y Pakistán (Grattapaglia *et al.*, 2012; Quesada *et al.*, 2005) y a Aguascalientes como uno de los estados que más contribuyen conjuntamente con Michoacán. De la producción nacional, el 95% (288 670.85 t) se ha reportado del tipo “Media china” (SIAP, 2015).

La zona productora de Aguascalientes se ubica en el municipio de Calvillo y colinda con El Cañón de Juchipila del estado de Zacatecas. Esta zona en su conjunto se ha denominado “Calvillo-Cañones” y es una área compacta con gran importancia a nivel nacional en la producción de este frutal (Padilla *et al.*, 2002). En dicho municipio se han reportado más de 400 huertos por parte del “Consejo Nacional Mexicano de la guayaba”, de los cuales la mayoría se encuentra en el rango de 0 a 3 hectáreas (SAGARPA, 2012).

Los genotipos considerados de origen local por los productores son compartidos en áreas vecinas de Zacatecas, conformando una región conocida como “Calvillo-Cañones” (Padilla *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2007; Perales *et al.*, 2005). Los frutos producidos en esta región tienen la reputación de ser los de mejor calidad a nivel nacional a pesar de que se ha observado que en campo existe variabilidad en los caracteres tales como forma de fruto, grosor del mesocarpio, color, tamaño y propiedades organolépticas que tienen influencia en el mercado nacional y recientemente internacional. No obstante, es precisamente esta calidad percibida de la guayaba de Calvillo la que ha impulsado a los productores locales a buscar una forma de impedir que frutos de otra procedencia sean etiquetados como si fuesen producidos en esta región.

## Introduction

The guava (*Psidium guajava*, L.) is a fruit of national importance, since it is integrated into the Mexican diet as much as fresh fruit or its derivatives in the form of regional sweets, jams, biscuits and liqueurs, which are also exported to markets latinos abroad (Varela, 2010). In Mexico 20 899 ha of this fruit are cultivated, of which 30% belong to orchards located in the state of Aguascalientes. Similarly, at the national level, 302 719 tonnes are produced, of which 32% are produced in that state (SIAP, 2015). These national production data place Mexico as the third largest guava producer after India and Pakistan (Grattapaglia *et al.*, 2012; Quesada *et al.*, 2005) and Aguascalientes as one of the states that contribute most to Michoacán of the national production, 95% (288 670.85 tons) has been reported as “China’s average” (SIAP, 2015).

The producing area of Aguascalientes is located in the municipality of Calvillo and adjoins The Cañón of Juchipila in the state of Zacatecas. This area as a whole has been called “Calvillo-Cañones” and is a compact area with great national importance in the production of this fruit (Padilla *et al.*, 2002). In this municipality, more than 400 orchards have been reported by the Mexican National Guava Council, of which the majority is in the range of 0 to 3 hectares (SAGARPA, 2012).

The genotypes considered to be of local origin by the producers are shared in neighboring areas of Zacatecas, forming a region known as “Calvillo-Cañones” (Padilla *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2007; Perales *et al.*, 2005). The fruits produced in this region have the reputation of being of the best quality at national level although it has been observed that in the field there is variability in the characters such as fruit shape, thickness of the mesocarp, color, size and organoleptic properties that have influence in the national market and recently international. However, it is precisely this perceived quality of Calvillo guava that has prompted local producers to seek a way to prevent fruits of another origin from being labeled as if produced in this region.

Esta consideración sugiere la implementación de un método para la identificación de la “huella digital” de los frutos basándose en marcadores moleculares tales como Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), (Randomly Amplified Polymorphic (RAPD DNAs), (Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), (Single Nucleotide Polymorphism (SNP) y (Simple Sequence Repeats (SSR). Este tipo de marcadores son utilizados para la detección de polimorfismos en la cadena de ADN, que pueden ayudar a identificar genotipos, a establecer distancias genéticas entre genotipos silvestres, mejorados, cruza o poblaciones. Además se considera como una herramienta útil en el mejoramiento asistido (Provan *et al.*, 1999; Chandra y Mishra, 2007; ISAAA, 2015).

En el caso específico de guayaba, se han realizado pruebas de marcadores tipo Inter Simple Sequence Repeats (SSR e ISSR), arrojando resultados confiables sobre patrones monomórficos en plantas derivadas de embriogénesis somática, de las cuales se esperaba homogeneidad genética (Liu y Yang, 2012; Rai *et al.*, 2012). Otro uso de los marcadores SSR ha sido la evaluación de la diversidad genética en guayaba silvestre de Brasil, o la identificación de géneros *Psidium*, *Zyzygium* y *Eugenia* en estudios de diversidad de la familia Myrtaceae (Nogueira *et al.*, 2012; Valdés *et al.*, 2012a). Una nueva manera de evaluar la diversidad genética con marcadores con base en los sitios conservados de unión de retrotransposones o Inter Primer Binding Sites (iPBS) ha sido recientemente utilizada en guayaba (Mehmood *et al.*, 2013).

Otras técnicas como RFLP combinado con Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) se han considerado como menos eficientes y más tardadas comparadas contra técnicas que utilizan secuencias específicas de rDNA como blanco (18S and ITS) y cpDNA (trnL intron and trnL-trnF IGS). No obstante, mediante la técnica RAPD que es aún más simple que las anteriores y con el uso de cebadores OPB17, OPG6, OPY15 y OPY18 ha sido posible obtener patrones de alto nivel de polimorfismo que han sido útiles en la discriminación de variedades cultivadas de guayaba (Tseng-Wei *et al.*, 2007). RAPDs también ha sido útil en la discriminación de 33 genotipos de guayaba de Bangladesh diferenciados en dos principales grupos que reflejan principalmente las características morfológicas de los niveles de domesticación de las variedades presentes (Ahmed *et al.*, 2011).

This consideration suggests the implementation of a method for identifying the “fingerprint” of fruits based on molecular markers such as Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) (Randomly Amplified Polymorphic (RAPD DNAs), (Restriction Fragment Length Polymorphisms), (Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and (Simple Sequence Repeats (SSRs). This type of markers used for the detection of polymorphisms in the DNA strand, which can help identify genotypes, to establish genetic distances between wild, improved genotypes, crosses or populations. It is also considered as a useful tool in assisted improvement (Provan *et al.*, 1999; Chandra and Mishra, 2007; ISAAA, 2015).

In the specific case of guava, tests of Inter Simple Sequence Repeats (SSR and ISSR) were performed, yielding reliable results on monomorphic patterns in plants derived from somatic embryogenesis, from which genetic homogeneity was expected (Liu and Yang, 2012; Rai *et al.*, 2012). Another use of SSR markers has been the evaluation of genetic diversity in brazilian wild guava, or the identification of genera *Psidium*, *Zyzygium* and *Eugenia* in studies of diversity of the family Myrtaceae (Nogueira *et al.*, 2012; Valdés *et al.*, 2012a). A new way to assess genetic diversity with markers based on conserved retrotransposon binding sites or Inter Primer Binding Sites (iPBS) has recently been used in guava (Mehmood *et al.*, 2013).

Other techniques such as RFLP combined with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) have been considered less efficient and later compared against techniques using specific rDNA sequences such as target (18S and ITS) and cpDNA (trnL intron and trnL-trnF IGS). However, using the RAPD technique which is even simpler than the above and with the use of primers OPB17, OPG6, OPY15 and OPY18 it has been possible to obtain high level polymorphism patterns which have been useful in discriminating cultivated varieties of guava (Tseng-Wei *et al.*, 2007). RAPDs have also been useful in discriminating 33 Bangladeshi guava genotypes differentiated into two major groups that primarily reflect the morphological characteristics of the domestication levels of the present varieties (Ahmed *et al.*, 2011).

It is clear that environmental conditions are not reliable indicators *per se* of genotype expression (Kujal *et al.*, 2005). Therefore, the objective of this research was to analyze the pattern of molecular markers against the

Es evidente que las condiciones ambientales no son indicadores confiables *per se* de la expresión genotípica (Kujal *et al.*, 2005). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue analizar el patrón de los marcadores moleculares contra el patrón de variación morfológica de las plantas analizadas en los diferentes genotipos encontrados en las huertas de Calvillo, Aguascalientes. Se espera que los resultados sean de utilidad en los programas de mejoramiento de guayaba en México.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y su descripción morfológica

Muestras y fotografías de fruto y de hoja fueron colectadas durante el periodo 2012-2013 seleccionando de manera aleatoria un árbol por huerta en 140 de las 423 huertas reportadas para el área de producción de guayaba en Calvillo, Aguascalientes (SAGARPA, 2012). La morfología de fruto y de hoja fue descrita de acuerdo a las clasificaciones establecidas por la UPOV (1987) y complementados con otras descripciones (Sánchez y Peña, 2011; Sanabria, 2005). En total se utilizaron ocho descriptores morfológicos para fruto: peso, tamaño, diámetro ecuatorial, número de carpelos, forma, forma del ápice, forma de la base y forma de la cavidad. Para hoja: longitud, ancho, forma (de la hoja completa), forma del ápice y forma de la de la base. Para los datos cuantitativos se establecieron rangos de clasificación en categorías descriptivas tales como “pequeño”, “medio” y “grande”; o etiquetas de tipo ordinal de acuerdo al caso (Cuadro 1).

### Extracción de ADN genómico

Las hojas colectadas fueron la fuente del ADN, extrayéndolo mediante el método de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones. El método consistió en moler 100 mg de hoja limpias con mortero y nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó en un tubo para microcentrifuga que contenía 750  $\mu$ L de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA pH 8; 2% CTAB; 2M NaCl, 2% PVP 40; 3%  $\beta$ -mercaptoetanol) precalentado a 65 °C y se agitó durante tres minutos. Posteriormente se añadió un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando cuidadosamente durante cinco min para pasar a una centrifugación de 15 min a 13 000 rpm.

pattern of morphological variation of the plants analyzed in the different genotypes found in the gardens of Calvillo, Aguascalientes. The results are expected to be useful in guava improvement programs in Mexico.

## Materials and methods

### Plant material and its morphological description

Samples and photos of fruit and leaf were collected during the period 2012-2013 by randomly selecting one tree per orchard in 140 of the 423 gardens reported for the guava production area in Calvillo, Aguascalientes (SAGARPA, 2012). The fruit and leaf morphology was described according to the classifications established by UPOV (1987) and supplemented with other descriptions (Sánchez and Peña, 2011; Sanabria, 2005). In total, eight morphological descriptors were used for fruit: weight, size, equatorial diameter, number of carpels, shape, apex shape, base shape and cavity shape. For leaf: length, width, shape (of the complete leaf), apex shape and shape of the base. For the quantitative data, classification ranks were established in descriptive categories such as “small” , “medium” and “large”; or ordinal type labels according to the case (Table 1).

### Extraction of genomic DNA

The collected leaves were the source of the DNA, extracting it by the method of Doyle and Doyle (1990) with some modifications. The method consisted of grinding 100 mg of clean sheet with mortar and liquid nitrogen. The powder obtained was placed in a microcentrifuge tube containing 750  $\mu$ l lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA pH 8; 2% CTAB; 2M NaCl, 2% PVP 40; 3%  $\beta$ -mercaptoethanol) preheated to 65 °C and stirred for three minutes. Subsequently, a volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was added, carefully mixing for five minutes to pass a 15 min centrifugation at 13 000 rpm.

The aqueous phase was transferred to a new tube and a volume of chloroform-isoamyl alcohol was added, repeating the above procedure. Once the supernatant was taken into a new tube, 5  $\mu$ L of RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>) was added and incubated for 30 min at 37 °C.

**Cuadro 1. Caracteres morfológicos de hoja y fruto observados en las huertas de Calvillo.**  
**Table 1. Morphological characters of leaf and fruit observed in the gardens of Calvillo.**

Órgano	Características morfológicas	Categorías		
Hoja desarrollada	Forma	Elíptica	Trapezoide	
	Largo (mm)	Pequeño (<66)	Medio (66-96)	Grande (>96)
	Ancho (mm)	Estrecho (<34)	Medio (34-46)	Amplio (>46)
	Base	Redonda	Aguda	
	Ápice	Redondo	Agudo	
Fruto maduro	Peso de fruto (g)	Pequeño (<40)	Medio (40-70)	Grande (>70)
	Diámetro polar (mm)	Estrecho (<46)	Medio (46-61)	Amplio (>61)
	Diámetro ecuatorial (mm)	Estrecho (<34)	Medio (34-44)	Amplio (>44)
	Grosor de mesocarpio (mm)	Angosto (<7)	Ancho (≥7)	
	Color de pulpa	Blanco	Crema	
	Número de carpelos	4	5	
	Diámetro de pulpa (mm)	Estrecho (<25)	Medio (25-33)	Amplio (>33)
	Forma del fruto	Esférico, globoso	Piriforme	Elipsoide
	Forma del ápice	Cóncavo	Con ombligo	
	Forma de la base	Con cuello	Cóncavo	Convexo con cuello
	Cavidad en la inserción del peciolo	Ausente	Ligera	Profunda

La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, repitiendo el proceso anterior. Una vez teniendo el sobrenadante en un nuevo tubo, se le agregó 5 µL de RNasa (10 mg mL<sup>-1</sup>) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Se añadió un volumen de isopropanol frío, se incubó por 10 min a -20 °C y se centrifugó por 10 min a 13 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70% agitando con vortex. Después de centrifugar los tubos a 13 000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante. Se secó el exceso de etanol mediante evaporación y se suspendió la pastilla en 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8). La concentración de ADN en la muestra se determinó mediante un espectrofotómetro (UV-6100A UV/VIS, Metash, Shanghai) y las muestras se conservaron a -20 °C.

### Procedimiento para efectuar las RAPD

Se utilizaron equipos con reactivos preparados de amplificación de ADN (GoTaq® Green Master Mix, PROMEGA) mediante PCR, siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de varias pruebas para definir las condiciones óptimas de concentraciones de ADN, concentraciones de los cebadores y temperaturas de alineamiento, se definieron los parámetros para la mezcla

A volume of cold isopropanol was added, incubated for 10 min at -20 °C and centrifuged for 10 min at 13 000 rpm. The supernatant was discarded and the pellet was washed with 500 µL of 70% ethanol vortexing. After centrifuging the tubes at 13 000 rpm for 10 min, the supernatant was discarded. The excess ethanol was dried by evaporation and the pellet was suspended in 50 µL of TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8). The DNA concentration in the sample was determined by a spectrophotometer (UV-6100A UV/VIS, Metash, Shanghai) and the samples were stored at -20 °C.

### Procedure for performing the RAPD

The equipment with prepared DNA amplification reagents (GoTaq® Green Master Mix, PROMEGA) was used by PCR, following the manufacturer's instructions. After several tests to define the optimal conditions of DNA concentrations, primer concentrations and alignment temperatures, the parameters for the PCR reaction mixture (Table 2) and for the program of the thermocycler Techne TC-512 Thermal Cycler (Bibby Scientific Ltd., UK) (Table 3). A total of 22 random decamer primers designed by Operon Technologies and produced by IDT (Integrated DNA Technologies, USA) (Table 4) were tested. The amplification products were

de reacción de PCR (Cuadro 2) y para el programa del termociclador Techne TC-512 Thermal Cycler (Bibby Scientific Ltd., UK) (Cuadro 3). Se probaron un total de 22 cebadores decámeros aleatorios diseñados por Operon Technologies y producidos por IDT (Integrated DNA Technologies, USA) (Cuadro 4). Los productos de amplificación se corrieron rutinariamente en gel de 2.5% de agarosa con buffer TBE 1x durante 2:45 h aplicando 65V. El peso molecular aproximado se referenció mediante marcadores de peso molecular (50 bp, invitrogen).

#### Cuadro 2. Mezcla de reacción para PCR.

Table 2. PCR reaction mix.

Componente	Concentración	Volumen
Primer	15 $\mu\text{M}$	1.25 $\mu\text{L}$
GoTaq Master Mix	2x	6.25 $\mu\text{L}$
ADN	18 ng $\mu\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{L}$
Agua PCR	- - -	4 $\mu\text{L}$

#### Elaboración de dendrogramas y su análisis

Los datos categorizados de origen molecular o morfológico (con base a ausencia/presencia, o en escala de rangos predeterminados) fueron analizados mediante el software Primer 5 (versión 5.2.8 para Windows). El método de análisis de similitud fue el de agregados (clusters) con el algoritmo de Bray-Curtis con transformación de raíz cuadrada. Con la matriz de similitud generada se construyeron los dendrogramas basándose en el método de promedio de grupo (Clarke y Gorley, 2001). El rango de correlación de Spearman de las variables consideradas en la matriz de similitud se realizó en múltiples corridas, y se reportó el mejor valor calculado tomando cinco variables a la vez por corrida para cada uno de los dendrogramas.

## Resultados y discusión

#### Análisis de dendrograma elaborado con base a datos morfológicos

Al analizar los 16 caracteres morfológicos de hoja y fruto se encontraron especímenes de guayaba que fueron clasificados en dos o tres categorías según el descriptor. Once caracteres corresponden a fruto maduro y cinco a hoja desarrollada

routinely run on 2.5% agarose gel with 1x TBE buffer for 2:45 h by applying 65V. Approximate molecular weight was referenced by molecular weight markers (50 bp, invitrogen).

#### Cuadro 3. Programa para el termociclador.

Table 3. Program for the thermal cycler.

Procesos	Tiempo (min)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
Pre calentamiento/ desnaturalización	2	94
50 ciclos: Desnaturalización	1	94
Alineamiento	2	37
Extensión	3	72
Extensión final	7	72

#### Cuadro 4. Cebadores utilizados\* (operon technologies).

Table 4. Primers used\* (operon technologies).

Kit/serie	Número
OPA	02, 05, 07, 10, 13, 17 y 18
OPB	01, 05, 06, 08, 09 y 10
OPC	01, 02, 03, 04 y 05
OPD	06 y 09
OPH	04 y 10

\*= [www.operon.com/products/downloads/operonsrapd10mersequences.xls](http://www.operon.com/products/downloads/operonsrapd10mersequences.xls).

#### Elaboration of dendrograms and their analysis

The categorized data of molecular or morphological origin (based on absence/presence, or at predetermined range scales) were analyzed using the software Primer 5 (version 5.2.8 for Windows). The method of analysis of similarity was the one of clusters with the algorithm of Bray-Curtis with transformation of square root. With the generated similarity matrix, dendrograms were constructed based on the group average method (Clarke and Gorley, 2001). The Spearman correlation range of the variables considered in the similarity matrix was performed in multiple runs, and the best calculated value was reported by taking five variables at a time per run for each of the dendrograms.

## Results and discussion

#### Dendrogram analysis based on morphological data

(Cuadro 1). El análisis del conjunto de datos morfológicos mostró un rango de similitud de 87 a 100% (Figura 1), con un rango de correlación de Spearman de  $r=0.719$ , lo cual difiere de los resultados obtenidos con RAPDs. Sin embargo, estos resultados son comparables a los obtenidos por Muñoz (2012), quien utilizó seis descriptores para fruto y tres para hoja de 79 árboles de guayabo pertenecientes a igual número de huertos. De acuerdo con los resultados el rango de similitud de caracteres morfológicos de guayabos de Calvillo oscila de 87 a 100% con un rango de correlación de  $r=0.909$ . De la misma manera, se tiene concordancia con los resultados de Kujal *et al.* (2005), ya que encontraron que los datos de RAPD obtenidos por ellos presentaron mucha mayor divergencia que los datos de morfología. Esto podría ser una evidencia de que durante el proceso evolutivo los marcadores de polimorfismos de ADN neutrales no tienen ningún efecto sobre la aptitud de los seres vivos para sobrevivir en el medio ambiente, y por lo tanto, no son sujetos a la presión de selección como ocurre con las secuencias codificantes. Los resultados de Domínguez *et al.* (2005), también indican que los cambios que ocurren a nivel de genoma en guayaba no siempre corresponden a los observados en el fenotipo. Gomes *et al.* (2010) por su parte, encontraron concordancia parcial entre los métodos de agrupamiento de marcadores RAPD y los descriptores morfológicos de guayaba. En contraparte, Feria (2008) pudo asociar tres bandas específicas de un patrón de RAPD con la acumulación de quercetina en guayaba.

Debido a que en el presente trabajo no se encontró una relación clara entre los marcadores moleculares y los descriptores de guayaba, se analizaron los caracteres morfológicos por separado, encontrándose que se generaron cinco grupos en el rango de similitud entre 91 y 94% que se describen con sus etiquetas (Figura 1).

### **Análisis de dendrograma elaborado con base a RAPDs**

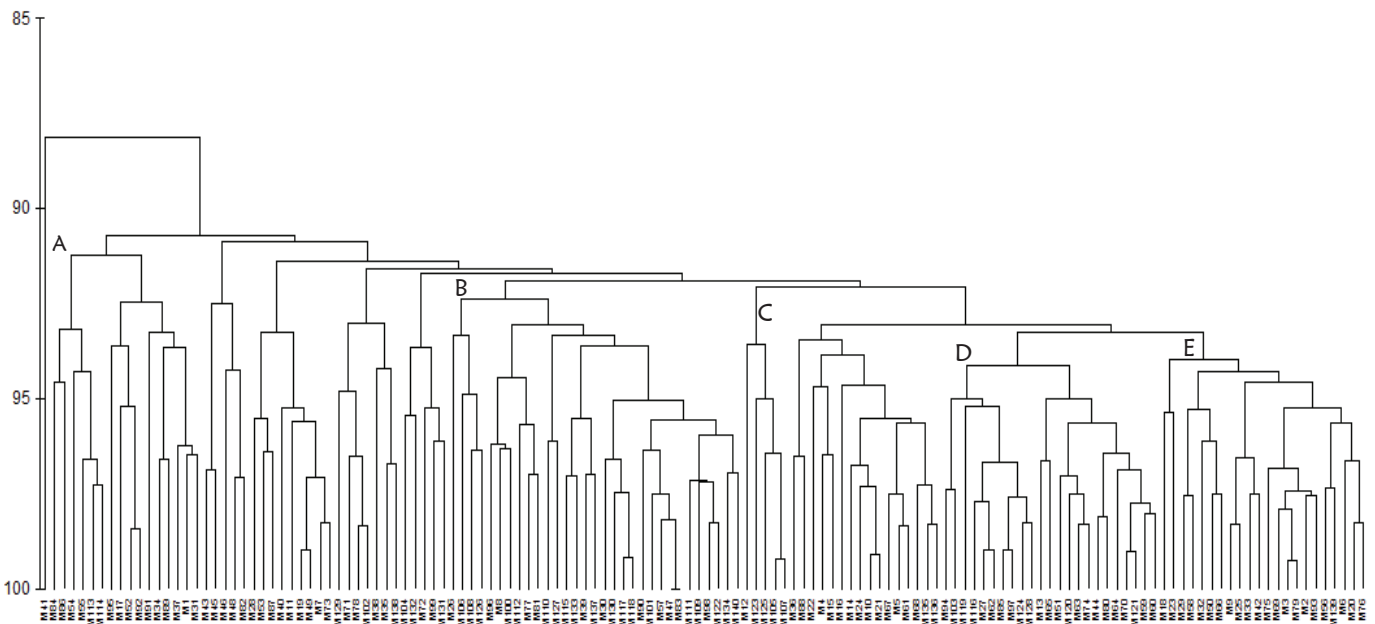
Desde las pruebas preliminares con los cebadores se encontraron bandas polimórficas en varios cebadores de la serie OPA y OPH producidas en función del genotipo (Figura 2). Las 10 bandas polimórficas fueron utilizadas para la elaboración del dendrograma en base a RAPDs. Los valores de similitud calculados para los 140 genotipos oscilaron entre 25 a 100% y un coeficiente de correlación de Spearman  $r=0.794$  (Figura 3), lo cual es coincidente con lo obtenido por Muñoz-Rodríguez (2012), quien encontró un rango de similitud de 30 a 100% con un rango de correlación de  $r=0.927$  utilizando RAPDs de solamente 26 genotipos de la zona productora de Calvillo con cebadores de las series OPA (10, 05 y 07) y OPB (01 y 09).

When analyzing the 16 morphological characters of leaf and fruit guava specimens were found that were classified in two or three categories according to the descriptor. Eleven characters correspond to mature fruit and five to developed leaf (Table 1). Analysis of the morphological data set showed a similarity range of 87 to 100% (Figure 1), with a Spearman correlation range of  $r=0.719$ , which differs substantially from the results obtained with RAPDs. However, these results are comparable to those obtained by Muñoz (2012), who used six descriptors for fruit and three for leaf of 79 guava trees belonging to an equal number of orchards. According to their results the range of similarity of morphological characters of Calvillo guavas ranges from 87 to 100% with a correlation range of  $r=0.909$ . In the same way, we have concordance with the results of Kujal *et al.* (2005), since they found that the RAPD data obtained by them presented much greater divergence than the morphology data. This could be evidence that during the evolutionary process the markers of neutral DNA polymorphisms have no effect on the ability of living beings to survive in the environment, and therefore, are not subject to selection pressure as occurs with the coding sequences. The results of Domínguez *et al.* (2005), also indicate that changes occurring at the genome level in guava do not always correspond to those observed in the phenotype. Gomes *et al.* (2010) on the other hand, found partial agreement between the methods of clustering of RAPD markers and the morphological descriptors of guava. In contrast, Feria (2008) was able to associate three specific bands of a RAPD pattern with the accumulation of quercetin in guava.

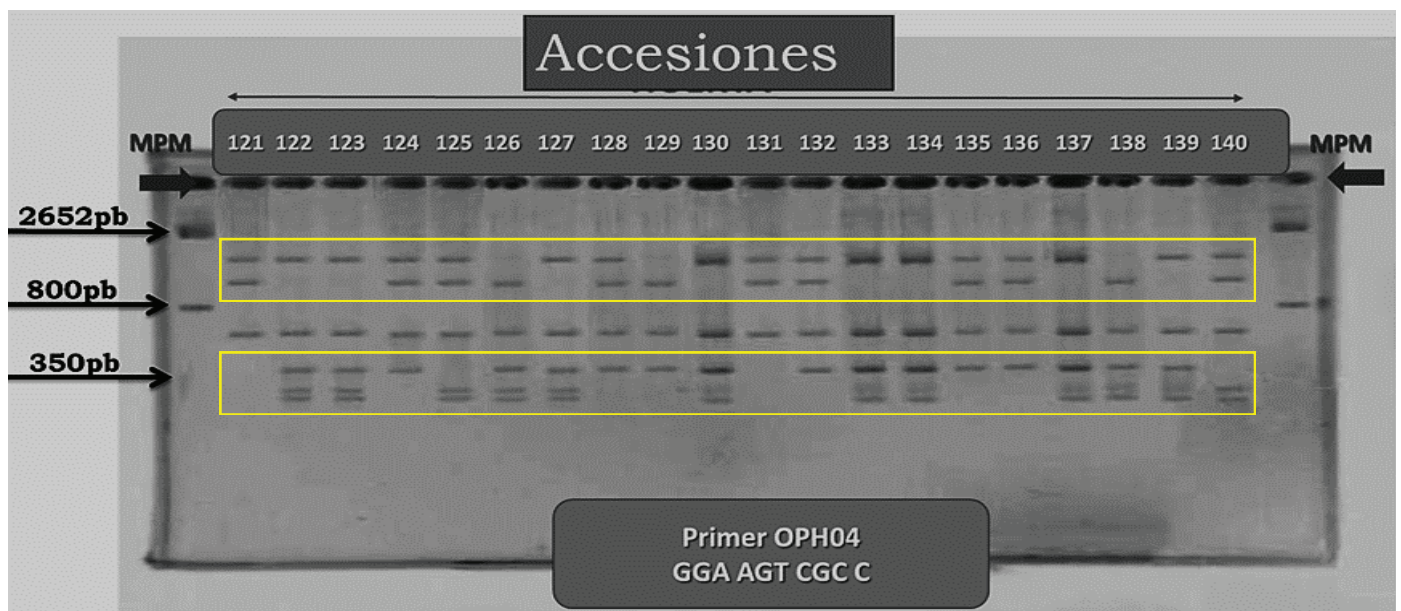
Because the present work did not find a clear relation between the molecular markers and the guava descriptors, the morphological characters were analyzed separately, being found that five groups were generated in the similarity range between 91 and 94% described with their labels (Figure 1)

### **Dendrogram analysis based on RAPDs**

From the preliminary tests with the primers polymorphic bands were found in several primers of the series OPA and OPH produced as a function of the genotype (Figure 2). The 10 polymorphic bands were used to elaborate the dendrogram based on RAPDs. The similarity values calculated for the 140 genotypes ranged from 25 to 100% and a Spearman correlation coefficient  $r=0.794$  (Figure 3), which coincides with that obtained by Muñoz-Rodríguez (2012), who found a range of 30 to 100% similarity with a correlation range of  $r=0.927$  using RAPDs of only 26 genotypes from the Calvillo producing zone with series primers OPA (10, 05 and 07) and OPB (01 and 09).

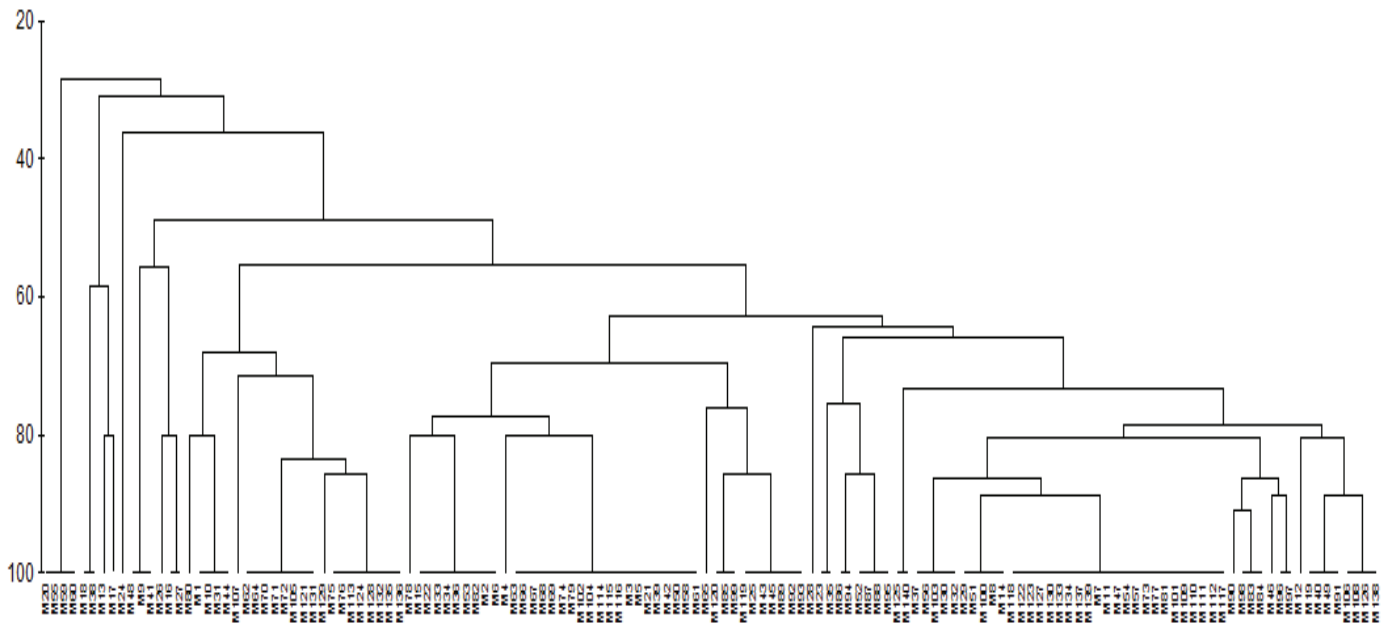


**Figura 1. Análisis cladístico basado en datos morfológicos.** Correlación de Spearman  $r = 0.719$ ; A= frutos con base elíptica; B= genotipos con longitud y ancho de hoja medias; C= frutos redondos con diámetro ecuatorial  $>44$  mm y grosor de mesocarpio  $>7$  mm; D= frutos con cuatro carpelos y peso (40-70 g); E= frutos de aspecto piriforme con pulpa blanca.  
**Figure 1. Cladistic analysis based on morphological data.** Spearman correlation  $r = 0.719$ ; A= fruits with an elliptical basis; B= genotypes with mean leaf length and width; C= round fruits with equatorial diameter  $>44$  mm and thickness of mesocarp  $>7$  mm; D= fruits with four carpels and weight (40-70 g); E= fruits of piriform aspect with white pulp.



**Figura 2. Ejemplo de gel que muestra la obtención de bandas polimórficas (dentro de los rectángulos amarillos) mediante RAPD en guayaba utilizando el cebador OPH-04.** En la parte superior del gel se anotaron los códigos asignados a las muestras según el orden en que se fueron muestreando. MPM= marcador de peso molecular.  
**Figure 2. Example of gel showing polymorphic bands (within the yellow rectangles) by RAPD in guava using the OPH-04 primer.** At the top of the gel the codes assigned to the samples were recorded in the order in which they were sampled. MPM= molecular weight marker.





**Figura 3. Análisis cladístico basado en RAPD realizado con 140 muestras de ADN de guayaba de Calvillo, Aguascalientes.**

Las etiquetas corresponden a muestras numeradas consecutivamente. Correlación de Spearman observada  $r = 0.794$ .

**Figure 3. Cladistic analysis based on RAPD performed with 140 guava DNA samples from Calvillo, Aguascalientes.** Labels correspond to consecutively numbered samples. Correlation of Spearman observed  $r = 0.794$ .

No es una relación clara entre la presencia de una banda en específico con las características morfológicas de las hojas o frutos de los árboles muestreados. Esto también coincide con los resultados de Muñoz (2012) aun cuando el número de muestras fue el equivalente a una quinta parte del número de muestras del presente trabajo. Los RAPDs en guayaba han sido propuestos para relacionarlos con caracteres morfológicos o nivel de domesticación. Por ejemplo, Tseng-Wei *et al.* (2007) fueron capaces de identificar dos grupos principales de guayaba procedentes de Taiwan utilizando dendrogramas derivados de RAPD: los genotipos comerciales y los genotipos silvestres. Este último grupo incluyó dos subgrupos que de manera general distinguían entre las guayabas de pulpa blanca y las de pulpa roja. No se pudo relacionar ninguna banda de RAPD con esos grupos.

En otro caso, con los cebadores OPA-02 y 03, Ahmed *et al.* (2011) observó 33.2% de bandeo polimórfico, que sirvió para determinar las distancias genéticas de 33 genotipos de guayaba en un rango pequeño (0.5253-0.6631) de índice de distancia. De acuerdo con los autores, uno de los agrupamientos encontrados está cercanamente relacionado con la morfología de los genotipos cultivados. Bajpai *et al.* (2008) obtuvieron dos diferentes dendrogramas de 22 genotipos de guayaba utilizando RAPD y amplificación

There is not clear relationship between the presence of a specific band with the morphological characteristics of the leaves or fruits of the sampled trees. This also coincides with the results of Muñoz (2012) even though the number of samples was equivalent to one fifth of the number of samples of the present work. The RAPDs in guava have been proposed to relate them to morphological characters or level of domestication. For example, Tseng-Wei *et al.* (2007) were able to identify two major guava groups from Taiwan using dendrogram derived from RAPD: commercial genotypes and wild genotypes. The latter group included two subgroups that generally distinguished between white pulp guavas and red pulp guavas. No RAPD band could be related to these groups.

In another case, with primers OPA-02 and 03, Ahmed *et al.* (2011) observed 33.2% polymorphic banding, which served to determine the genetic distances of 33 guava genotypes in a small range (0.5253-0.6631) range index. According to the authors, one of the clusters found is closely related to the morphology of the cultivated genotypes. Bajpai *et al.* (2008) obtained two different dendrograms of 22 guava genotypes using RAPD and direct DNA minisatellite amplification (DAMD) with genetic distances of 5 to 43%. The authors mentioned that the genotypes of the plains of

directa de minisatélites de ADN (DAMD) con distancias genéticas de 5 a 43%. Los autores mencionaron que los genotipos de las planicies de la región del Indo-Ganges se compactan en un solo grupo, mostrando con esto que los marcadores RAPD pueden dar un patrón de identificación al menos para ese grupo.

## Conclusiones

Se encontraron bandas polimórficas al utilizar la técnica de RAPD en árboles de guayaba seleccionados al azar procedentes de 140 huertas del municipio de Calvillo, Aguascalientes, México. Los marcadores de tipo RAPD obtenidos en este trabajo de investigación y anteriores, muestran la existencia de gran variabilidad a nivel molecular entre los individuos presentes en las huertas muestreadas. Estos marcadores pueden ser útiles para la selección de genotipos sobresalientes que se deseen propagar para ser utilizados en programas de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares.

Por su parte los agrupamientos mediante caracteres morfológicos mostraron una menor variabilidad, y no corresponden a los agrupamientos generados mediante RAPDs. No obstante, el proceso de búsqueda de marcadores moleculares asociados a características morfológicas de guayaba debe continuar, en especial para la identificación de genotipos seleccionados para el mejoramiento asistido. Alternativamente, debido a que los productores de guayaba locales que propagan vegetativamente su material están conscientes de la variabilidad de sus genotipos y reconocen a los mejores, convendría el uso de la técnica de RAPD para corroborar la uniformidad genética de los materiales que están propagando.

## Agradecimientos

Agradecemos a los productores de guayaba del municipio de Calvillo, Aguascalientes por permitirnos tomar muestras de sus huertos, y al Tecnológico Nacional de México por el apoyo económico de este proyecto por vía institucional.

the Indo-Ganges region are compacted into a single group, thus showing that RAPD markers can give a pattern of identification at least for that group.

## Conclusions

The polymorphic bands were found using the RAPD technique in randomly selected guava trees from 140 orchards in the Municipality of Calvillo, Aguascalientes. The RAPD type markers obtained in this work and earlier, show the existence of great variability at the molecular level among the individuals present in the sampled orchards. These markers may be useful for the selection of outstanding genotypes that are to be propagated for used in genetic improvement programs assisted by molecular markers.

On the other hand, the groupings using morphological characters showed less variability, and did not correspond to the groupings generated by RAPDs. However, the process of searching for molecular markers associated with guava morphological characteristics must continue, especially for the identification of selected genotypes for assisted improvement. Alternatively, because the local guava growers who vegetative propagate their material are aware of the variability of their genotypes and recognize the best, it would be appropriate to use the RAPD technique to corroborate the genetic uniformity of the propagating material.

*End of the English version*



## Literatura citada

- Ahmed, B.; Mannan, M. A and Hossain, S. A. 2011. Molecular characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm by RAPD analysis. *Inter. J. Natural Sci.* 1:62-67.
- Bajpai, A.; Chandra, R.; Rajan, S. and Srivastava, N. 2008. RAPD and minisatellite markers for genetic diversity and relationship in guava varieties. *Ind. J. Genetics.* 68:441-445.
- Chandra, R. and Mishra, M. 2007. Biotechnological interventions for improvement of guava (*Psidium guajava* L.). In: Singh, G. (editores). *Proc. 1st IS on Guava, ISHS. Acta Horticulturae.* 735:117-126.

- Clarke, K. R. and Gorley, R. N. 2001. Primer v5: User Manual/Tutorial. Primer-E Ltd., Plymouth. 91 p.
- Domínguez, A. J. L.; Legaria, S. J. P.; Nieto, A. R.; Barrientos, P. A. F. y Pineda, P. J. 2005. Variabilidad genética según RAPD de árboles de guayabo 'Media China' procedentes de cuatro plantaciones y su respuesta morfológica a baja disponibilidad de nutrimentos. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 11:329-343.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (USA)*. 12:13-15.
- Feria, R. I. A. 2008. Clonación y caracterización de fragmentos RAPD y loci microsatélite, asociados a *Psidium guajava* L. cultivada en cuatro estados de la República Mexicana. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. 271 p.
- Gomes, F. A.; Gonçalves, O. J.; Pio, V. A.; de Oliveira, S. A. P.; Góes, O. M. and Gonzaga, P. M. 2010. Marcadores moleculares RAPD e descriptores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). RAPD molecular markers and morphological descriptors in the evaluation of genetic diversity of guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Sci. Agron.* 32:627-633.
- Grattapaglia, D.; Vaillancourt, R. E.; Shepherd, M.; Thumma, B. R.; Foley, W.; Külheim, C.; Potts, B. M. and Myburg, A. A. 2012. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: eucalyptus as the pivotal genus. *Tree Genetics Genomes*. 8:463-508.
- ISAAA. 2015. Pocket, K. No. 19: molecular breeding and marker-assisted selection. International service for the acquisition of agri-biotech applications. <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/19/default.asp>.
- Kujal, S.; Chakrabarti, S. K.; Pandey, S. K. and Khurana, S. M. P. 2005. Genetic divergence in tetraploid potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) as revealed by RAPD vis-à-vis morphological markers. *Potato J.* 32:17-27.
- Liu, X. and Yang, G. 2012. Assessment of clonal fidelity of micro-propagated guava (*Psidium guajava*) plants by ISSR markers. *AJCS*. 6:291-295.
- Mehmood, A.; Jaskani, M. J.; Ahmad, S. and Ahmad, R. 2013. Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers. *Pak. J. Agri. Sci.* 50:591-597.
- Muñoz, R. P. J. 2012. Caracterización genotípica de accesiones de guayaba (*Psidium guajava*) mediante RAPD. Tesis de Maestría. DEPI, Instituto Tecnológico El Llano, Aguascalientes. 146 p.
- Nogueira, A. M.; Guilhen, J. H. S.; Mangaravite, E.; Ferreira, A. and Ferreira, M. F. S. 2012. Discriminant analysis of wild guava tree by morphological descriptors and microsatellites. *Proc. In: 3rd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*. 15 p.
- Padilla, R. J. S.; González, G. E. y Esquivel, V. F. 2002. Cultivares y germoplasma. *In: González, E. G.; Padilla, R. J.; Reyes, M. L.; Perales, C. M. A. y Esquivel, V. F. (eds.). Guayaba: su cultivo en México. SAGARPA-INIFAP-CIRNOC-CEP. Libro técnico Núm. 1. 34-48 pp.*
- Padilla, R. J. S.; González, G. E.; Esquivel, V. F.; Mercado, S. E.; Hernández, D. S. y Mayek, P. N. 2002. Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 25:393-399.
- Padilla, P. J. S.; González, G. E.; Perales, C. M. A.; Reyes, P. H. R. y Osuna, C. E. S. 2007. Variabilidad del fruto de la guayaba (*Psidium guajava* L.) mexicana. INIFAP-CIRNOC-CEPAB. Publicación especial Núm. 31. 68 p.
- Perales, C. M. A.; Padilla, R. J. S.; González, G. E. y Reyes, P. H. 2005. Manual para la producción integral del cultivo de la guayaba. México. INIFAP. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes. 9 p.
- Provan, J.; Thomas, W. T. B.; Forster, B. P. and Powell, W. 1999. Copia-SSR: a simple marker technique which can be used on total genomic DNA. *Genome*. 42:363-366.
- Quesada P, M. L.; Perales, C. M. A.; Consuelo, T. F. J.; González, G. F. y Reyes, P. R. R. 2005. Manual para la producción integral del cultivo de la guayaba. Fundación Produce Aguascalientes A. C. Campo Experimental Pabellón, INIFAP y Consejo Nacional Mexicano de la Guayaba, A. C., Aguascalientes, Aguascalientes. 61 p.
- Rai, M. K.; Phulwaria, H. M.; Gupta A. K.; Shekhawat N. S. and Jaiswal U. 2012. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 111:259-264.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2012. Plan rector del sistema producto guayaba estado de Aguascalientes. [http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/ept%20comite%20sistema%20producto%20guayaba%20aguascalientes/plan%20rector%20que%20contiene%20programa%20de%20trabajo%202012/pr\\_guayaba\\_aguascalientes\\_2012.pdf](http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/ept%20comite%20sistema%20producto%20guayaba%20aguascalientes/plan%20rector%20que%20contiene%20programa%20de%20trabajo%202012/pr_guayaba_aguascalientes_2012.pdf).
- Sanabria, O. H. L. 2005. Caracterización morfológica en árboles nativos de guayaba en el valle del cauca. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/13077/2/118-1103-2-pb.pdf>.
- Sánchez, U. A. B. and Peña, V. C. B. 2011. Morphological descriptor for genus *psidium* characterization. *Rev. Fac. Agron.* 28:303-343.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-porcultivo/>.
- Shiddalingeswara, T.; Saroja, S.; Nalina, M. and Chandrashekara, K. N. 2014. Molecular analysis of variants identified from orchards growing with micro propagated Robusta banana (*Musa spp.* 'AAA') using RAPD markers. *IOSR. J. Agric. Vet. Sci.* 7:25-30.
- Tseng, W. C.; Chang, C. N. G.; Chung, Y. W. and Yuan, T. S. 2007. Molecular identification and analysis of *Psidium guajava* L. from indigenous tribes of Taiwan. *J. Food Drug Analysis*. 15:82-88.
- UPOV. 1987. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. *Guava (Psidium guajava L.) booklet*. 27 p.
- Valdés, I. H. J.; Rodríguez, M. N. N.; Bautista, A. M.; Ortíz, G. M. M.; Quiroz, M. A.; Sánchez, T. L. F.; Risterucci, A. M. y Rohde, W. 2012a. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 12:1-9.
- Valdés, I. H. J.; Rodríguez, M. N. N.; González, L.; Velázquez, P. J. B.; Rivero, R. D.; Sourd, M. D. G.; Martínez, G. F. y Rodríguez, R. J. A. 2012b. La biotecnología como herramienta para la propagación, conservación y el mejoramiento genético del guayabo. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14:7-19.
- Varela, G. H. 2010. Fábrica de dulces y empaque de exportación de guayaba a los Estados Unidos "Flor de Calvillo". Programa elaboración de casos de éxito de innovación en el sector agroalimentario. Fundación Produce Aguascalientes. <http://www.siac.org.mx/fichas/23%20aguascalientes%20guayaba%20vf.pdf>.