



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE AJO (*Allium sativum* L.) EN MÉXICO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES RAPD”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

Q.F.B. GISELA GONZÁLEZ RUIZ

Dirigido por:

DR. RAMÓN ÁLVAR MARTÍNEZ PENICHE

SINODALES

DR. RAMÓN ÁLVAR MARTÍNEZ PENICHE
Presidente

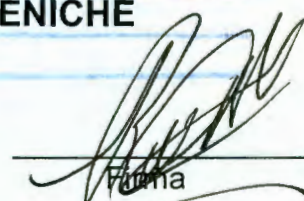
DR. EDMUNDO MERCADO SILVA
Secretario

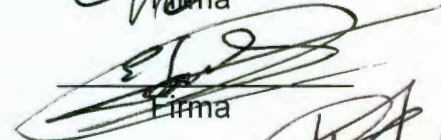
DR. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO
Vocal

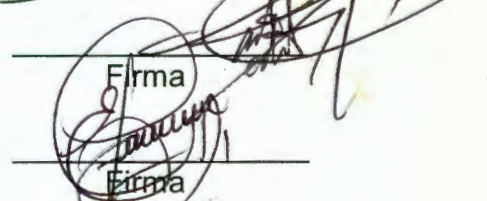
M. C. ELENA HEREDIA GARCÍA
Suplente

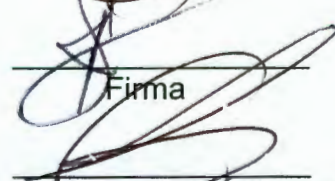
DR. SALVADOR PÉREZ GONZÁLEZ
Suplente

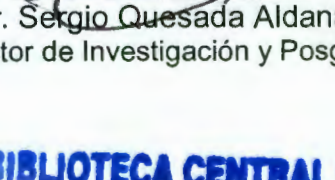
M. C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad de Química


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
"ROBERTO FUEZ ORREGON"

No. Adm. H69768
No. Title _____
Clas. TS
635.26
G643e
Ej. 1

RESUMEN

El ajo es uno de los cultivos más importantes en México; aunque existe un gran desconocimiento de su origen y variabilidad genética. El volumen de la producción y la superficie cultivada ha sufrido una disminución significativa durante los últimos años debido, en parte, al aumento de las importaciones procedentes de Sudamérica, y a la posible introducción ilegal de países como China, pasando por terceros países, a precios más bajos que los que prevalecen en el mercado nacional. Con el fin de evaluar la diversidad genética del ajo en México y explorar el origen de los ajos de importación, se colectaron y analizaron 27 muestras mediante marcadores RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Se evaluaron 97 oligonucleótidos y 20 de ellos fueron seleccionados para analizar todas las muestras, usando técnicas multivariantes. Se generaron 442 bandas de ADN, 430 de ellas fueron polimórficas (72 de ellas fueron únicas) y 12 monomórficas. El método aglomerativo (AGNES) separó las muestras en tres grandes grupos. El primero estuvo compuesto principalmente por las muestras de México, obteniéndose la menor distancia (0.32) entre 'Chileno Apaseo' e 'Inifap-94', muestras clasificadas como diferentes desde el punto de vista morfológico. El segundo grupo estuvo constituido por las muestras de referencia de China, Corea, Chile y Argentina, así como por aquellas de importación colectadas en el mercado de Abastos, lo que sugiere un origen asiático de dichas muestras. El tercer grupo incluyó solo tres muestras, entre ellas, dos de la variedad 'California'. El método divisivo (DIANA) generó un dendrograma muy similar al obtenido con AGNES. El análisis monotético (MONA) produjo una estructura divisiva muy similar a la obtenida mediante AGNES y DIANA. La banda 350 dividió a la población de ajo en dos grandes grupos; el primero incluyó principalmente a las muestras nacionales, caracterizadas por un corto período para desarrollar completamente el brote interno; y el segundo a las muestras de importación y aquellas con sospechoso origen de China, caracterizadas por un largo período para desarrollar el brote. Los resultados obtenidos permiten concluir que el análisis RAPD puede ser una herramienta útil para estudiar la diversidad genética e identificar el origen geográfico del ajo.

Palabras clave: ajo, RAPD, dendrograma, diversidad genética.

DEDICATORIAS

A Dios, por sostenerme y darme la fortaleza necesaria para la realización de este trabajo de tesis.

A mis padres, Gisela y Miguel Ernesto por todo su amor, apoyo, motivación y comprensión en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al DIPA por el apoyo que siempre me ha brindado para mi formación académica y para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Ramón Martínez Peniche por su total apoyo, consejo y dirección que me ayudaron en el desempeño de mi trabajo. Gracias por el tiempo que me dedicó siempre que lo necesité.

Al Dr. Edmundo Mercado Silva por el apoyo que me dio siempre y su constante preocupación por que tuviera un resultado satisfactorio.

Al Dr. Eduardo Castaño Tostado por la gran ayuda brindada en el análisis estadístico de esta tesis y por sus consejos para el éxito del trabajo.

A la M.C. Elena Heredia García por compartir su experiencia y darme su apoyo en el presente estudio al igual que el Dr. Salvador Pérez González por sus atenciones y observaciones.

SUMMARY

Garlic is one of the most important crops in Mexico, although there is a lack of knowledge of its origin and genetic variability. Volume of production and cultivated surface have significantly decreased in recent years which is partially due to the increase of the importations from South America, and the possible introduction of illegal garlic from countries such as China passing through third countries at lower prices than those found in the national market. In order to evaluate garlic genetic diversity in Mexico, and to explore the actual origin of imported garlic, 27 samples of garlic accessions were collected and analyzed by RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) markers. Ninety-seven primers were tested and 20 of them were selected to analyze all the samples using multivariate techniques. Four hundred forty-two bands of DNA were generated, 430 were polymorphic (72 of them were unique) and 12 were monomorphic. Agglomerative nesting analysis (AGNES) separated the samples into three major groups. The first one was mainly formed by the samples from Mexico and the lower distance observed in this group was 0.32 between 'Chileno Apaseo' e 'Inifap-94', samples classified separately according to morphological traits. The second group contained the samples from China, Korea, Chile, and Argentina, as well as those imported samples collected in the market, which suggests an Asiatic origin of these. The third group mostly included just three, with two 'California'. The divisive analysis method (DIANA) generated a very similar dendrogram to that obtained by AGNES. Monothetic analysis (MONA) produced a divisive structure which is very similar to that obtained by the AGNES and DIANA methods. The band 350 divided the garlic population into two major groups: the first one mainly included the national samples, characterized by a short period of days required to completely develop unemerged sprout in clove, and the second one included the imported samples and those materials suspected of Chinese origin, characterized by a larger period required to develop sprout. The results obtained in this study allow us to conclude that the RAPD analysis can be a useful tool for studying genetic diversity and identifying the geographic origin of garlic genetic material.

Key words: garlic, RAPD, dendrogram, genetic diversity.

ÍNDICE

	Pág.
	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Generalidades del ajo	3
2.1.1. <i>Origen e importancia</i>	3
2.1.1.1. <i>Producción a nivel mundial</i>	3
2.1.1.2. <i>Producción a nivel nacional</i>	5
2.1.1.3. <i>Importancia y problemática del cultivo</i>	5
2.1.2. <i>Botánica del ajo</i>	9
2.1.2.1. <i>Clasificación taxonómica</i>	9
2.1.2.2. <i>Anatomía</i>	10
2.1.2.3. <i>Reproducción</i>	13
2.1.2.4. <i>Ecofisiología</i>	13
a. <i>Fisiología del crecimiento</i>	13
b. <i>Fisiología de la bulbificación</i>	14

c. Fisiología del letargo	14
d. Fisiología de la brotación	15
2.1.3. Cultivares	15
2.1.3.1. Clasificación de las variedades de ajo	16
2.1.3.2. Principales cultivares en México	18
2.2. Estudio de la diversidad genética de las poblaciones	19
2.2.1. Concepto de diversidad genética	19
2.2.2. Marcadores genéticos	20
2.2.2.1. Marcadores morfológicos	21
2.2.2.2. Marcadores moleculares	21
a. Marcadores bioquímicos	21
b. Marcadores basados en ADN	23
b ₁ . Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	23
b ₂ . Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	24
b ₃ . ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	26
2.2.3. Algunos trabajos de análisis RAPD para estudiar de la diversidad genética y reconocer el origen geográfico en ajo y otras especies.	28
OBJETIVOS	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Estrategia experimental	32
3.2. Material biológico utilizado	33
3.3. Colecta, almacenamiento y preparación de las muestras	35
3.4. Extracción y purificación del ADN	35

3.5. Cuantificación del ADN	37
3.6. Análisis RAPD	37
3.6.1. Selección de la temperatura de hibridación	37
3.6.2. Selección de los oligonucleótidos	37
3.6.3. Amplificación del ADN	38
3.6.4. Electroforesis de los fragmentos amplificados	39
3.7. Análisis estadístico de los datos	39
3.7.1. Construcción de la tabla de contingencia	40
3.7.2. Cálculo del coeficiente de similitud genética	40
3.7.3. Algoritmos de agrupación	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. Aislamiento de ADN	43
4.1.1. Selección de tipo de tejido foliar	43
4.1.2. Aislamiento de ADN de las muestras evaluadas	44
4.2. Análisis RAPD	46
4.2.1 Selección de la temperatura de hibridación	46
4.2.2. Selección de los oligonucleótidos	48
4.2.3. Polimorfismo obtenido	51
4.3. Relaciones genéticas	57
4.3.1. Método aglomerativo (AGNES)	57
4.3.2. Método divisivo (DIANA)	63
4.3.3. Análisis monotético (MONA)	65
V. CONCLUSIONES	69
VI. BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
2.1. Clasificación taxonómica del ajo.	9
2.2. Especies más domesticadas de la familia <i>Alliaceae</i> .	10
3.1. Identificación y localización de las muestras.	34
3.2. Oligonucleótidos que se emplearon en la selección.	38
4.1. Concentración de ADN antes y después de la dilución en ng/ μ l.	45
4.2. Clasificación de los oligonucleótidos probados en el presente estudio de acuerdo a sus resultados.	48
4.3. Secuencia genética de los oligonucleótidos seleccionados.	49
4.4. Oligonucleótidos seleccionados y características que condujeron a su selección.	50
4.5. Bandas obtenidas por el análisis RAPD con los 20 oligonucleótidos seleccionados en 27 muestras de ajo.	52
4.6. Muestras en que se localizaron bandas únicas con los distintos oligonucleótidos empleados.	54
4.7. Bandas empleadas para las divisiones en el análisis MONA.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
2.1. Producción mundial de ajo en la última década.	4
2.2. Principales países productores de ajo en el mundo.	4
2.3. Principales estados productores de ajo en México.	5
2.4. Evolución de la superficie cultivada de ajo en México durante los últimos seis años.	8
2.5. Planta joven de ajo.	11
2.6. Estructura del bulbillo.	12
2.7. Ajo del tipo 'California Early White'.	17
2.8. Ajo del tipo 'Rosado INIA'.	18
2.9. Clasificación de los marcadores genéticos.	22
2.10. Mecanismo de los RFLPs.	25
2.11. Mecanismo de los AFLPs.	26
2.12. Mecanismo de los RAPDs.	28
3.1. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.	32
3.2. Algunas de las muestras empleadas en este estudio.	34
3.3. Preparación de las muestras de tejido foliar.	35
3.4. Diferentes estados del desarrollo de los brotes de ajo.	36
3.5. Análisis de conglomerados.	39
3.6. Ejemplo del registro de los datos.	40
4.1. ADN genómico obtenido de distintos tamaños de brotes de ajo	43
4.2. ADN genómico aislado de 10 muestras de ajo.	46
4.3. Efecto de la temperatura de hibridación en los productos de amplificación del ADN de distintas muestras de ajo.	47
4.4. Ejemplos de patrones de bandeo obtenidos con diferentes oligonucleótidos.	51
4.5. Patrones de bandeo obtenidos mediante RAPD en ajo con dos oligonucleótidos.	56

4.6. Polimorfismo y presencia de marcadores importantes obtenidos con algunos oligonucleótidos.	57
4.7. Dendrograma obtenido con el método AGNES.	58
4.8. Dendrograma obtenido con el método DIANA.	64
4.9. Estructura divisiva obtenida mediante el análisis MONA.	65

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una hortaliza de gran importancia en el mundo por su alta demanda en la población. En el año 2002 se produjeron 12, 107,077 Ton. a nivel mundial, aportando México 41, 561 Ton. que corresponden a alrededor de 0.34 % (FAO, 2002). Los principales estados productores son, Zacatecas, Guanajuato, Aguascalientes, Baja California, Puebla, Oaxaca y Querétaro (SAGARPA, 2002). Sin embargo, durante los últimos años se ha presentado una disminución significativa en el volumen de producción y en la superficie cultivada, pasando de 9,304 ha cultivadas en 1997 a 4,792 ha en 2002 (FAO, 2002), situación que puede tener su origen en la importación masiva de ajo y en la posible introducción ilegal proveniente de China, país líder en la producción de esta hortaliza con 71.8 % del total y cuyos costos de producción son muy inferiores a los que privan en nuestro país.

Por otra parte, la caracterización de cultivares de ajo en México se ha basado, principalmente, en diversos parámetros morfológicos: tamaño, forma, color de bulbo, porte vegetativo, así como número y color de dientes, entre otros. (Izquierdo *et al.*, 1992).

Debido a lo anterior, se hace necesario contar con una herramienta capaz de identificar el origen de los distintos materiales cultivados en México, y que además, permita estudiar las relaciones genéticas entre éstos y los introducidos de otros países, para detectar posibles prácticas de *dumping* o comercio ilegal.

Los marcadores moleculares basados en el ADN constituyen una herramienta útil para estudiar la diversidad genética de las especies (Arcade *et al.*, 2000), entre los que destacan los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde un oligonucleótido decámero de secuencia arbitraria se une al azar en los sitios del ADN en que encuentra homología (Douglas *et al.*, 2000).

En el caso particular del ajo, se han realizado diversos estudios con marcadores RAPD tendientes a caracterizar clones de ajo (Pooler y Simon, 1993), a estudiar su diversidad genética (Bradley *et al.*, 1996; Eom y Lee, 1999; Shasany

et al., 2000; Ipek *et al.*, 2003) y a clarificar esquemas antiguos de clasificación, encontrando agrupaciones acordes al origen geográfico, a la especie (Maas y Klass, 1995) y a la manifestación de algunas características morfológicas, como la presencia de escapo floral (Al-Zahim *et al.*, 1997) y el color del bulbo (Song *et al.*, 2001). Incluso, los marcadores RAPD han sido empleados en ajo para detectar bandas correlacionadas con la resistencia de diversos materiales a enfermedades tales como la pudrición blanca (Nabulsi *et al.*, 2001).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la diversidad genética de algunas poblaciones de ajo cultivadas en México y el origen geográfico de diversos materiales de importación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del ajo

2.1.1. Origen e importancia

De acuerdo a Maas *et al.* (1995) el ajo es originario del Asia Central. Los griegos, romanos, hindúes y chinos ya gustaban del ajo, mientras que los egipcios (3,000 años a. C.) lo consideraban una especie sagrada (Heredia, 2000).

Vvedensky y Komissarov (1946, 1965; citados por Helena, 2000) suponen que *Allium longicuspis* Regel es el antecesor del ajo cultivado (*A. sativum*), lo cual puede ser posible, pues ambas especies son diploides, con un número somático de cromosomas $2n = 16$. Como *A. longicuspis* es endémica de Asia Central, se considera que el ajo se originó en esta región.

Según Etoh (1986, citado por Heredia, 2000), la idea de que el ajo fue totalmente estéril ha prevalecido por mucho tiempo; sin embargo, es posible que algunas de las muchas plantas fértiles encontradas en cinco pueblos del norte de las montañas Tien Shan, en Asia Central (Kazajakstán, Uzbekistán y Turkmenistán), pertenezcan a *A. longicuspis*, ya que esta región se encuentra cerca de donde dicha especie crece en forma natural. Etoh señala que es difícil distinguir a *A. longicuspis* de *A. sativum*, y que las plantas fértiles encontradas en Asia Central son indicadores importantes de que éste es el centro de origen del ajo cultivado.

El ajo fue introducido a América a fines del siglo XV, en el segundo viaje de Colón al Nuevo Mundo, y con las subsecuentes reintroducciones precedentes de España, Islas Canarias e Italia (Jaramillo, 1994). Según Zeven y Wet (1982, citados por Heredia, 2000); la mayoría de las especies domesticadas del género *Allium* que existen en América Latina provienen de Asia.

2.1.1.1. Producción a nivel mundial

La producción mundial de ajo se ha incrementado durante los últimos diez años (Figura 2.1) gracias a los cambios producidos en los hábitos de consumo de la población (Figura 2.1). En 2002 se produjeron 12, 107,077 Ton. de ajo en el mundo. China es el país líder con 8, 694,066 Ton. La mayor parte del ajo producida en ese

país proviene de la provincia de Shandong, en el sureste de Beijing. Le siguen en importancia India, Corea del Sur, Estados Unidos de América, Egipto, Rusia, España, Ucrania y Tailandia (Figura 2.2.).

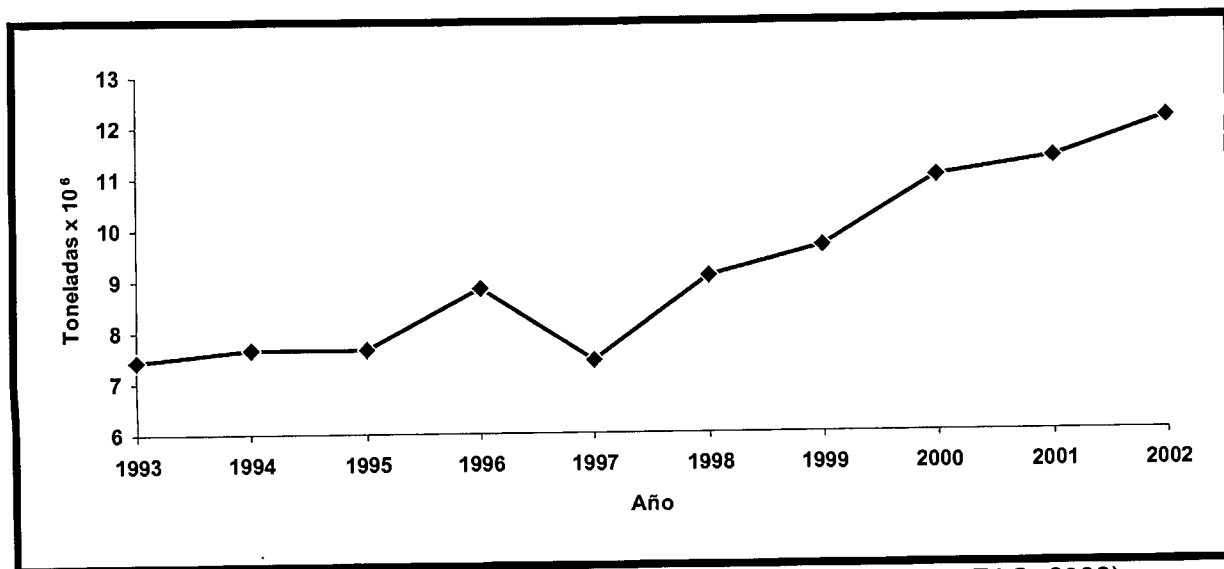


Figura 2.1. Producción mundial de ajo en la última década. (Fuente: FAO, 2002).

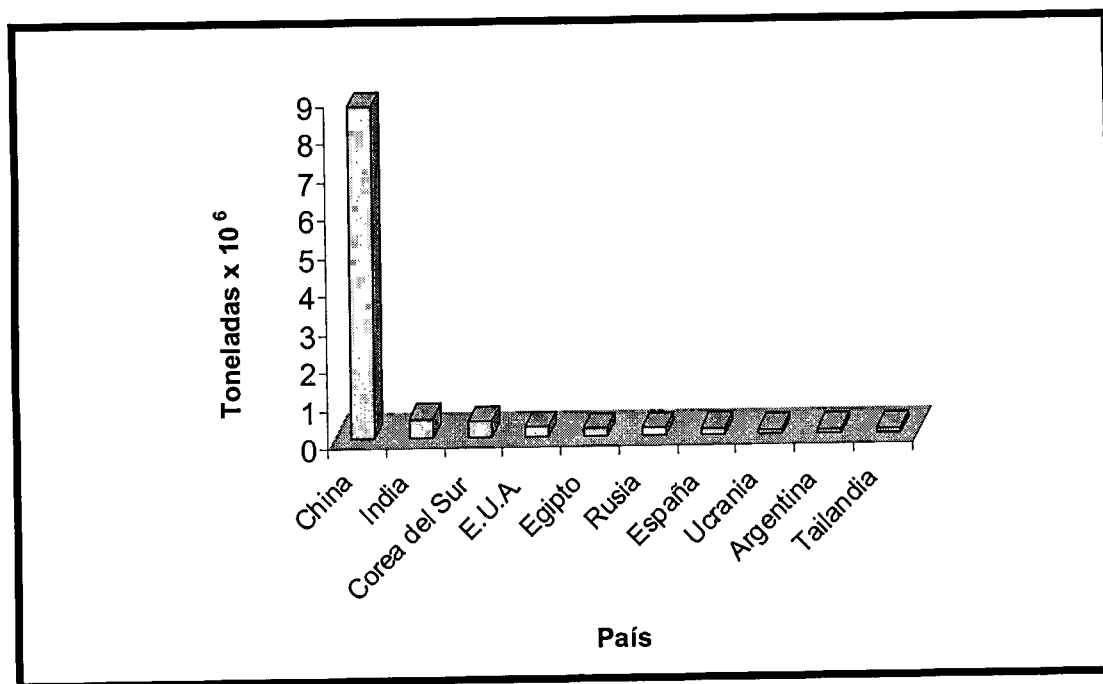


Figura 2.2. Principales países productores de ajo en el mundo (Fuente: FAO, 2002).

2.1.1.2. Producción a nivel nacional

México ocupa el 20° lugar a nivel mundial, con una producción de 41,561 ton y una superficie cultivada de 4,777 ha (SAGARPA, 2002).

La zona centro del país es la más importante productora de ajo a nivel nacional, destacándose los estados de Zacatecas y Guanajuato, con una producción en 2002 de 15,893 Ton (40%) y 10,592 (26%), respectivamente; les siguen Aguascalientes con 4,209 Ton (10%), Baja California con 3,106 Ton (8%), Puebla con 2,250 Ton (5%), Oaxaca con 1436 Ton (3%) y Querétaro con 968 Ton (2%) (Figura. 2.3.).

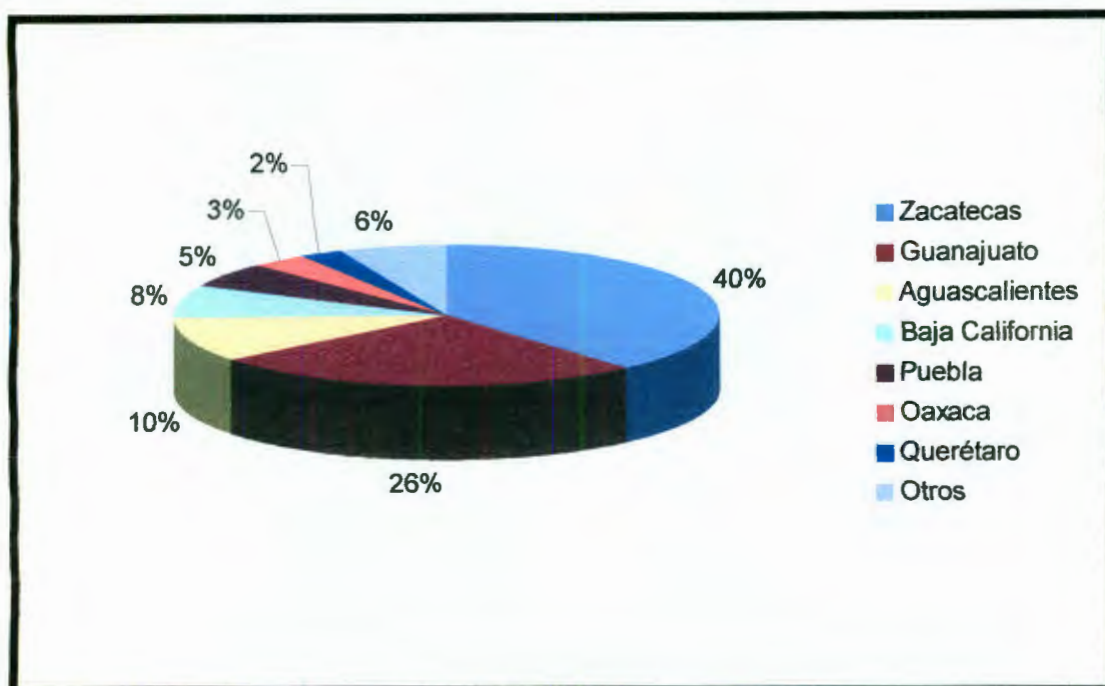


Figura 2.3. Principales estados productores de ajo en México (Fuente: SAGARPA, 2002).

2.1.1.3. Importancia y problemática del cultivo

La cosecha de ajo en México se da en el mes de Septiembre, posterior a este proceso, los productores buscan almacenar su producto tanto para comercializarlo en fresco como para sembrarlo en la siguiente temporada (Marzo-Abril). Gran parte del volumen de ajo producido se destina al mercado de

exportación, lo cual genera una importante entrada de divisas para el país (Mercado, 2002).

A pesar de la relativa importancia que tiene este cultivo en los países de América y el resto del mundo, existen pocos antecedentes y programas de mejoramiento genético que impulsen la actividad, lo que obliga a plantear estrategias de desarrollo y transferencia de tecnología que permitan revertir la caída de la superficie cultivada y disminución de rendimientos (Izquierdo *et al.*, 1992).

Además, las fertilizaciones y técnicas inadecuadas de control de patógenos, mal manejo en poscosecha de los bulbos (que servirán como material de siembra), y ausencia de cultivares normalizados, son las causas de mayor incidencia de enfermedades en el ajo (Izquierdo *et al.*, 1992), pues éste frecuentemente se ve afectado por diferentes enfermedades fungosas y bacterianas (Burba, 1992).

A pesar de que el ajo es una planta de reproducción asexual, en las poblaciones existe una determinada variabilidad genética (Biderbost *et al.*, 1985, citado por Heredia, 2000) generada por mutaciones génicas y alteraciones estructurales en cromosomas, acumuladas por varias generaciones (Broetjes y van Harten, 1978; Koul *et al.*, 1979; Hartmann y Kester, 1986, citados por Heredia Zepeda y Heredia García, 2000) y posiblemente también se presenta en esta especie la variación somática (Heredia, 1997).

Se cree que en el genoma del ajo puede existir una región específica que es extremadamente susceptible a mutar (Al Zahim, 1999). Es importante destacar que la variabilidad que se presenta en el ajo se ve reflejada en las diferencias al interior de una misma variedad en lo que respecta a la época de madurez, letargo, requerimientos de frío, tamaño del bulbo, número de bulbillos, color de la hoja protectora y facilidad de emitir escapo floral, entre otras.

A causa de la ausencia de reproducción sexual en el ajo, no se tiene la posibilidad de producir híbridos, por lo que el único método utilizado hasta la fecha para realizar mejoramiento genético ha sido el de selección, el cual explica la variación existente en la población (Heredia Zepeda y Heredia García, 2000).

En referencia al mejoramiento genético, en el INIFAP, Campo Experimental Bajío, se han seleccionado clones de ajo con características superiores a las de la

población original. Los criterios de selección más importantes han sido el rendimiento y la calidad del bulbo. Entre las principales características de calidad del bulbo, consideradas por el INIFAP, destacan: tamaño del bulbo y bulbillos (dientes), número de bulbillos, color de las cubiertas protectoras, forma y peso del bulbo y sanidad (Heredia, 2000).

Entre las principales selecciones que se han llevado a cabo en dicho campo se encuentran las de la variedad de ajo Chileno, de la que se obtuvieron seis clones (selecciones individuales) y dos compuestos (selecciones masales). De las selecciones masales surgió Chileno Compuesto 1 y de las individuales Chileno Vikingo-1, Chileno Vikingo 2 y Chileno Apaseo. También se llevó a cabo selección a partir de la variedad Taiwán y después de seis ciclos y dos ensayos de rendimiento, se efectuaron ocho selecciones más, generándose las variedades Tacátzcuaro, Tingüindín, Tocumbo, Texcoco, Huerteño, Chapingo-94, INIFAP-94 y Celayense. Después de un ciclo más, se hizo un tercer ensayo de rendimiento donde surgen las variedades Tacátzcuaro Especial y Pebeco (Heredia Zepeda y Heredia García, 2000).

De igual manera, en el Campo Experimental de Pabellón CEPAB, del INIFAP, se llevó a cabo un programa de mejoramiento genético de ajo blanco, para evitar la disminución de los rendimientos de este cultivo en Aguascalientes, debido a una mala selección de semilla. El mejoramiento se basó en un procedimiento de selección individual a partir de bulbos de ajo Perla y California de distintas parcelas comerciales, colectando aquellos con las mejores características de rendimiento, y calidad. Las *semillas* se reprodujeron durante el ciclo otoño-invierno 1995-96 y, después de este ciclo, se obtuvieron 28 genotipos de ajo Perla y siete genotipos de ajo California (Macías, 2002).

Finalmente, otros dos últimos aspectos fundamentales de la problemática de este cultivo son los siguientes:

Existe un gran desconocimiento del origen y de la variabilidad genética de los materiales cultivados en nuestro país, pues las clasificaciones e identificaciones de ajo que se han realizado hasta el momento han sido generales y sólo con base en algunas características morfológicas y no a nivel molecular.

Por otra parte, el mercado nacional del ajo está siendo afectado por la entrada del ajo producido en China. Éste es producido por un fuerte programa de subsidios y un costo de mano de obra muy barato, lo que disminuye notablemente los costos de producción y permite que se pueda vender a precios extremadamente bajos, imposibles de igualar por el ajo que se produce en México (Mercado, 2002). Además, en el país se considera ilegal la introducción de ajo procedente de China y aún así, se tienen indicios de que al menos una parte del ajo que es introducido al mercado nacional proviene de ese país, y esto ocasiona un gran desaliento entre los productores, lo cual se refleja en una dramática caída de la superficie cultivada y de la producción durante los últimos años (Figura 2.4).

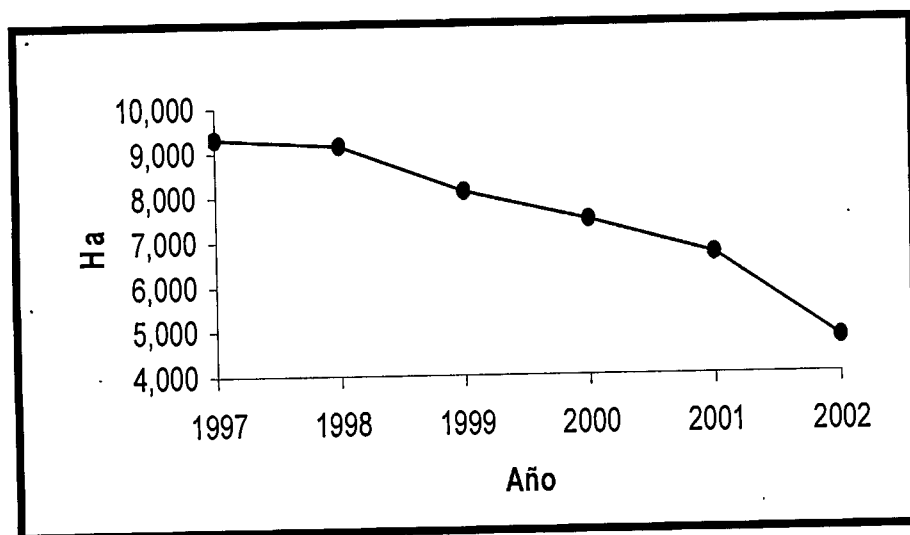


Figura 2.4. Evolución de la superficie cultivada de ajo en México durante los últimos seis años (Fuente: FAO, 2002).

Esta situación está obligando a los países afectados (entre ellos México) a desarrollar medidas de rastreo genético para evitar inundaciones de mercado por prácticas de *dumping*, para proteger a los productores nacionales.

Por ello, es sumamente importante contar con una herramienta que permita identificar el origen genético y geográfico de los materiales que se producen en México y que se importan de otros países.

2.1.2. Botánica del ajo

2.1.2.1. Clasificación taxonómica

En 1754 Carl Linnaeus dio el nombre de *Allium sativum* al ajo. La posición taxonómica del género *Allium* y géneros emparentados es aún materia de controversia. En clasificaciones iniciales dicho género fue ubicado en la familia *Liliaceae*, y hace aproximadamente 50 años, con base en la estructura de su inflorescencia, fue incluido en la familia *Amaryllidaceae*. En la clasificación taxonómica más reciente de las *Monocotyledoneae* propuesta por Hanelt (1990, citado por Heredia, 2000), el género *Allium* y sus parientes cercanos fueron incluidos en la familia *Alliaceae* (cerca a la *Amaryllidaceae*), con la siguiente jerarquía (Tabla 2.1) (Heredia, 2000):

Tabla 2.1. Clasificación taxonómica del ajo

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheofitae o espermatofitae</i>
Subdivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Monocotyledoneae</i>
Superorden	<i>Lilliflorae</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Alliaceae</i>
Tribu	<i>Allieae</i>
Género	<i>Allium</i>
Subgénero	<i>Allium</i>
Sección	<i>Allium</i>
Especie	<i>A. sativum</i>

(Heredia, 2000)

Hanelt (1990, citado por Heredia, 2000) reporta que el género *Allium* abarca más de 500 especies, las cuales son perennes, y son principalmente plantas con bulbos protegidos por capas membranosas, fibrosas o coriáceas.

Entre las especies del género *Allium* más populares y con mayor grado de domesticación, se encuentran las siguientes (Tabla 2.2):

Tabla 2.2. Especies más domesticadas de la familia *Alliaceae*

Nombre científico	Nombre común
<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla
<i>Allium ascalonicum</i>	Chalote
<i>Allium porrum</i> L.	Poro
<i>Allium sativum</i> L.	Ajo

(Heredia, 2000)

Takagi (1990, citado por Heredia, 2000) menciona que los taxónomos han reconocido por lo menos cuatro variedades botánicas dentro de *Allium sativum* L., que son (Heredia, 2000):

- *A. sativum* L. var. *sativum*
- *A. sativum* L. var. *ophioscorodon* (Link) Doll.
- *A. sativum* L. var. *pekinense* (Prokh) Maekawa
- *A. sativum* L. var. *nipponicum* Kitamura.

Las variedades botánicas más conocidas y comercializadas son la *ophioscorodon* y la *sativum*.

La caracterización exo-morfológica por tamaño, forma y color del bulbo, porte vegetativo, forma, número y color de bulbillos, por varios ciclos de cultivo, ha demostrado ser un sistema eficiente de evaluación del material genético de ajo (Burba *et al.*, 1988); sin embargo, no siempre ha permitido una clara diferenciación entre tipos comerciales, ecotipos, biotipos y genotipos.

2.1.2.2. Anatomía

De acuerdo con Purseglove (1985), el ajo es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura, y de raíces adventicias superficiales, bulbos compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas secas y delgadas que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente activas (hojas aéreas), y bulbillos o dientes formados de yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes. Las hojas son aplanadas, sólidas, con 2.5 cm o menos de ancho, plegadas en forma longitudinal; éstas varían en número, pero generalmente son menos de 10. Algunos clones no producen

inflorescencias o escapo floral. Cuando se produce el escapo floral, éste es redondo, sólido y enrollado al principio. En la inflorescencia se producen pequeños bulbillos, las flores varían en número y algunas veces están ausentes. Muy rara vez producen semillas.

El grado de desarrollo de la inflorescencia varía considerablemente con el genotipo y con el estado del escapo floral (Figura 2.5.):

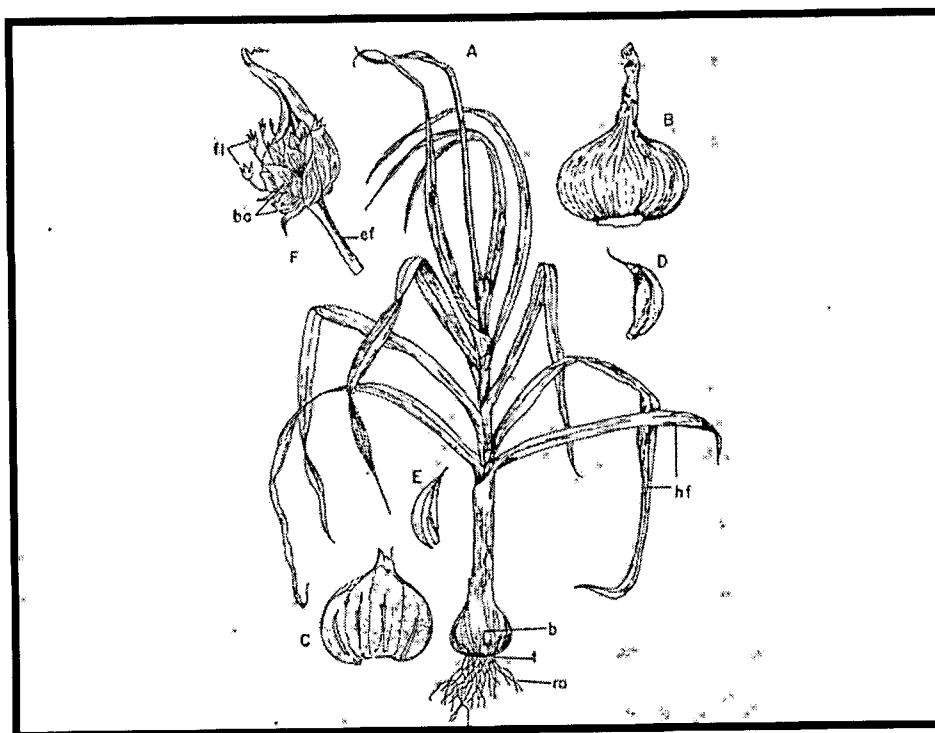


Figura 2.5. Planta joven de ajo

Raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas funcionarias (hf), (B) bulbo, (C) sección longitudinal del bulbo, (D) bulbillo o diente, (E) sección longitudinal del bulbillo, (F) inflorescencia, escapo floral (ef), bulbillos aéreos (ha) y flores (fl). (Purseglove, 1985).

Según Bell y Bryan (1991), el **bulbo** del ajo consiste de una serie proximal de hojas escamoso-membranosas de protección que no cubren las yemas; otra serie de hojas similares que cubre cada una de ellas (bulbillos), y más distalmente un número de hojas funcionales (Heredia, 2000).

Los **bulbillos** simples o "dientes normales", principales órganos de propagación de esta especie, son yemas vegetativas en estado de letargo cuando

recién son cosechados, que se originan en la axila de las hojas fértiles o dentadas y apoyados sobre el tallo anual o "disco". Cada diente está compuesto por una serie de hojas modificadas, como se ilustra en la Figura 2.6:

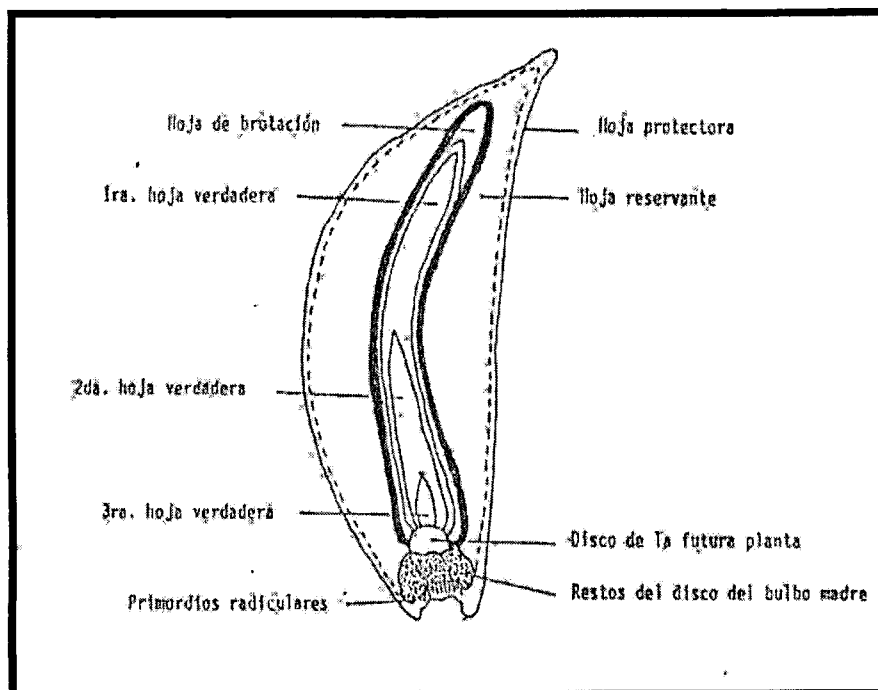


Figura 2.6. Estructura del bulbillito

La hoja externa, denominada *protectora*, consiste sólo en una vaina foliar lignificada y seca, ésta es la responsable del color del diente que caracteriza a los cultivares y que varía desde el blanco níveo al púrpura, pasando por una gama que incluye tintes parduscos. Continúa hacia adentro otra hoja sin lámina, de gran espesor, denominada hoja reservante o de almacenamiento, que representa entre 90 y 95 % del peso total del diente, y que envuelve a la hoja de *brotación* o "germinadora", que es delgada y sin lámina. Ésta se desarrolla durante el almacenamiento y puede ser utilizada como indicadora del letargo.

Protegidas por la hoja de brotación, se encuentran varios primordios, llamados hojas foliares o verdaderas y que son responsables de la arquitectura normal de la planta. Todas las hojas que conforman el diente están asentadas sobre un pequeño disco (tallo anual o "plato"). Este pequeño disco posee primordios

radicales que originarán la raíz fascicular típica de esta especie (Izquierdo *et al.*, 1992).

2.1.2.3. Reproducción

Los cultivares de ajo son estériles y son propagados de forma vegetativa, a través del bulbillo o diente (Al-Zahim *et al.*, 1997).

En el escapo y tallo aéreo que emergen en algunos cultivares bajo ciertas condiciones ambientales, aparece en su extremo una inflorescencia que presenta generalmente bulbillos pequeños mezclados con flores. Estas flores generalmente abortan en estadios tempranos y no producen semillas verdaderas; sin embargo, bajo condiciones especiales, ciertos clones pueden llegar a hacerlo. Los bulbillos aéreos—muy abundantes en algunos clones— pueden ser utilizados como material de propagación, con algunas ventajas de costo y sanitarias, y hasta se menciona la posibilidad de lograr con ellos potenciales de rendimientos altos (Izquierdo *et al.*, 1992).

2.1.2.4. Ecofisiología

a. Fisiología del crecimiento

El crecimiento del ajo se extiende desde la brotación hasta el inicio de la bulbificación (en que ocurre el cese de crecimiento de las hojas). Para un crecimiento vigoroso, la planta requiere de temperaturas medias nocturnas inferiores a 16° C (entre 8° C y 20° C) y medias mensuales entre 13° C y 24° C. Temperaturas nocturnas elevadas (por encima de 20° C) promueven un crecimiento en forma de mata estrellada y de color amarillento.

El peso del “*diente semilla*”, función directa de la cantidad de sustancias de reserva, será decisivo sobre el patrón de comportamiento durante el crecimiento vegetativo de la planta (Izquierdo *et al.*, 1992).

Los dientes “semilla” de mayor tamaño, como ya se expresó, dan lugar a bulbos grandes y éstos poseen una tasa de conversión (peso del bulbo cosechado/peso del bulbillo plantado) menor que los bulbillos o dientes pequeños.

Los dientes pequeños son capaces de "convertir" mayor cantidad de biomasa, variando según el cultivar y, es por ello, que se puede aprovechar esta circunstancia en un programa de mejoramiento de producción de "semillas" (Izquierdo *et al.*, 1992).

b. Fisiología de la bulbificación

La dilatación del bulbo de ajo se produce cuando la temperatura media diaria es mayor de 18° C a 20° C, y cuando el fotoperiodo supera un umbral que es diferente para cada cultivar o genotipo. Cultivares adaptados a las regiones tropicales tendrían un umbral de entre 11 y 12 horas de luz (Izquierdo *et al.*, 1992).

El bulbo comenzará a formarse por un estímulo termo-fotoperiódico que puede caracterizarse a través de dos etapas. La primera llamada "inductiva" en que el frío o los días largos serían factores imprescindibles. En la segunda etapa, llamada "morfológica", las condiciones termo o fotoperiódicas son sólo capaces de modificar la velocidad del proceso de bulbificación (Izquierdo *et al.*, 1992).

Los ecotipos adaptados a las regiones subtropicales tienen bajos requerimientos de frío y fotoperiodo, produciéndose el estímulo para la bulbificación en época muy temprana, con apenas 11 horas de luz (junio-julio), lo que permite ingresar el producto temprano al mercado (septiembre-octubre). Generalmente estos genotipos son de mala presentación comercial. Por otro lado, aquellos cultivares adaptados a regiones australes tienen mayores requerimientos de frío y fotoperiodo que los anteriores y se consideran de mejores características de conservación y de buena presentación comercial (Izquierdo *et al.*, 1992).

c. Fisiología del letargo

El diente de ajo está imposibilitado de brotar y enraizar si es plantado inmediatamente después de la cosecha. Este fenómeno es llamado letargo o reposo. El letargo es el estado en el cual el crecimiento está aparentemente suspendido, pudiendo subdividirse en pre-latencia, latencia propiamente dicha y post-latencia o estado potencial de máximo crecimiento; este último coincide con lo que se denomina diente "semilla" fisiológicamente maduro. La salida de la latencia se

produce al cabo de un tiempo más o menos prolongado, dependiendo del genotipo (cultivar o clon), de la temperatura de almacenamiento de los bulbos, del tamaño del "diente", su posición en el bulbo madre, y todo factor que desde la senescencia del cultivo "madre" haya comprometido el desarrollo normal de esta etapa.

d. Fisiología de la brotación

El término del estado de latencia está caracterizado por una importante actividad de giberelinas libres y una disminución de giberelinas conjugadas en la hoja de reserva (Izquierdo *et al.*, 1992). Éstas se transportan hacia la yema, permitiendo su brotación. Simultáneamente se produce un traslado de hidratos de carbono desde la hoja de reserva y, es a partir de este momento, que la yema está en condiciones de brotar. Durante esta etapa predomina una activa división y alargamiento celular que provocan la expansión de la yema, la diferenciación de los primordios foliares y un activo crecimiento de las raicillas preformadas, presentes en la porción próxima del "diente semilla". Este estado se denomina generalmente "diente fisiológicamente maduro" o estado de pos-latencia y la temperatura puede modificar el patrón de crecimiento. La hoja de brotación o "germinadora" en esta etapa se abre paso a través del suelo que cubre al "diente", enterrado durante la plantación, formando un canal tubular por donde pasarán las hojas verdaderas. Cuando todo el conjunto de hojas llega a la superficie del suelo, la hoja de brotación reacciona frente a la luz e inhibe su crecimiento, mientras que las hojas verdaderas rompen su extremo y emergen. Posteriormente, la hoja protectora se desprende y descompone, mientras que las sustancias de reserva de la hoja reservante son aprovechadas por la planta durante las primeras etapas del crecimiento (Izquierdo *et al.*, 1992).

2.1.3. Cultivares

La caracterización de cultivares del ajo se ha basado en parámetros de tipo exo-morfológicos (tamaño y forma del bulbo y del babillo o diente, color de bulbo, porte vegetativo, número y color de dientes, etc.). Sin embargo, no siempre éstos han mostrado una clara diferenciación entre los tipos comerciales, ecotipos, biotipos, etc. El parámetro más utilizado para diferenciar variedades es el color; no obstante,

lo que habitualmente se describe es el color de la “epidermis de los dientes” y no el de la “epidermis de los bulbos”.

Debido a esta situación, el reconocimiento de los cultivares es confuso y ocurre con mucha frecuencia que un mismo clon recibe varias denominaciones locales o, en contrasentido, que clones diferentes lleven el mismo nombre en la misma región. La razón de esto seguramente podemos encontrarla en la profunda interacción que sobre el genotipo ejerce el ambiente, modificando no sólo la forma sino también el color, el porte, el número de “dientes”, etc.

Existen algunos intentos para establecer descriptores eficaces del ajo, como aquel que sugiere la utilización de descriptores fisiológicos, tales como la duración del período de letargo. Éste se encontraría directamente relacionado con los requerimientos de frío y fotoperíodo, la habilidad para emitir vara floral, y algunas características morfológicas y organolépticas, como la forma y color de los bulbos (Heredia, 2000).

2.1.3.1 *Clasificación de las variedades de ajo*

Existen varios tipos de clasificaciones de ajo de acuerdo a sus características morfológicas y fisiológicas, una de las más conocidas es la clasificación con base en el color del bulbo:

Grupo I (Violetas o asiáticos). Clones de muy corto período de letargo y ciclo vegetativo corto, con bajos requerimientos de frío y escasa necesidad de fotoperíodo largo. Constituyen variedades típicas de regiones tropicales o subtropicales, generalmente semi-erectas, con hojas anchas de color verde claro. Los falsos tallos (ramas) suelen aparecer engrosados a intervalos irregulares por la presencia de dientes laterales sobre la vara floral, la cual no alcanza a emerger. Los bulbos son medianos, con pocos dientes de gran tamaño y hojas envolventes muy gruesas de color pardo-violáceo o vinoso. Pertenecen a este grupo los genotipos ‘*Hsueh Chia*’ e ‘Indonesia Precoz’, de Argentina; los genotipos del tipo ‘*Chinese*’, de Brasil; y del tipo ‘Vikingo’, de México. Ya que los tipos ‘Vikingo’ provienen de la variedad ‘Chileno’, se considera dicha variedad también perteneciente a este grupo.

Grupo II (Rosados). Clones de corto período de letargo y ciclo vegetativo medio, con medianos a bajos requerimientos de frío y moderada necesidad de fotoperíodo largo. Las plantas son generalmente erectas, con hojas de ancho intermedio y color verde intenso, no manifiestan externamente pedúnculo floral, pero sí dientes laterales apoyados en la misma, en el falso tallo. Los bulbos son medianos a grandes y presentan un gran número de dientes irregulares de color rosado claro a violáceo. Están difundidos al norte del paralelo 32° LS, debido a sus escasos requerimientos de frío y fotoperíodo largo. Pertenecen a este grupo los genotipos 'Alpa Suquia', 'Rosado INTA' y poblaciones más o menos homogéneas conocidas como 'Nacional de Paraguay', 'Dourados' de Brasil y 'Rosa Siliciano' de Italia.

Grupo III (Blancos). Clones de período de letargo medio y ciclo vegetativo medio-largo, con requerimientos de frío medianos a altos y fotoperíodo largo. Las plantas en estado juvenil tienen los tallos débiles, incapaces de mantenerse erguidos, y se arrastran por el suelo sin enraizar en él. En estado adulto, las plantas son semi-erectas y no presentan escapo floral. Las hojas son anchas y de color verde cenizo, y los bulbos son grandes a muy grandes, generalmente irregulares, con hojas envolventes del bulbo y de protección de los dientes blanco níveo. Pertenecen a este grupo los genotipos 'Blanco Mendoza' de Argentina, 'California Early White' de EE.UU., 'Messidrome' de Francia y 'Bianco Piacentino' de Italia (Figura 2.7.).

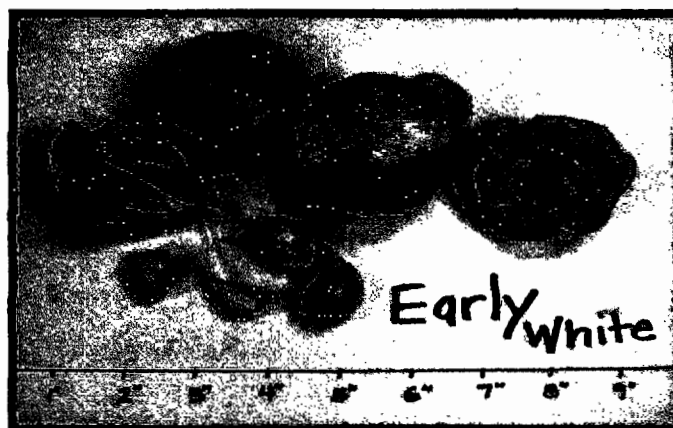


Figura 2.7. Ajo del tipo 'California Early White'.

Grupo IV (Colorados, Rojos y Morados). Clones de período de latencia y ciclo largos, con altos requerimientos de frío y fotoperíodo largos. Las plantas en estado adulto son generalmente semi-erectas, de desarrollo medio, con hojas de ancho intermedio a angostas. Presentan un escapo floral que emerge del falso tallo. Los bulbos son medianos a grandes, bien formados, de color externo blanco cuando seco, pero de dientes rojo púrpura con tintes violáceos o morados. Pertenecen a este grupo los genotipos 'Rojo Mendoza' y el tipo 'Valenciano' de Argentina, 'Roxo Perola de Cazador' y 'Quiteria' de Brasil, 'Rosso de Sulmona' de Italia y 'Rosado INIA' de Chile (Figura 2.8) (Heredia, 2000).



Figura 2.8. Ajo del tipo 'Rosado INIA'.

2.1.3.2. Principales cultivares en México

A continuación se mencionan las principales variedades de ajo que se siembran en El Bajío y algunas regiones de Zacatecas y Durango, de acuerdo al color del bulbo (Heredia, 2000):

- **Bulbo morado**
 - 'Chileno'
 - 'Chileno Vikingo-1'
 - 'Chileno Vikingo-2'
 - 'Chileno Apaseo'
 - 'Chileno Compuesto-1'

- 'Criollo Regional'
 - 'Napuri'
 - 'Pata de perro'
- **Bulbo jaspeado (blanco con líneas color morado)**
 - 'Taiwán'. Esta variedad genera otras diez:
 - 'Tacátzcuaro'
 - 'Tingüidin'
 - 'Chapingo-94'
 - 'Huerteño'
 - 'INIFAP-94'
 - 'Texcoco'
 - 'Tocumbo'
 - 'Celayense'
 - 'Tacátzcuaro Especial'
 - 'Pebeco'
- **Bulbo blanco (problemas de adaptación)**
 - 'Probajío' 1, 2 y 3 (derivadas del blanco de Egipto). Exportación
 - 'Blanco de Zacatecas'
 - 'Blanco de Durango'
 - 'Blanco de Ixmiquilpan'
 - 'Criollo de Aguascalientes'
 - 'Cristal'
 - 'Perla'

2.2. Estudio de la diversidad genética de las poblaciones

2.2.1. Concepto de diversidad genética

La diversidad genética es un componente fundamental de la biodiversidad, forma la base de la variación de las especies y del ecosistema y representa las

diferencias genéticas que existen entre los individuos de una especie en la expresión de una característica particular o un grupo de características (Arcade *et al.*, 2000).

Debido a que las especies están compuestas de poblaciones que existen una independiente de otra, la diversidad genética se da entre poblaciones de la misma especie y entre poblaciones de diferentes especies. La diversidad genética en las poblaciones basada en características morfológicas y morfométricas comunes es difícil de medir debido a que éstas se ven influenciadas por factores ambientales y, además, muchos genes pueden encontrarse involucrados en su expresión. La estimación de la diversidad genética por medio de marcadores moleculares supera este problema porque estas características moleculares tienen un componente no ambiental y sólo uno o muy pocos genes están involucrados en su expresión (Lattier *et al.*, 1996).

Los estudios de diversidad genética en poblaciones silvestres son diseñados para identificar los procesos que ocasionan los cambios en la evolución. Los marcadores genéticos del *locus* específico son cruciales en estos estudios pues presentan un gran potencial para la determinación de la diversidad genética "inter" e intrapoblacional, así como en programas de mejoramiento genético. Tales marcadores han sido ampliamente utilizados desde hace alrededor de treinta años, pero desde 1960, los avances tecnológicos han aumentado la variedad de nuevos métodos para estudiar la diversidad genética. A la par con estos avances, se ha dado un incremento exponencial en el número de estudios que reportan poblaciones con diversidad genética en una amplia variedad de organismos (Douglas *et al.*, 2000).

2.2.2. Marcadores genéticos

Un marcador genético es cualquier característica morfológica o molecular heredable que varíe entre individuos y es considerado como una característica descriptiva (Arcade *et al.*, 2000).

A continuación se presenta la clasificación general de los marcadores genéticos (Figura 2.9), en la que se observa la división de éstos en morfológicos y moleculares, a su vez, los marcadores moleculares pueden ser bioquímicos o basados en ADN.

Los marcadores basados en ADN pueden emplear PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o hibridación. De los que emplean PCR, hay aquellos que utilizan iniciadores de secuencia arbitraria, como es el caso de los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) o iniciadores con una secuencia específica, donde se encuentran los ISSR (secuencias interespecíficas) y los AFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados). Para los marcadores que están basados en hibridación se pueden citar a los RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) y los VTNR (repeticiones en tándem de número variable), mejor conocidos como minisatélites y microsátélites (González, 1999).

2.2.2.1. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos son características fenotípicas evaluables en cualquier etapa del ciclo de la vida de un individuo, son fáciles de medir, evidentes, rápidos y baratos. No obstante, tienen la desventaja de que son limitados en número (Simpson, 1999), no son estables, presentan baja heredabilidad y, principalmente, se ven afectados por las condiciones ambientales (Cerna, 1999).

2.2.2.2. Marcadores moleculares

Se define como marcador molecular, a toda entidad variable de naturaleza bioquímica/molecular susceptible de ser asociada con la variabilidad de algún parámetro morfológico/agronómico (Campos, 1995).

La ventaja que proveen los marcadores moleculares es su capacidad para utilizar la información que, de manera natural, brinda el polimorfismo en las poblaciones (Simpson, 1999).

Los marcadores moleculares pueden ser bioquímicos o basados en ADN, como se indica en la Figura 2.9.

a. Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos más utilizados son las isoenzimas y algunos otros compuestos como los terpenoides, antocianinas, flavonoides, glucósidos, etc. Éstos presentan algunas desventajas, como el ser limitados en número y el poseer

baja frecuencia de polimorfismo. Además, las técnicas utilizadas para analizar estas moléculas son costosas y requieren de mucho tiempo, por lo que no son eficaces para el análisis de rutina de grandes poblaciones; incluso son influenciados por el medio ambiente (Simpson, 1999).

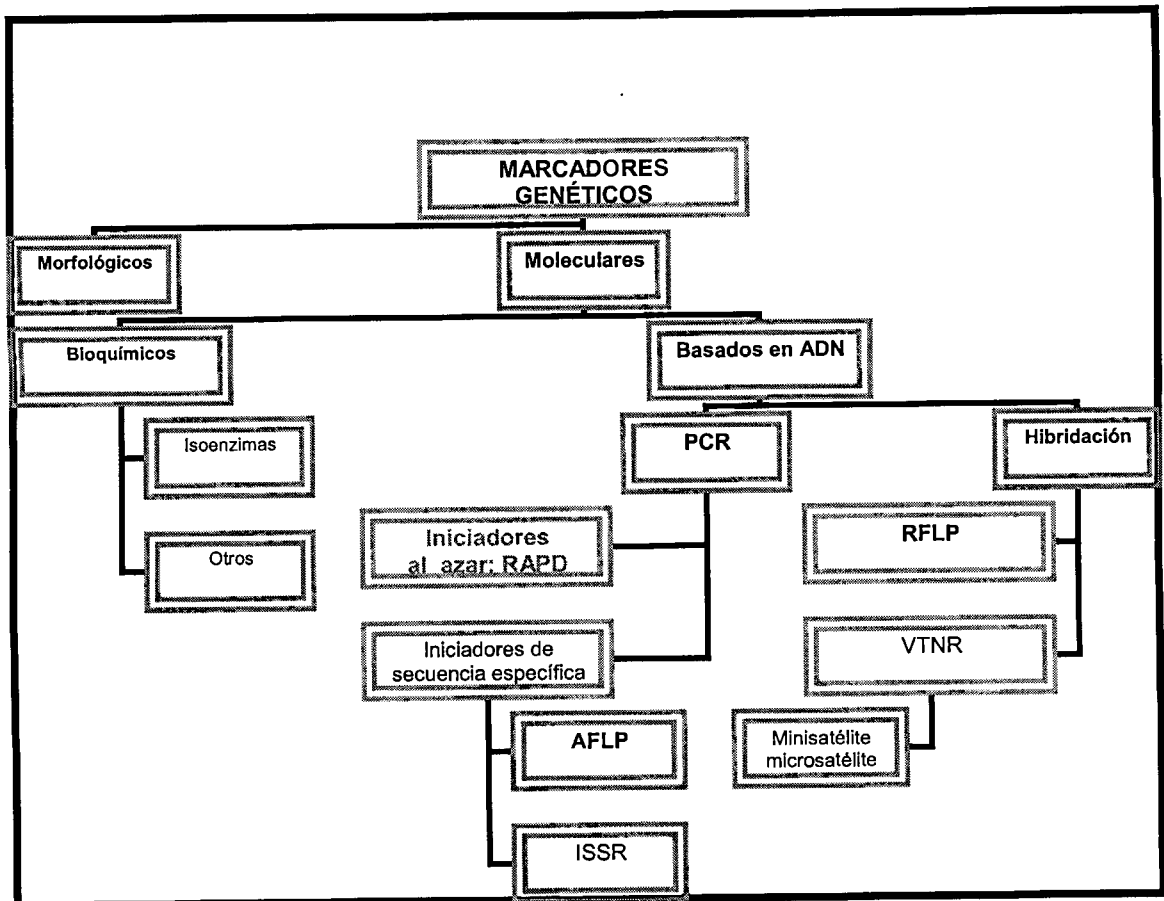


Figura 2.9. Clasificación de los marcadores genéticos.

La aplicación de los marcadores bioquímicos a la población biológica comenzó con los estudios de Harris (1966), Hubby y Lewontin (1966) y Lewontin y Hubby (1966). Estos estudios, particularmente los últimos, usaron variación de isoenzimas para examinar dos modelos de selección natural: el modelo clásico y el de selección balanceada. Recientemente Lewontin (1974, 1991), citado por Douglas *et al.* (2000) argumentó que los estudios de isoenzimas no han ayudado a distinguir

eficientemente un individuo de otro, sin embargo, han tenido una gran influencia en el desarrollo de la Genética como disciplina.

b. Marcadores basados en ADN

Los marcadores basados en ADN pueden explorar regiones de ADN que se expresen (genes) o fragmentos de ADN cuya función no se conoce, pero que presentan un patrón heredable (Arcade *et al.*, 2000).

Muchas poblaciones naturales manifiestan altos niveles de polimorfismo debido a pequeños cambios en las secuencias del ADN, tales como mutaciones puntuales, sustituciones de bases, inserciones, deleciones y traslocaciones. Tales polimorfismos y los marcadores basados en ADN asociados, son heredados mendelianamente, además, son muy abundantes y se encuentran en todo el genoma (Simpson, 1999).

Algunos usos de los marcadores basados en ADN son la caracterización e identificación de germoplasma, estudio de relaciones entre cultivares, eliminación de duplicados, mejoramiento asistido, huella genética, protección de derechos de siembra de nuevos cultivares, entre otros (Simpson, 1999).

A continuación se presentan algunos de los marcadores basados en ADN de mayor uso.

b₁. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Este tipo de marcadores detecta las diferencias específicas en una secuencia de ADN, las cuales pueden originarse en forma natural por mutaciones que alteran los tamaños de los fragmentos obtenidos por digestión de la secuencia de ADN con una endonucleasa de restricción (Michelmore y Hulbert, 1987).

Los RFLP han sido la herramienta clave para los estudios de mapeo genético desde sus inicios, hace casi dos décadas. Las sondas para el análisis de *loci* nucleares desconocidos se obtienen de ADNc o librerías genómicas. De estos bancos de datos, se seleccionan sondas de ADN para hibridar secuencias de ADN. En la práctica estas sondas hibridan uno o dos fragmentos de restricción. Parece no

haber correlación entre el tamaño de la sonda y los niveles de polimorfismo (Douglas *et al.*, 2000).

Los *loci* RFLP son codominantes, exhiben niveles intermedios de variabilidad alélica y son continuamente utilizados con éxito en diferentes especies (Douglas *et al.*, 2000).

El ADN completo es cortado con enzimas de restricción, posteriormente se desnaturaliza y luego se hibrida con la sonda que detecta fragmentos de ADN de diferente tamaño (Alberts *et al.*, 1994):

Los sitios de restricción, distribuidos en diferentes puntos del genoma, al ser expuestos a enzimas de restricción, originan una serie de fragmentos de ADN que difieren en longitud y que pueden ser separados por electroforesis, transferidos a un soporte sólido y expuestos a una sonda radioactiva bajo condiciones que promueven la hibridación ADN-ADN (Southern, 1975). Ello permite visualizar el fragmento específico identificado por la sonda (Rivera *et al.*, 1991).

Este tipo de marcadores tiene la desventaja de que requiere grandes cantidades de ADN, algunos protocolos requieren uso de radiactividad, el tiempo de análisis es largo y su costo elevado (Douglas *et al.*, 2000).

A continuación se presenta un diagrama que ilustra el principio y el mecanismo de los RFLPs (Figura 2.10).

b₂. Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Esta técnica está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN digerido. El ADN se digiere con dos diferentes enzimas de restricción, como son EcoRI y MseI. Posterior a la digestión, se ligan adaptadores moleculares específicos, los oligonucleótidos que se utilizarán como iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa corresponderán a los adaptadores moleculares (Simpson, 1999).

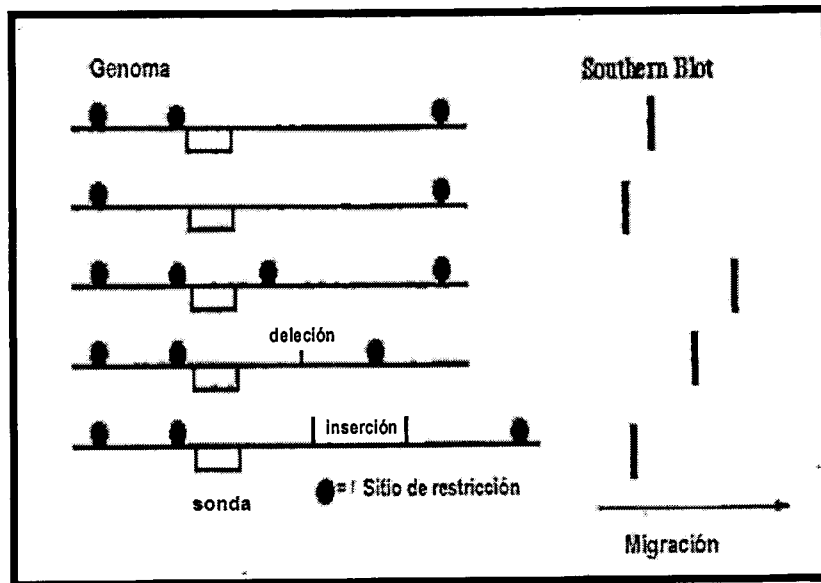


Figura 2.10. Mecanismo de los RFLPs.

La técnica de AFLP involucra tres pasos: a) restricción del ADN y ligación o unión de los adaptadores de los oligonucleótidos; b) amplificación selectiva de conjuntos de fragmentos de restricción y, c) análisis en un gel de los fragmentos amplificados (Vos *et al.*, 1995).

Se considera una técnica con buena reproducibilidad y que requiere una pequeña cantidad de ADN (Douglas *et al.*, 2000), pero tiene la desventaja de que exhibe niveles intermedios de variabilidad y el que los fragmentos homólogos no se conservan a través de grandes distancias de evolución (Douglas *et al.*, 2000).

Con esta técnica se obtiene un mayor número de bandas, en comparación con otras técnicas (Lin *et al.*, 1996, Ipek *et al.*, 2003).

Un uso secundario de estos marcadores es la detección de clones genómicos (Vos *et al.*, 1995; Ipek *et al.*, 2003).

En la Figura. 2.11 se presenta el mecanismo AFLP.

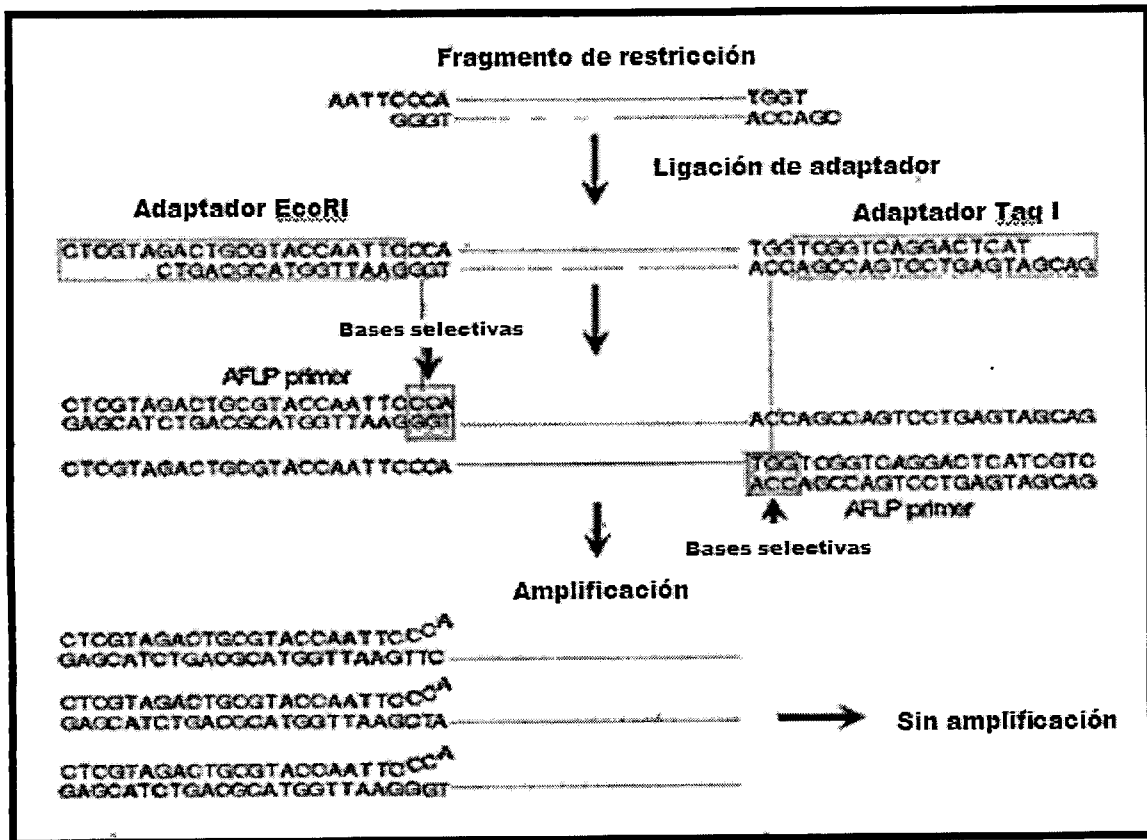


Figura 2.11. Mecanismo de los AFLPs.

b₃. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Este método no requiere conocimiento previo de la secuencia total del ADN para amplificar un fragmento específico, la generación de marcadores RAPD puede ser considerada como "la práctica de PCR sin una pista". Debido a la facilidad de obtener datos a partir de RAPD, este método ha sido empleado en infinidad de estudios en plantas (Waugh y Powell, 1992; Bachmann, 1994; Nybom, 1994; Smith y Williams, 1994; Sobral y Honeycutt, 1994; Weising *et al.*, 1995; Karp *et al.*, 1996; etc.). El método, publicado en 1990 (Williams *et al.*, 1990) utiliza un solo oligonucleótido de secuencia arbitraria. Un producto PCR es producido cuando, a una temperatura de hibridación (alineamiento) apropiada, el oligonucleótido se une a sitios en cadenas opuestas del ADN que están dentro de una distancia amplificable, generalmente menos de 3,000 pares de bases.

El polimorfismo detectado por estos marcadores en diferentes individuos se debe a mutaciones o cambios en la secuencia del ADN en las regiones complementarias al oligonucleótido o bien, en las secuencias cercanas a los sitios de unión (Simpson, 1999; Douglas *et al.*, 2000).

El análisis RAPD usa oligonucleótidos cortos (comúnmente de 10 pares de bases) y temperatura constante de alineamiento (generalmente 34 a 37° C). Los productos resultantes de la amplificación son separados en un gel de agarosa a 1.5 – 2 % y teñidos con bromuro de etidio (EtBr). Las bandas discretas que aparecen en el gel son contadas y su presencia o ausencia se registra como caracteres binarios en una matriz.

Existen variaciones de este protocolo y éstas incluyen modificaciones en el perfil de amplificación, secuencia de los oligonucleótidos, tamaño de éstos, métodos alternativos en la resolución de los fragmentos, etc.

Douglas *et al.* (2000) mencionan que el uso amplio de los RAPDs puede ser atribuido a que:

- No hay requerimiento del conocimiento de la secuencia de ADN a estudiar.
- Se utilizan pequeñas cantidades de ADN (aproximadamente 25 ng por reacción).
- La técnica requiere de poco equipo en el laboratorio y es más simple que los RFLPs o microsatélites.
- No necesita pasos previos a su uso, como en los RFLPs, en donde se lleva a cabo la construcción y estudio de una biblioteca genómica.
- La detección de las bandas en el gel no es radiactiva.
- Se obtiene una buena cantidad de marcadores usando oligonucleótidos de fácil disponibilidad.
- Su carácter "universal" combinado con muchos *loci* amplificados, incrementa la velocidad con la cual los marcadores son estudiados.

Existen algunas limitantes de los RAPDs, como pueden ser: presencia de ligeras desviaciones de los patrones de la herencia Mendeliana estricta causadas por

artefactos, variaciones, bandas organelares, interacciones epigenéticas o problemas de detección de homología (Douglas *et al.*, 2000).

Los principales pasos del mecanismo de los RAPDs se ilustran en la Figura 2.12.

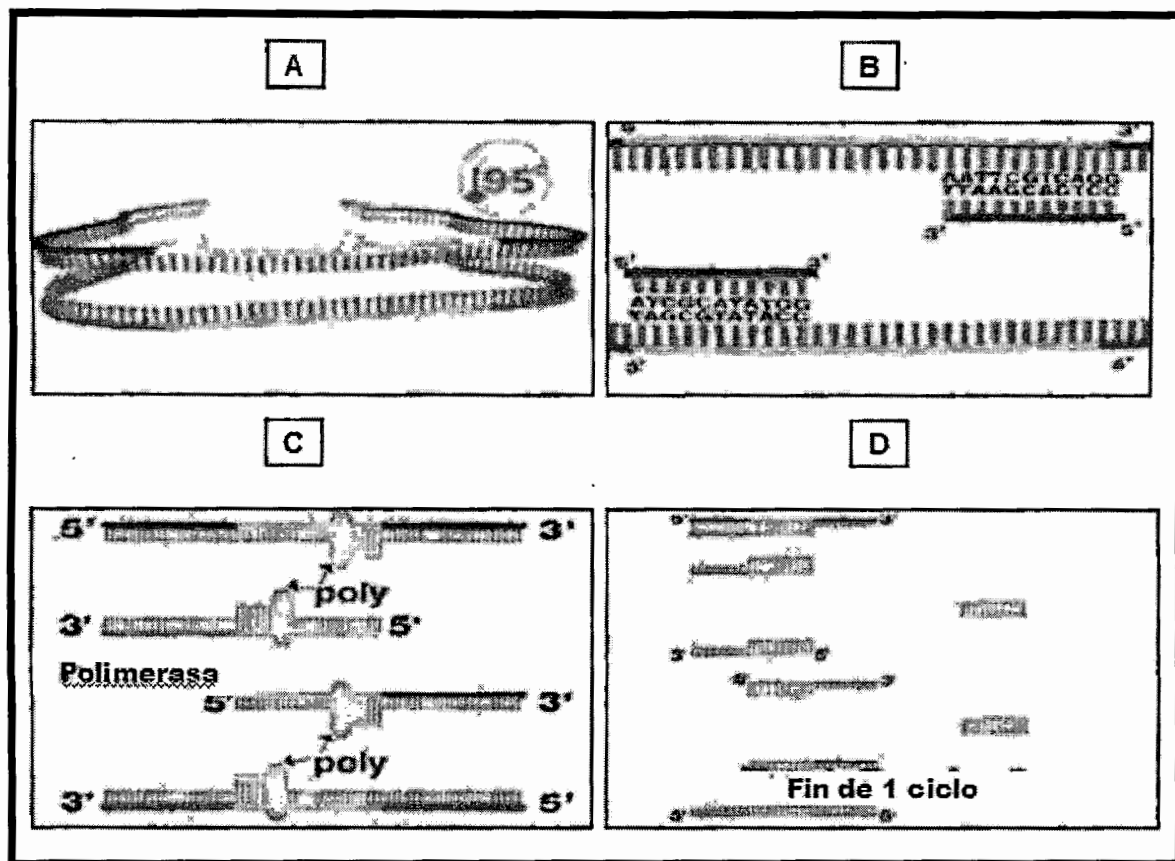


Figura 2.12. Mecanismo de los RAPDs.

- A. Paso 1: Desnaturalización del ADN. Temperatura entre 94-95° C
- B. Paso 2: Unión del oligonucleótido al ADN al azar (alineamiento o hibridación) aproximadamente de 35° C.
- C. Paso 3: Alargamiento o elongación. Temperatura aproximada de 72° C.
- D. Obtención de productos PCR (fragmentos amplificados), por ejemplo al final del ciclo 3.

2.2.3. Algunos trabajos de análisis RAPD para estudiar de la diversidad genética y reconocer el origen geográfico en ajo y otras especies.

Diversos investigadores han estudiado la diversidad genética en ajo utilizando RAPD: Bradley *et al.* (1996) analizaron 20 cultivares de ajo australiano y lograron obtener una clara diferenciación de los mismos. Shasany *et al.* (2000), por

su parte, llevaron a cabo un estudio similar con 23 cultivares de ajo de India, encontrando una elevada variación entre dichos cultivares. Peiwen *et al.* (2001) emplearon marcadores RAPD para analizar 31 cultivares de ajo, y encontraron una evidente diferenciación genotípica, concluyendo que el análisis RAPD representa una herramienta útil y eficiente para clasificar e identificar materiales genéticos de ajo. Análisis semejantes han sido desarrollados por Eom y Lee (1999) e Ipek *et al.* (2003) en cuatro y 45 genotipos de ajo, respectivamente.

Este tipo de marcadores ha sido también de utilidad en la identificación de genotipos de otras especies del género *Allium*, como es el caso de la cebolla (Wilkie *et al.*, 1993; Havey *et al.*, 1996) y el chalote (Shigyo *et al.*, 2002).

Además, han tenido gran aplicación en estudios de diversidad genética en otros cultivos como la manzana (Nnadozie *et al.* 2001; González, 2002), fresa (Zebrowska y Tyrka, 2003), plátano (Visser, 2000), coliflor, brócoli (Hu y Quiros, 1994), tomate (Nienhuis y Santos, 1994), lenteja (Sharma *et al.*, 1995), entre muchos otros.

Etoh y Hong (2001) utilizaron los marcadores RAPD en 20 clones de ajo para relacionar la presencia de ciertas bandas generadas por éstos con la producción de polen en clones de ajo fértil.

Los marcadores RAPD han sido empleados para detectar, con ayuda de análisis citológico, la existencia de variación somaclonal en 35 plantas de ajo. Además, el análisis RAPD ha generado clasificaciones de materiales de esta especie, de acuerdo a la producción de escapo floral, y la agrupación del precursor del ajo conocido como *A. longicuspis* con la variedad *ophioscorodon*, lo cual confirmó la cercanía taxonómica entre estas dos (Al-Zahim *et al.*, 1997, 1999).

Maas y Klass (1995) analizaron una colección de 48 cultivares de ajo de Asia Central mediante RAPD con el fin de clarificar esquemas antiguos de clasificación, como consecuencia de sus resultados, propusieron una clasificación de cuatro grandes grupos, concluyendo que el origen y diseminación de este cultivo se encuentran relacionados con la distribución geográfica y las distancias genéticas de los cultivares; además, aseveran que, de acuerdo a sus resultados, el análisis RAPD

provee una representación cuantitativa y detallada de la diversidad genética y de las distancias en un grupo de cultivares.

En el mismo sentido que el trabajo anterior, Choi *et al.* (2003) examinaron recientemente 75 clonas de ajo a través de RAPD, obteniendo una clasificación de estos materiales en dos grandes grupos, el primero conformado por las clonas asiáticas, y el segundo, por las clonas europeas, americanas y rusas. Además obtuvieron un alto nivel de similitud entre las clonas procedentes de Corea, pertenecientes al primer grupo, lo cual revela una tendencia de agrupación acorde al origen geográfico principalmente.

En los últimos años, México está importando ajo de países de Sudamérica, como Chile y Argentina, pero, aunado a esta situación, se tienen señales de que se están introduciendo materiales de ajo de forma ilegal de China, ya sea directamente, o a través de triangulaciones con estos países sudamericanos. Además, el precio al que se introducen estos materiales es notablemente inferior al que priva en el mercado nacional, lo que ocasiona graves problemas en la producción y comercialización de esta hortaliza (Mercado, 2002).

De ahí que sea factible utilizar métodos como los marcadores moleculares RAPD para identificar el origen de los cultivares de ajo y evitar este tipo de prácticas.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad genética de algunas poblaciones de ajo (*Allium sativum* L.) cultivadas en México y el origen de diversos materiales de importación, utilizando marcadores moleculares basados en ADN de tipo RAPD.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) para ajo en el laboratorio.
- Seleccionar aquellos oligonucleótidos que proporcionen mayor número de bandas polimórficas y adecuada resolución.
- Identificar el polimorfismo genético entre muestras de ajo cultivadas en México.
- Realizar una comparación genética de los cultivares establecidos en el país y muestras de importación para identificar el origen geográfico de dichos materiales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estrategia experimental

En la Figura 3.1 se presenta el diagrama de flujo de las etapas de que constó el presente trabajo de investigación.

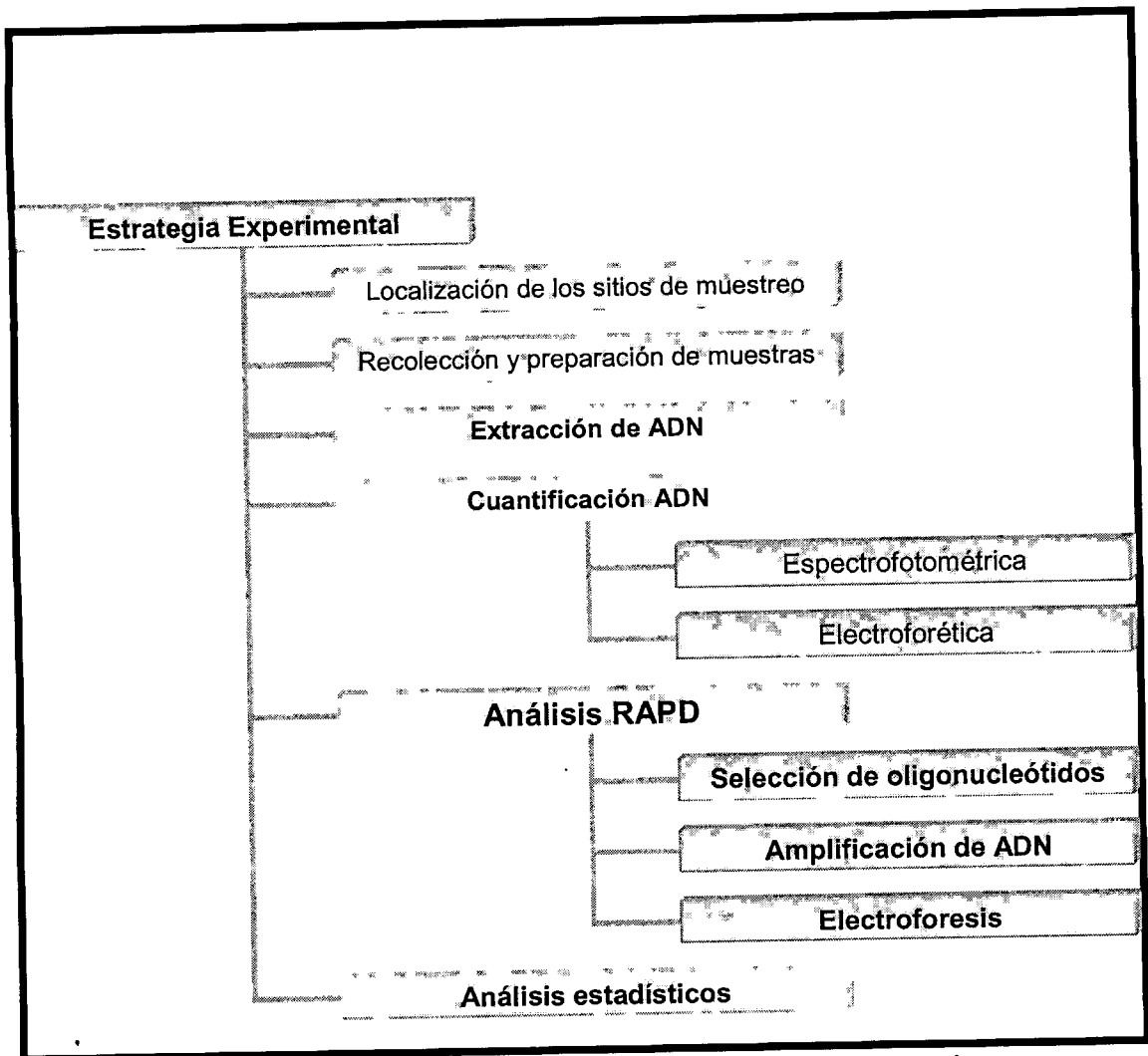


Figura 3.1. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

3.2. Material biológico utilizado

Se utilizaron 27 muestras de bulbos de ajo, 17 de ellas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Agrícola Experimental Bajío, tres fueron donadas por productores y las siete restantes se obtuvieron mediante colectas en la Central de Abastos de Querétaro. Algunas de las muestras utilizadas se presentan en la Fig. 3.2, y el número de identificación, el nombre asignado, el origen y el color del bulbo de todas ellas, se detallan en la Tabla 3.1. Algunas características morfológicas y fisiológicas de los distintos materiales utilizados se enlistan en el Anexo 1.

Las muestras proporcionadas por el INIFAP forman parte de una colección de germoplasma, y representan a algunas de las variedades más importantes que se comercializan en el país. Los nombres 'Chino', 'Coreano', 'Singapur' indican la procedencia de los materiales. La muestra 'Chileno' ya es cultivada en México desde la década de los '60, mientras que la muestra 'Taiwán', procedente de este país, desde 1978. El resto de las muestras proporcionadas por INIFAP llevan en su mayoría nombres de diferentes regiones del país (Heredia, 2000).

De las tres muestras donadas por productores de la región ('Probajío 74', 'Chileno 2' y 'California 3'), las dos primeras provienen de la Empacadora Arnime S.A. de C. V. de Cortazar, Guanajuato, y la última de los Hnos. Narváez A. de Pabellón de Arteaga, Aguascalientes.

En lo que respecta a las muestras colectadas en la central de abastos, el criterio de selección empleado fue el que se tratara de muestras de importación o sospechosas de tener proveniencia de China, Chile o Argentina (países involucrados en posibles prácticas de *dumping*). 'Mendoza 1' y 'Mendoza 2' son de importación de dicha región de Argentina, 'Chileno 2' es de importación de Santiago de Chile, 'Oregon', 'Loreto' y 'Xochimilco' son muestras que llevan el nombre de esas regiones de EE.UU. y México, pero mediante entrevistas con los comerciantes de la central de abastos, se tuvo conocimiento de una probable procedencia ilegal de China de éstas últimas. Las muestras 'California 1' y 'California 2' son de importación de EE.UU. (y, al igual que 'California 3', pertenecen supuestamente a esta variedad).

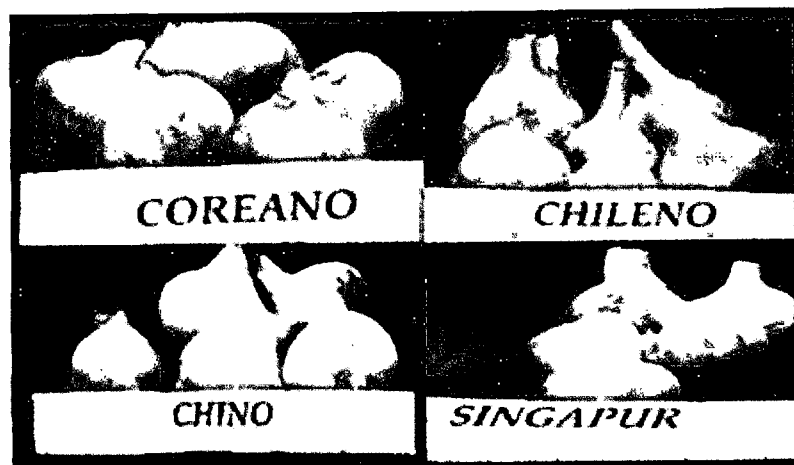


Figura 3.2. Algunas de las muestras empleadas en este estudio.

Tabla 3.1. Identificación y localización de las muestras

No.	Nombre	Fuente	Color
1	'Chileno'	INIFAP	Morado
2	'Texcoco'	INIFAP	Jaspeado
3	'Huerteño'	INIFAP	Jaspeado
4	'Tingüindín'	INIFAP	Jaspeado
5	'Taiwán'	INIFAP	Jaspeado
6	'Chino'	INIFAP	Blanco
7	'Chapingo-94'	INIFAP	Jaspeado
8	'Chileno Apaseo'	INIFAP	Morado
9	'Inifap-94'	INIFAP	Jaspeado
10	'Tocumbo	INIFAP	Jaspeado
11	'Tacátzcuaro Especial'	INIFAP	Jaspeado
12	'Coreano	INIFAP	Blanco
13	'Chileno Vikingo 1'	INIFAP	Morado
14	'Tacátzcuaro'	INIFAP	Jaspeado
15	'Pebeco	INIFAP	Jaspeado
16	'Celayense'	INIFAP	Jaspeado
17	'Singapur'	INIFAP	Jaspeado
18	'Probajío-74'	Empacadora Arnime	Blanco
19	'Mendoza 2'	Central de Abastos	Blanco
20	'Mendoza 1'	Central de Abastos	Blanco
21	'Loreto'	Central de Abastos	Jaspeado
22	'Oregon'	Central de Abastos	Jaspeado
23	'California 2'	Central de Abastos	Blanco
24	'Xochimilco'	Central de Abastos	Jaspeado
25	'California 1'	Central de Abastos	Blanco
26	'Chileno 2'	Empacadora Arnime	Rosado
27	'California 3'	Hmnos. Narvéez	Blanco

3.3. Colecta, almacenamiento y preparación de las muestras

Se colectaron seis bulbos de cada cultivar y se transportaron en bolsas de papel del sitio de la colecta hasta el laboratorio. Posteriormente se sometieron a ruptura de latencia en una cámara frigorífica a 15° C y 90 % de humedad relativa, el tiempo necesario para que el brote se desarrolle completamente dentro del diente (López, 2000). Después de lograr lo anterior, se procedió a lavar las raíces con agua potable, con el fin de eliminar impurezas del subsuelo.

Posteriormente, los bulbos fueron colocados en charolas de plástico conteniendo agua a un nivel de 1 cm. de altura (Lin y Yao, 1995), el tiempo necesario para obtener brotación de tejido foliar joven de aproximadamente 20 a 30 cm. de altura (Figura 3.3) (Ipek *et al.*, 2003). Finalmente, una muestra de tejido foliar se tomó de tres plantas de cada genotipo y se almacenó inmediatamente en un ultracongelador REVCO a -80° C, hasta su utilización.

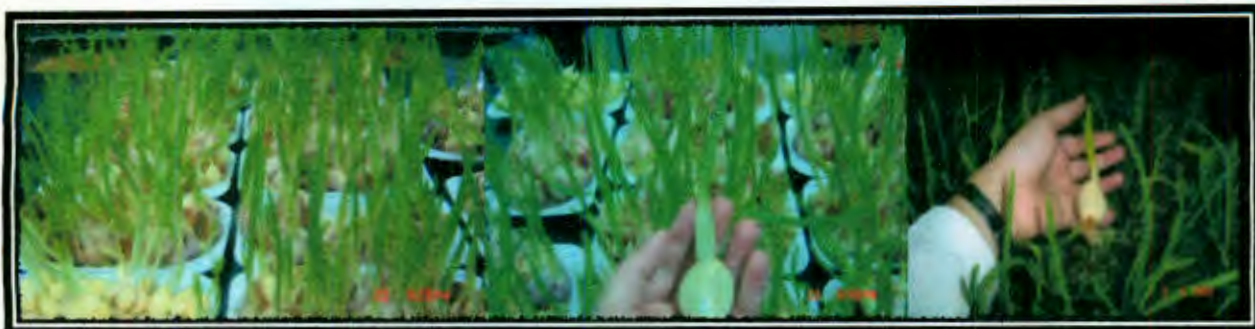


Figura 3.3. Preparación de las muestras de tejido foliar.

3.4. Extracción y purificación del ADN

Para la extracción del ADN se llevó a cabo una prueba previa para determinar el estado de desarrollo del brote foliar que proporcionara la mayor concentración de ADN. Se probaron tres tratamientos a) brote interno (sin emerger del diente), b) brote externo de 5-10 cm y c) brote de 20-30 cm (Figura 3.4). Cabe señalar que se llevó a cabo una homogenización de todo el brote y de éste se tomó la muestra requerida para la prueba.

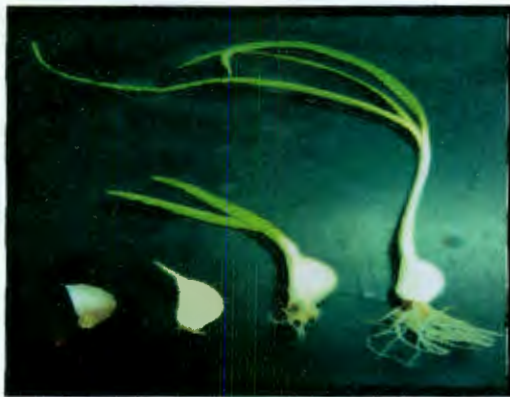


Figura 3.4. Diferentes estados del desarrollo de los brotes de ajo

De izquierda a derecha: brote interno, brote emergiendo del diente, brote de 5-10 cm y brote de 20-30 cm.

El proceso de extracción del ADN se realizó con base en una modificación del método descrito por Dellaporta *et al.* (1983). Se molieron 0.2 g de tejido foliar en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo homogéneo. Este polvo se depositó en un tubo 'Eppendorf' al cual se agregaron 800 μ l de solución amortiguadora de extracción (Tris 1M pH 8.0, EDTA 500 mM pH 8, NaCl 4M, β -mercaptoetanol), se mezcló suavemente y se puso en un baño María a 65° C durante 30 min., invirtiendo el tubo cada cinco minutos.

Posteriormente se agregaron 300 μ l de acetato de potasio 5M frío y se mezcló por inversión, dejándolo actuar durante 5 min. El tubo se centrifugó durante 15 min. a 13,000 r.p.m. en una microcentrífuga y se decantó en otro tubo 'Eppendorf'. Al sobrenadante se añadieron 700 μ l de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se invirtió el tubo varias veces para que la extracción fuera adecuada. El tubo se centrifugó durante cinco min. a 13,000 r.p.m., y se separó la fase superior, teniendo sumo cuidado de no arrastrar residuos de la capa media (proteínas). A la fase separada en otro tubo Eppendorf se adicionaron 600 μ l de isopropanol frío mezclando 10 veces suavemente, se centrifugó por 15 min. a 13,000 r.p.m. y el tubo se colocó en hielo durante 15 min. para que la precipitación fuera completa.

Al final de este tiempo, se decantó el sobrenadante y la pastilla (ADN) se lavó con alcohol etílico a 70 %, se secó al aire y se lavó de nuevo con alcohol etílico absoluto, secando por segunda vez. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 20 μ l de solución de ribonucleasa A, a una concentración de 100 μ g/ μ l en agua estéril.

Para un mejor manejo del ADN, éste se llevó a 50 μ l con solución amortiguadora TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se almacenó a 4° C.

3.5. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se llevó a cabo espectrofotométricamente. Se midió la absorbancia de la muestra a dos longitudes de onda, a saber: 260 y 280 nm. La primera longitud se empleó para el cálculo de la concentración y la relación entre ambas para la pureza. Después se corrió una electroforesis en gel de agarosa a 0.7 % y, de esta manera, se confirmó la calidad del ADN.

3.6. Análisis RAPD

3.6.1. Selección de la temperatura de hibridación

Debido a que este factor es muy importante en la PCR, se probaron dos temperaturas: 35° C, reportada por Al-Zahim *et al.* (1997) y 38° C, empleada en trabajos previos en el laboratorio.

3.6.2. Selección de los oligonucleótidos

Se probaron 97 oligonucleótidos de la compañía *Operon Quiagen* (Tabla 3.2), con cuatro muestras de ajo que mostraron características morfológicas y orígenes distintos, éstas fueron: a) 'Chileno', b) 'Taiwán', c) 'Chino' y d) 'Singapur'. La selección de los oligonucleótidos se realizó con base en la cantidad de bandas polimórficas producidas, prefiriendo aquellos que produjeran un mayor número; en la calidad de las mismas, es decir, que tuvieran una adecuada resolución y, finalmente, en la presencia de bandas únicas para una muestra en particular.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos que se emplearon en la selección

Oligonucleótido	Referencia bibliográfica
OPA01	(Bradley <i>et al.</i> , 1996; Ipek y Simon, 2003)
OPB16	(Bradley <i>et al.</i> , 1996; Ipek y Simon, 2003)
OPC05,07,09,12,13	(Ipek y Simon, 2003; Maas y Klass, 1995)
OPD01,03	(Bradley <i>et al.</i> , 1996; Maas y Klass, 1995)
OPE06,11,17	(Ipek y Simon, 2003; Maas y Klass, 1995; Peiwen <i>et al.</i> , 2001)
OPF05,12,16	(Peiwen <i>et al.</i> , 2001)
OPG02,11,12,13,14,19,20	(Ipek y Simon, 2003; Maas y Klass, 1995; AlZahim <i>et al.</i> , 1997)
OPJ12,13	(Etoh y Hong, 2001; Al-Zahim, <i>et al.</i> , 1997)
OPK10	(Etoh y Hong, 2001; Al-Zahim, <i>et al.</i> , 1997)
OPM17	(Ipek y Simon, 2003; Al-Zahim <i>et al.</i> , 1997)
OPN01,03,07,08,13,14,16,17,18,19	(Al-Zahim, <i>et al.</i> , 1997)
OPO01,04,08,10,18	(Ipek y Simon, 2003; Al-Zahim, <i>et al.</i> , 1997)
OPAB04,18	(Ipek y Simon, 2003; Maas y Klass, 1995)
OPAC02	(Maas y Klass, 1995)
OPA02,03,04,05,06,07,08,09,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20	No probados previamente en ajo.
OPB01,02,03,04,05,06,07,08,09,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20	No probados previamente en ajo.
OpC01,02,03,04,06,08,10,11,14,15,16,17,18,19,20	No probados previamente en ajo.

3.6.3. Amplificación del ADN

Se empleó el protocolo reportado por Williams *et al.* (1990), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción para la PCR de un volumen de 25 μ l consistió de 200 μ M de dNTP, Tris-HCl 10 mM pH-8, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 2.5 U de Taq Polimerasa, y solución amortiguadora de reacción, además de 5 μ l de ADN, en una concentración de 10 ng/ μ l y 5 μ l del oligonucleótido a una concentración de 6 ng/ μ l (Hoisington *et al.*, 1994). Cabe señalar que todos los reactivos, a excepción del ADN y el oligonucleótido, estaban en una concentración estandarizada en un *kit* (*Ready-to-go, Amersham Pharmacia Biotech Inc. E.U.*).

El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Haybaid Omn-E y consistió en un ciclo inicial de 3 min. a 94° C seguido por 45 ciclos de 1 min. a 94° C, 1 min. a 38° C y 2 min. a 72° C, y finalmente un ciclo de 5 min. a 72° C (Al-Zahim *et al.*, 1997).

3.6.4. Electroforesis de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa a 1.2 % que contenía bromuro de etidio (1 μ l por 100 μ l de gel), con una solución amortiguadora de corrimiento TAE 1X (Tris-Acetato 40mM, pH-8, EDTA 1mM). Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb y se depositaron 15 μ l de la mezcla de reacción de PCR y 5 μ l de solución amortiguadora de carga Orange G 6X en el pozo del gel. El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 80 V. El gel con las bandas de los fragmentos amplificados se visualizó en un transiluminador TM-10E y se tomó una fotografía del gel para su posterior análisis.

3.7. Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron sometidos a un análisis multivariado de conglomerados. En la Figura 3.5 se muestran los pasos de que consta este análisis, incluyendo los algoritmos de agrupación de tipo jerárquico con sus tres principales variantes. El análisis de conglomerados consiste en un conjunto de técnicas multivariantes utilizadas para clasificar a los individuos en grupos homogéneos llamados conglomerados (*clusters*), con respecto a algún criterio de selección predeterminado.

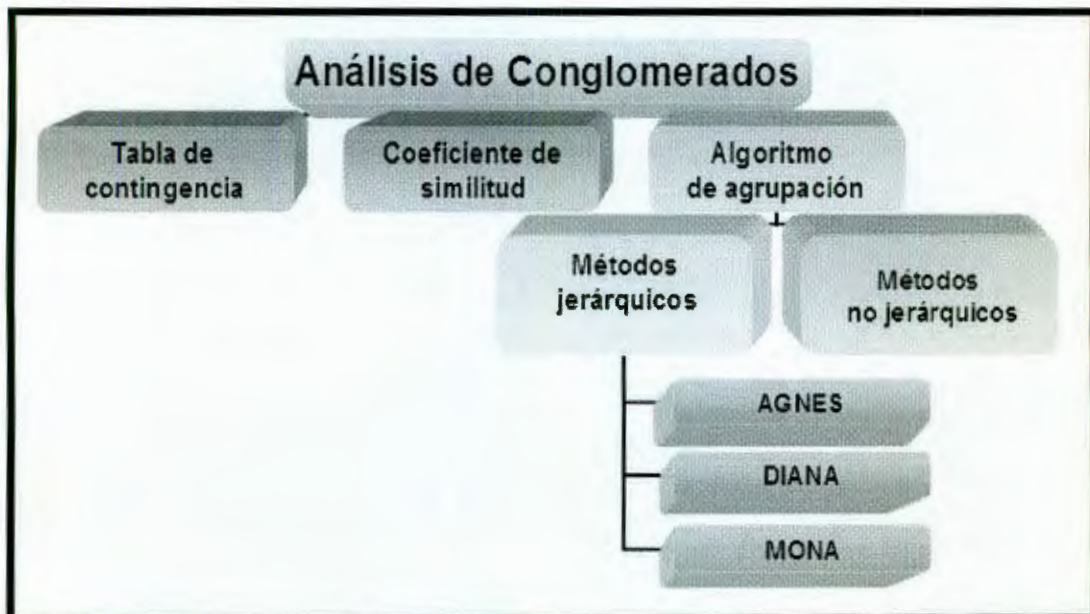


Figura 3.5. Análisis de conglomerados.

El análisis de conglomerados utiliza la información de una serie de variables para cada sujeto u objeto y, conforme a estas variables, se mide la similitud entre los sujetos para construir los grupos homogéneos (*clusters*) internamente y entre ellos (Kauffman y Rosseeuw, 1990). A continuación se describen cada una de sus etapas.

3.7.1. Construcción de la tabla de contingencia

En esta etapa se registró la presencia o ausencia de bandas como variables discretas 1 y 0. El primer valor corresponde a la presencia y el segundo a la ausencia, respecto a cada patrón de bandeo de cada individuo. En la Figura 3.6 se muestra un ejemplo de este registro.

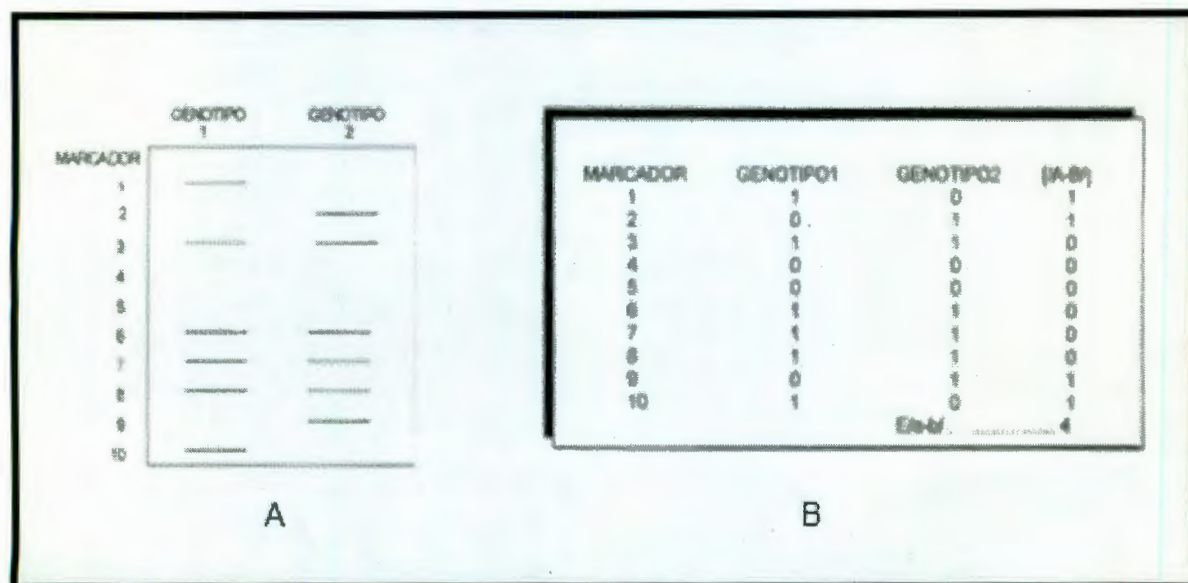


Figura 3.6. Ejemplo del registro de los datos.

A. Gel de electroforesis con patrones de bandeo.

B. Tabla de contingencia con registro de presencia y ausencia de bandas para los genotipos.

3.7.2. Cálculo del coeficiente de similitud genética

Cabe señalar que la similitud es una medida de correspondencia o semejanza entre los individuos que van a ser agrupados (Johnson y Wichern, 1983).

En este caso, la medida de disimilitud es para variables nominales binarias y, por eso, se utilizó el coeficiente de Jaccard.

Este coeficiente tiene un rango de valores que va del 0 al 1 y se mide por pares de individuos X_i y X_j . El coeficiente se calcula mediante la siguiente ecuación (Kauffman y Rosseeuw, 1990):

$$S_{ij} = (B + C) / (A + B + C),$$

A = número de bandas presentes en X_i y X_j ,

B = número de bandas presentes en X_i y ausentes en X_j ,

C = número de bandas ausentes en X_i y presentes en X_j ,

3.7.3. Algoritmos de agrupación

Para la obtención de los conglomerados, se emplearon tres métodos de algoritmos de agrupación de tipo jerárquico. Estos fueron los siguientes:

- a) Método aglomerativo "AGNES" (*Agglomerative Nesting*). Este método parte del principio de que cada individuo es un conglomerado y va agrupando sucesivamente hasta que todos los individuos conformen un solo gran conglomerado (Kauffman y Rosseeuw, 1990). El método proporciona una estructura de agrupamiento cuya representación gráfica es un dendrograma (Johnson y Wichern, 1982).
- b) Método divisivo "DIANA" (*Divisive Analysis*). Este método parte del principio contrario a "AGNES", pues en un inicio todos los individuos conforman un gran conglomerado y lo va dividiendo sucesivamente hasta que cada individuo represente únicamente un conglomerado (Kauffman y Rosseeuw, 1990). El método genera una estructura de agrupamiento que es representada gráficamente mediante un dendrograma (Johnson y Wichern, 1982).
- c) Método monotético "MONA" (*Monothetic Analysis*). Este es un análisis de tipo divisivo, pero que sólo se aplica a variables binarias, a diferencia de los dos métodos anteriores que son útiles para variables nominales, ordinales, etc. Este método sólo considera una variable para cada etapa

de división, mientras que "DIANA" o "AGNES" emplea todas las variables simultáneamente al hacer cada división o cada agregación.

"MONA" selecciona la variable para la cual la suma de similitudes es la más grande posible respecto a las demás variables, es decir, selecciona la variable central y más representativa.

Este análisis utiliza una medida de asociación entre dos variables que consiste en el valor absoluto de la diferencia entre dos productos: el primero de ellos formado entre el número de individuos para los cuales las dos variables están ausentes (caso 0,0) y el número de objetos para los que las dos variables están presentes (caso 1,1); el segundo producto está formado entre el número de objetos para los que una variable está ausente y la otra presente (caso 0,1) y el número de objetos para los que una variable está presente y la otra está ausente (caso 1,0).

La representación gráfica de este análisis es una estructura de división en forma de barras, donde la longitud de las barras en el diagrama es proporcional al paso de separación y no a la densidad de los conglomerados (Kauffman y Rosseeuw, 1990).

Para los dos primeros métodos, "AGNES" y "DIANA", se utilizó el método del promedio aritmético no ponderado por pares UPGMA (*Unweighted pair-group average method*) para la construcción de la estructura de agrupación. Este método consiste en el promedio aritmético de las distancias entre todos los posibles pares de individuos; el "software" de cómputo estadístico utilizado fue S-PLUS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de ADN

4.1.1. Selección de tipo de tejido foliar

En la Figura 4.1 se muestran las bandas correspondientes al ADN extraído de las distintas muestras de brotes provenientes de dientes de ajo (brote interno, sin emerger del diente, brote externo de 5-10 cm. y de 20-30 cm.) para determinar cuál de éstos proporcionaba el mayor rendimiento de ADN.



Figura 4.1. ADN genómico obtenido de distintos tamaños de brotes de ajo

Carriles 1, 2 y 3: brotes internos de tres muestras diferentes.

Carriles 4 y 10: brote de 5-10 cm. de dos muestras distintas.

Carriles 5, 6, 7, 8 y 9: tejido foliar de 20-30 cm. de cinco muestras distintas.

De los brotes internos se obtuvo una concentración promedio de 432.31 ± 51.57 ng/ μ l, de los de 5 a 10 cm. fue de 469.29 ± 55.87 ng/ μ l y de los de un tamaño de 20 a 30 cm. fue de 1037.81 ± 124.17 ng/ μ l. De ahí que, por su mayor rendimiento, se decidió utilizar, para los ensayos ulteriores de extracción de ADN, un tamaño de hoja de 20-30 cm. de longitud.

El rendimiento obtenido resultó superior al logrado por Peiwen *et al.* (2001), quienes obtuvieron de 150 ng/ μ l hasta 500 ng/ μ l, utilizando tejido foliar joven de 27 a 32 días después de la brotación, tiempo de desarrollo que corresponde al del brote que dio mejor rendimiento en este estudio.

4.1.2. Aislamiento de ADN de las muestras evaluadas

Las concentraciones de ADN obtenidas mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm se presentan en la Tabla 4.1. Estas concentraciones de ADN, obtenidas en la totalidad de las muestras consideradas en este estudio (27) a partir de hojas de 20 a 30 cm. de longitud y calculadas mediante métodos espectrofotométricos, resultaron elevadas, por lo cual fue necesario efectuar una dilución en solución amortiguadora TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), para un mejor manejo de las concentraciones originales.

La concentración promedio obtenida después de la dilución fue de 5012.4 ± 137.0 ng/ μ l y es nuevamente mayor a la de 150-500 ng/ μ l reportada por Peiwen *et al.* (2001).

El ADN extraído por este procedimiento fue de una pureza adecuada, lo cual pudo determinarse por la razón de las absorbancias a 260 y 280 nm, teniendo valores en un rango de 1.7-1.8. Además, su calidad pudo ser comprobada al ser corrido en un gel de agarosa a 0.7 %, donde se puede apreciar una buena intensidad y adecuada resolución de las bandas, como se observa en la Figura 4.2.

Tabla 4.1. Concentración de ADN antes y después de la dilución en ng/ μ l.

No. de Muestra	Concentración antes de diluir (20 μ l Rb A)	Concentración de la dilución (50 μ l TE)
1	13755	4676.7
2	14750	5015.0
3	14785	5026.9
4	16020	5446.8
5	14160	4814.4
6	14485	4924.9
7	13940	4739.6
8	13685	4652.9
9	17320	5888.8
10	13540	4603.6
11	11220	3814.8
12	17180	5841.2
13	16840	5725.6
14	18785	6386.9
15	13675	4649.5
16	12155	4132.7
17	12250	4165.0
18	15605	5305.7
19	12470	4239.8
20	14060	4780.4
21	17695	6016.3
22	15345	5217.3
23	16160	5494.4
24	15090	5130.6
25	15915	5411.1
26	17210	5851.4
27	9950	3383.0
Promedio	14742.4	5012.4 \pm 137.0

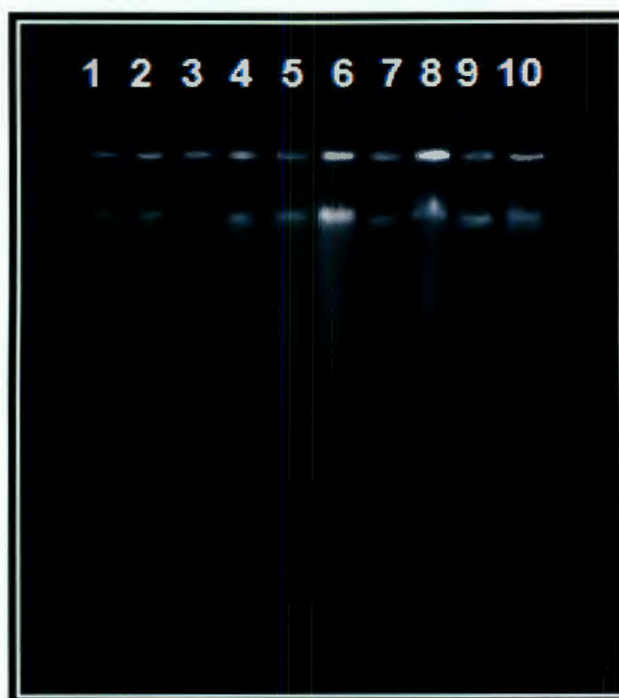


Figura 4.2. ADN genómico aislado de 10 muestras de ajo

Carriles: 1, 'Chileno' (4676.7 ng/μl); 2, 'Tingüindín' (5446.8 ng/μl); 3, 'Taiwán' (4814.4 ng/μl); 4, 'Chino' (4924.9 ng/μl); 5, 'Chapingo-94' (4739.6 ng/μl); 6, 'Chileno Apaseo' (4652.9 ng/μl); 7, 'Coreano' (5841.2 ng/μl); 8, 'Chileno Vikingo' (5725.6 ng/μl); 9, 'Singapur' (4165 ng/μl); 10, 'California 1' (5411.1 ng/μl).

4.2. Análisis RAPD

4.2.1. Selección de la temperatura de hibridación

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es muy sensible a una serie de parámetros que pueden afectar la calidad y cantidad de productos amplificados, tales como la concentración de los elementos de la reacción y la temperatura de hibridación, esta última ocasiona modificaciones en los patrones de bandeo (Douglas *et al.*, 2000), incluso se ha encontrado que temperaturas superiores a 40° C en un termociclador impiden la amplificación del ADN (Williams *et al.*, 1990). De ahí que sea de suma importancia estandarizar esta temperatura dentro del protocolo RAPD para evitar deficiencias en la amplificación y, por tanto, alteraciones en los patrones de bandeo.

En la Figura 4.3 se observan los patrones de bandeo de ADN amplificado de ocho muestras de ajo sometidas a dos temperaturas de hibridación, con distintos oligonucleótidos. En la Figura 4.3A se puede ver que la temperatura de hibridación de 35° C proporcionó patrones de bandeo con poca definición, inadecuada resolución y baja intensidad, mientras que los patrones de bandeo observados con 38° C (Figura 4.3B) presentan una adecuada resolución, notable intensidad y definición.

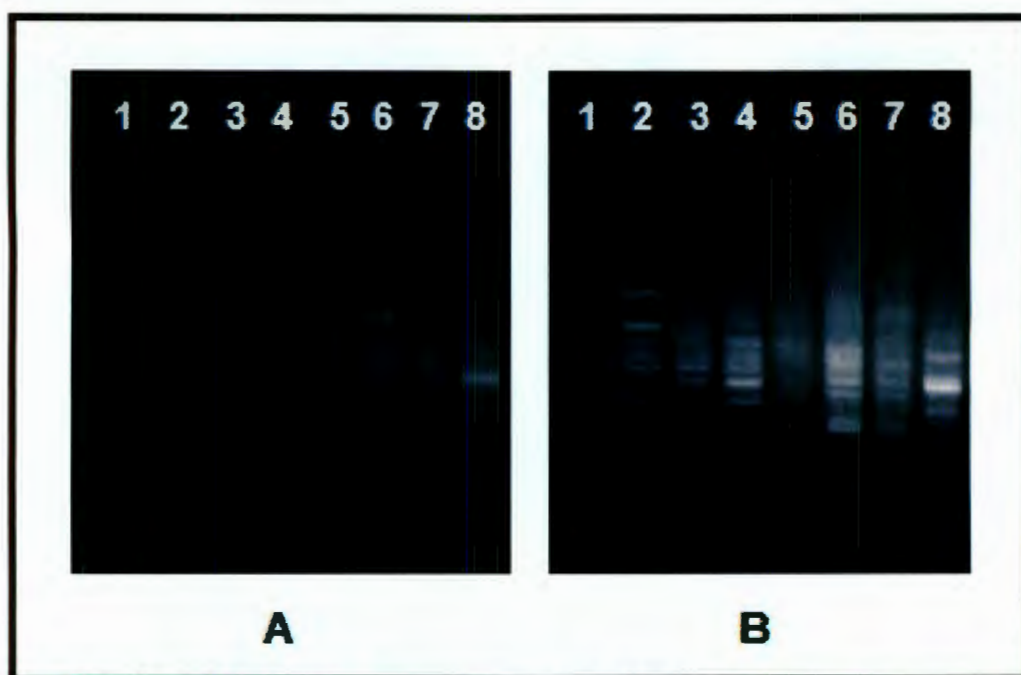


Figura 4.3. Efecto de la temperatura de hibridación en los productos de amplificación del ADN de distintas muestras de ajo

- A. 35° C. 1 y 2, OpC07; 3 y 4, OpC09; 5, 6 y 7, OpC12; 8, OpC13.
- B. 38° C. 1 y 2, OpC07; 3 y 4, OpC09; 5, 6 y 7, OpC12; 8, OpC13.

Con base en los resultados obtenidos, se eligió la temperatura de 38° C para las pruebas posteriores. Al-Zahim *et al.* (1997) e Ipek *et al.* (2003) utilizaron una temperatura de hibridación de 35° C, obteniendo adecuados patrones de bandeo. González (2002) y Aguilar (2003) utilizaron en el laboratorio la de 38° C, consiguiendo, al igual que en este trabajo, patrones de bandeo satisfactorios.

4.2.2. Selección de los oligonucleótidos

De los 97 oligonucleótidos probados en cuatro muestras de ajo ('Chino', 'Taiwán', 'Singapur' y 'Chileno'), 22 no amplificaron, 28 fueron monomórficos y 47 mostraron polimorfismo (Tabla 4.2). De estos últimos se seleccionó un subgrupo de 20. Las secuencias genéticas de éstos se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2. Clasificación de los oligonucleótidos probados en el presente estudio de acuerdo a sus resultados

Oligos que no amplificaron	OpA03, 08, 13, 18; OPB02, 03, 05, 06, 09, 11, 15, 17; OpC01, 02, 03, 06, 08, 10, 17, 18, 20; OpJ13
Oligos monomórficos	OpA02, 05, 07, 09, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20; OpB01, 04, 07, 08, 10, 14, 18, 19, 20; OpC04, 11, 12, 14, 15, 16, 19
Oligos polimórficos	OpA04, 06, 11; OpB 12, 13; OpD01; OpE06, 11, 17; OpF05; OpG02, 13, 14, 19, 20; OpJ12; OpK10; OpN08, 13, 16, 18; OpO01, 04, 08, 10; OpAB04, 18.
Oligos seleccionados	OpA01; OpB16; OpC05, 07, 09, 13; OpD03; OpF12, 16; OpG11, 12; OpM17; OpN01, 03, 07, 14, 17, 19; OpO18; OpAC02

Los 20 oligonucleótidos seleccionados fueron aquellos que proporcionaron una mejor resolución, un número importante de bandas, un elevado porcentaje de polimorfismo y una mayor cantidad de banda únicas para muestras de interés (Tabla 4.4). El oligonucleótido OpN07 fue seleccionado por dar una buena resolución de bandas, a pesar de que no proporcionó polimorfismo en esta prueba inicial de selección.

Los oligonucleótidos que proporcionaron los más altos porcentajes de polimorfismo fueron OpN17, OpN19 y OpB16, además, los oligonucleótidos OpN17, OpN01, OpG12, OpO18, entre otros, generaron bandas únicas para la muestra 'Chino', lo cual fue de sumo interés para su selección, pues este tipo de marcadores podrían ayudar a diferenciar las muestras con origen asiático, al momento de analizar la totalidad de la población en estudio. Los pesos moleculares de estos marcadores también se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.3. Secuencia genética de los oligonucleótidos seleccionados

Oligonucleótido	Secuencia
OpN17	CAT TGG GGA G
OpN19	GTC CGT ACT G
OpB16	TTT GCC CGG A
OpC09	CTC ACC GTC C
OpF16	GGA GTA CTG G
OpC13	AAG CCT CGT C
OpA01	CAG GCC CTT C
OpC07	GTC CCG ACG A
OpF12	ACG GTA CCA G
OpG11	TGC CCG TCG T
OpD03	GTC GCC GTC A
OpN14	TCG TGC GGG T
OpN01	CTC ACG TTG G
OpM17	TCA GTC CGG G
OpAC2	GTC GTC GTC T
OpG12	CAG CTC ACG A
OpO18	CTC GCT ATC C
OpN03	GGT ACT CCC C
OpC05	GAT GAC CGC C
OpN07	CAG CCC AGA G

Las letras indican la base nitrogenada correspondiente: T, timina, C, citosina, A, adenina y G, guanina.

La Figura 4.4A muestra los patrones de bandeo obtenidos con diversas muestras de ajo y con algunos oligonucleótidos seleccionados, entre ellos, OpB16, OpO18, OpN01, OpN03, caracterizados por haber proporcionado patrones de bandeo con adecuada resolución, elevado polimorfismo y presencia de algunas bandas únicas, (señaladas con flechas rojas en la figura). En la Figura 4.4B se observan oligonucleótidos que fueron descartados debido a que presentaron patrones de bandeo con deficiente resolución, ausencia de polimorfismo, bajo número de bandas y ausencia de amplificación con algunas muestras debido a baja homología, como es el caso de OpG14, OpJ12, OpG20, OpN16.

Tabla 4.4. Oligonucleótidos seleccionados y características que condujeron a su selección

Oligonucleótido	Bandas Totales	Bandas Polimórficas	% de polimorfismo	Bandas Únicas/Muestra	PM (pb)	PM general (pb)
OpN17	10	8	80	1/Chino	>2072	2072-400
OpN19	10	7	70	----	----	2072-100
OpB16	12	8	66.6	2/Chino, Taiwán	>2072, 1300	2072-400
OpC09	12	7	58.3	----	----	2072-400
OpF16	14	8	57.1	1/Singapur	2072-1500	>2072-200
OpC13	9	5	55.6	1/Singapur	1300	2072-300
OpA01	11	6	54.5	----	----	2072-400
OpC07	8	4	50	----	----	2072-400
OpF12	10	5	50	----	----	2072-400
OpG11	13	6	46.2	----	----	2072-200
OpD03	16	7	43.8	----	----	2072-300
OpN14	14	6	42.9	----	----	2072-500
OpN01	12	5	41.7	1/Chino	1500	2072-400
OpM17	10	4	40	----	----	2072-400
OpAC2	13	5	38.5	1/Chino	1500	2072-300
OpG12	8	3	37.5	1/Chino	500	2072-300
OpO18	9	3	33.3	1/Chino	1300	2072-400
OpN03	13	3	23.1	1/Chino	900	2072-200
OpC05	6	1	16.7	1/Chino	2072	2072-400
OpN07	10	0	0	----	----	2072-300

Nota: El orden que siguen en la tabla va de acuerdo a su porcentaje de polimorfismo, empezando por el de más alto porcentaje hasta el más bajo

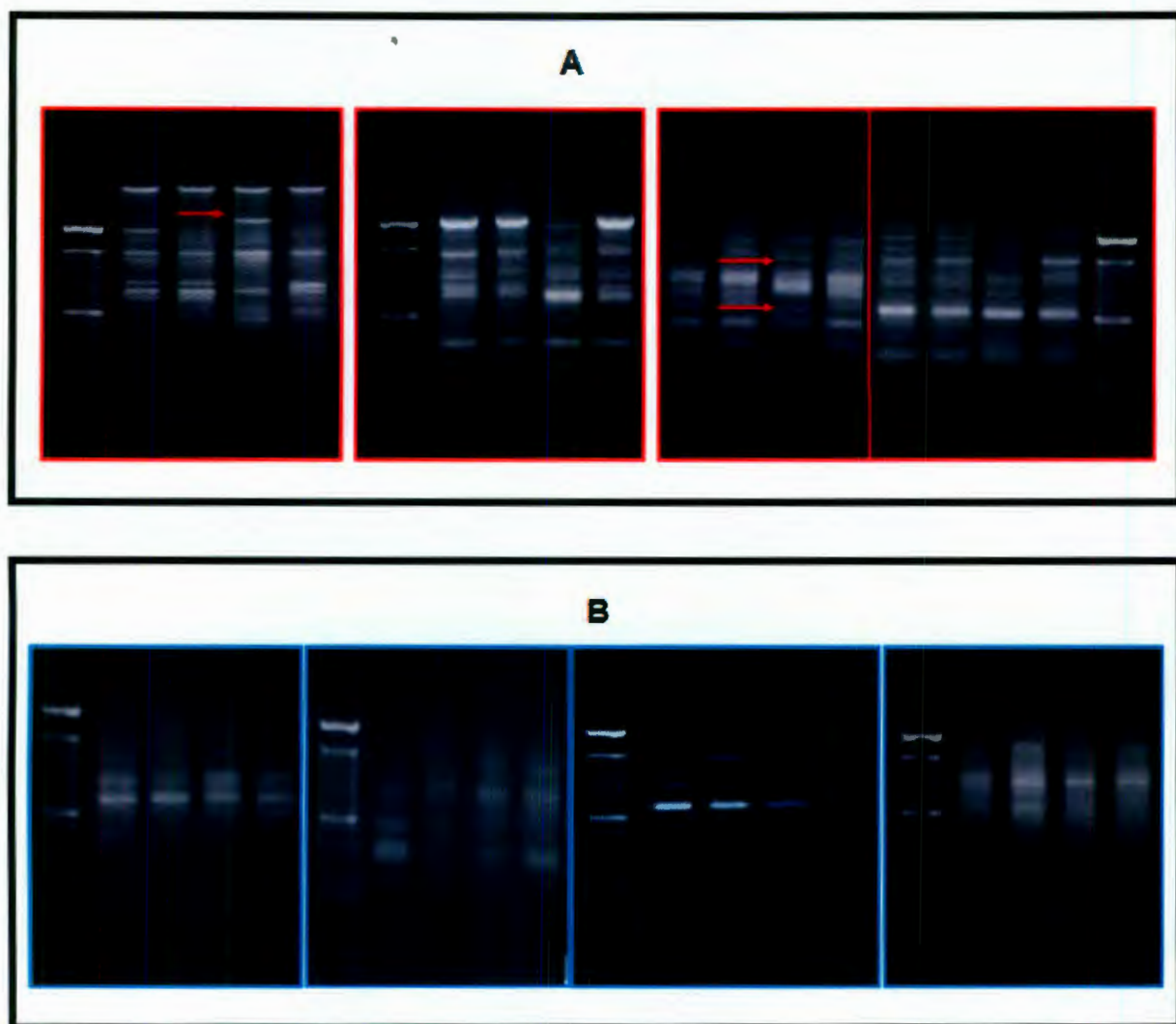


Figura 4.4. Ejemplos de patrones de bandeo obtenidos con diferentes oligonucleótidos

A. OpB16, OpO18, OpN01, OpN03.

B. OpG14, OpJ12, OpG20, OpN16.

4.2.3. Polimorfismo obtenido

Mediante el análisis RAPD con las 27 muestras de ajo consideradas en este estudio, empleando los 20 oligonucleótidos seleccionados previamente, se obtuvieron 442 bandas totales, de éstas, 430 (97.28%) fueron polimórficas (de ellas, 75 fueron únicas, 16.97%) y 12 fueron monomórficas (2.72%) (Tabla 4.5). El oligonucleótido OpD03 fue el que proporcionó el mayor número de bandas únicas (nueve), seguido por los oligonucleótidos OpG11 y OpN01 con siete bandas únicas

cada uno. Los oligonucleótidos que generaron mayor número de bandas polimórficas fueron OpF16, OpN03 y OpAC02.

Tabla 4.5 Bandas obtenidas por el análisis RAPD con los 20 oligonucleótidos seleccionados en 27 muestras de ajo

Oligonucleótido	Bandas totales	Bandas polimórficas	Bandas únicas	Bandas monomórficas	Rango de PM (pb)
OpB16	22	21	3	1	>2072-400
OpC07	12	12	1	0	>2072-400
OpF12	12	12	1	0	2072-200
OpM17	23	23	2	0	>2072-300
OpC09	15	14	3	1	2072-400
OpN17	15	13	3	2	>2072-300
OpG12	15	12	2	3	2072-300
OpO18	15	13	1	2	2072-300
OpN19	21	21	3	0	>2072-100
OpC13	25	25	4	0	>2072-300
OpC05	18	17	3	1	>2072-500
OpA01	24	24	3	0	>2072-400
OpD03	27	27	9	0	>2072-300
OpG11	28	28	7	0	>2072-300
OpN01	21	21	7	0	2072-100
OpN14	17	16	4	1	>2072-400
OpF16	39	39	6	0	>2072-200
OpN07	28	28	4	0	>2072-400
OpAC02	34	33	6	1	>2072-200
OpN03	31	31	3	0	>2072-200

Nota: Los oligonucleótidos están ordenados con base en su registro en la matriz binaria.

Resulta interesante comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los reportados por otros autores. Así, Al-Zahim *et al.* (1997) con 27 muestras de ajo, y 27 oligonucleótidos, obtuvieron 292 bandas y sólo 63 de ellas polimórficas, es decir, en el presente trabajo, con el mismo número de muestras y sólo 20 oligonucleótidos, se logró obtener un mayor número de bandas totales y polimórficas.

Por otro lado, Shashany *et al.* (2000), en un estudio con 23 cultivares de ajo y 80 oligonucleótidos, reportan un total de 2 998 bandas, de las cuales 2 459 fueron

polimórficas y 52 fueron únicas. En el presente estudio se obtuvieron 75 bandas únicas de sólo 430 bandas polimórficas.

Por lo que respecta al peso molecular de los fragmentos obtenidos, en este trabajo, los fragmentos más pesados tuvieron un tamaño superior a 2072 pb, y los fragmentos más ligeros, llegaron hasta 100 pb. Lo anterior coincide sensiblemente con lo reportado por Etoh y Hong (2001) quienes obtuvieron fragmentos desde 100 pb hasta 3000 pb.

En la Tabla 4.6 se presentan las muestras para las que se obtuvieron bandas únicas, indicando el número asignado para cada una de éstas y el(los) oligonucleótido(s) que la(las) generó. Además, se presenta también el peso molecular de cada banda. Por ejemplo, la muestra 'Chino' presentó tres bandas o marcadores únicos, el 236, de un peso molecular entre 600 y 700 pb; 259, de 1100 pb y 289, de peso molecular entre 400 y 500 pb; generados por los oligonucleótidos OPD03, OPG11 y OPN01, respectivamente.

Un ejemplo de los patrones de bandeo obtenidos con los oligonucleótidos se puede apreciar en la Figura 4.5.

La Figura 4.6 muestra el polimorfismo generado con los oligonucleótidos OPF12, OPG12 y OpN17, mediante los cuales se encontraron algunos marcadores presentes en las muestras procedentes de China, Corea y las de importación de Argentina y Chile, además de las muestras colectadas en el mercado de Abastos sospechosas de introducción ilegal de China, estos marcadores están indicados con flechas de color blanco en la figura.

Tabla 4.6. Muestras en que se localizaron bandas únicas con los distintos oligonucleótidos empleados

Oligonucleótido	Bandas únicas	No. De Marcador	Muestra	PM (pb)
OpB16	3	2	'Xochimilco'	2072-1500
		8	'Coreano'	2072-1500
		22	'Celayense'	400
OpC07	1	23	'Tingüindín'	>2072
OpF12	1	40	'Celayense'	500
OpM17	2	52	'Chileno'	1200
		54	'Chileno 2'	1100
OpC09	3	70	'Coreano'	2072-1500
		73	'Xochimilco'	1400
		83	'Tacáztzcuaro E'	400
OpN17	3	87	'Mendoza 1'	>2072
		96	'Celayense'	600
		99	'Xochimilco'	300
OpG12	2	110	'Singapur'	600
		112	'Mendoza 1'	500
OpO18	1	126	'California 1'	500
OpN19	3	130	'Texcoco'	>2072
		141	'Celayense'	1000-900
		149	'Loreto'	300-200
OpC13	4	151	'Xochimilco'	>2072
		153	'California 3'	2072-1500
		173	'California 3'	500
		174	'Chileno'	500-400
OpC05	3	179	'Xochimilco'	2072-1500
		180	'Xochimilco'	2072-1500
		186	'Xochimilco'	1100
OpA01	3	198	'Mendoza 2'	2072-1500
		200	'Chapingo-94'	1500
		215	'Loreto'	600-500
OpD03	9	218	'Mendoza 2'	>2072
		219	'Chileno'	2072
		222	'Chileno'	1400
		225	'Coreano'	1300
		232	'Probajío-74'	1000-900
		236	'Chino'	700-600
		241	'Chileno'	500
		242	'California 2'	400
		244	'Chileno'	300
OpG11	7	245	'Chileno Apaseo'	>2072
		246	'Loreto'	>2072
		247	'Loreto'	>2072
		248	'Chileno Apaseo'	2072-1500
		249	'Inifap-94'	2072
		250	'Chileno Apaseo'	2072-1500
		259	'Chino'	1100

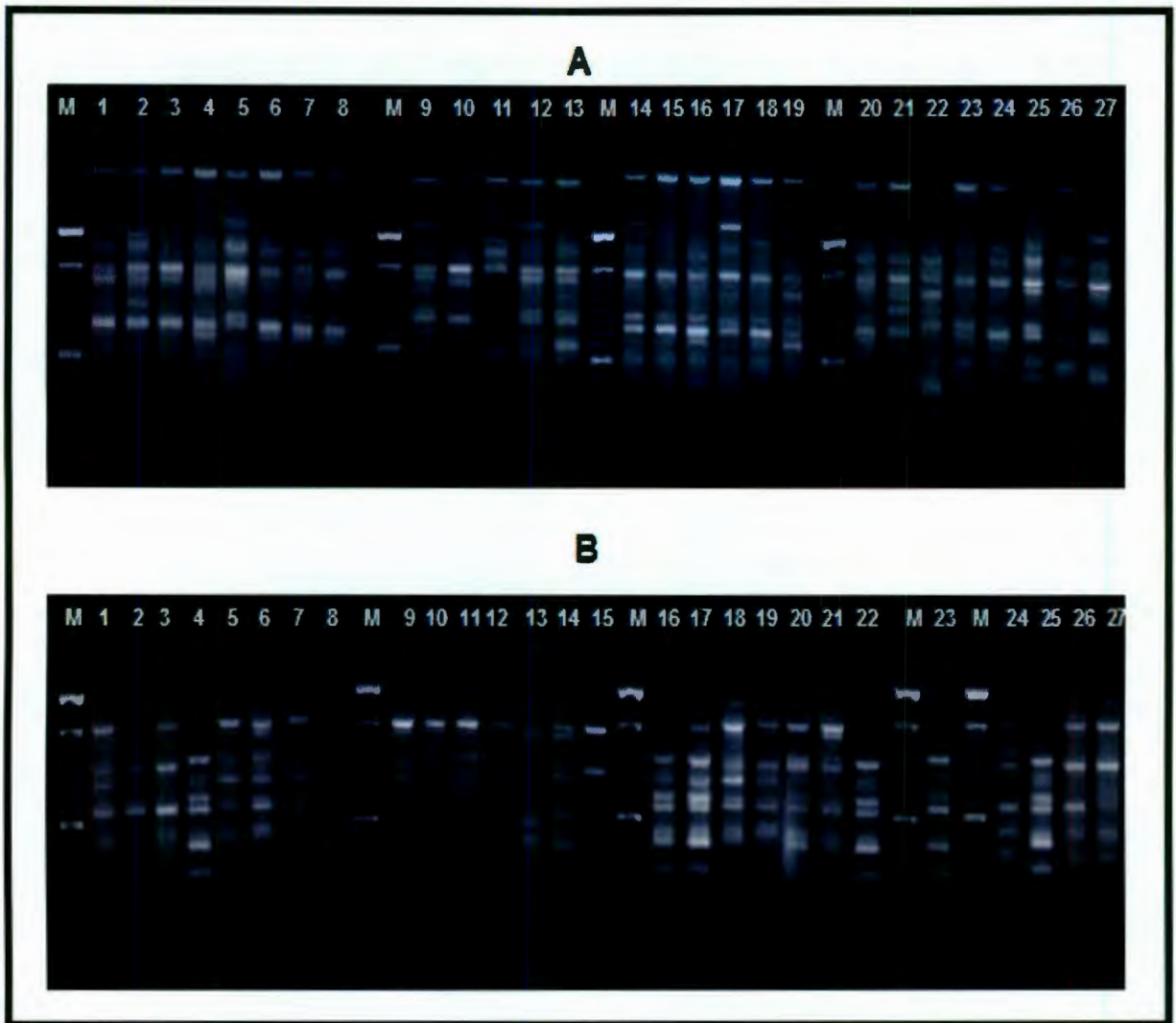


Figura 4.5. Patrones de bandeo obtenidos mediante RAPD en ajo con dos oligonucleótidos

A. Oligo **OpB16**. Carriles: M, marcador, 1, 'Chileno', 2, 'Texcoco', 3, 'Huerteño', 4, 'Tingüindín', 5, 'Taiwán', 6, 'Chino', 7, 'Chapingo-94', 8, 'Chileno Apaseo', 9, 'Inifap-94', 10, 'Tocumbo', 11, 'Tacátzcuaro Especial', 12, 'Coreano', 13 'Chileno Vikingo' 1, 14, 'Tacátzcuaro', 15, 'Pebeco', 16, 'Celayense', 17, 'Singapur', 18, 'Probajío 74', 19, 'Mendoza 2', 20, 'Mendoza 1', 21, 'Loreto', 22, 'Oregon', 23, 'California 2', 24, 'Xochimilco', 25, 'California 1', 26, 'Chileno 2', 27, 'California 3'.

B. Oligo **OpM17**. Carriles: M, marcador, 1, 'Chileno', 2, 'Taiwán', 3, 'Chino', 4, 'Chapingo-94', 5, 'Chileno Apaseo', 6, 'Inifap-94', 7, 'Tocumbo', 8, 'Tacátzcuaro Especial', 9, 'Texcoco', 10, 'Huerteño', 11, 'Tingüindín', 12, 'California 2', 13, 'Xochimilco', 14, 'California 1', 15, 'Chileno 2', 16, 'Coreano', 17, 'Chileno Vikingo 1', 18, 'Tacátzcuarpo', 19, 'Pebeco', 20, 'Mendoza 2', 21, 'Singapur', 22, 'Probajío-74', 23, 'Celayense', 24, 'Mendoza 1', 25, 'Loreto', 26, 'Oregon', 27, 'California 3'.

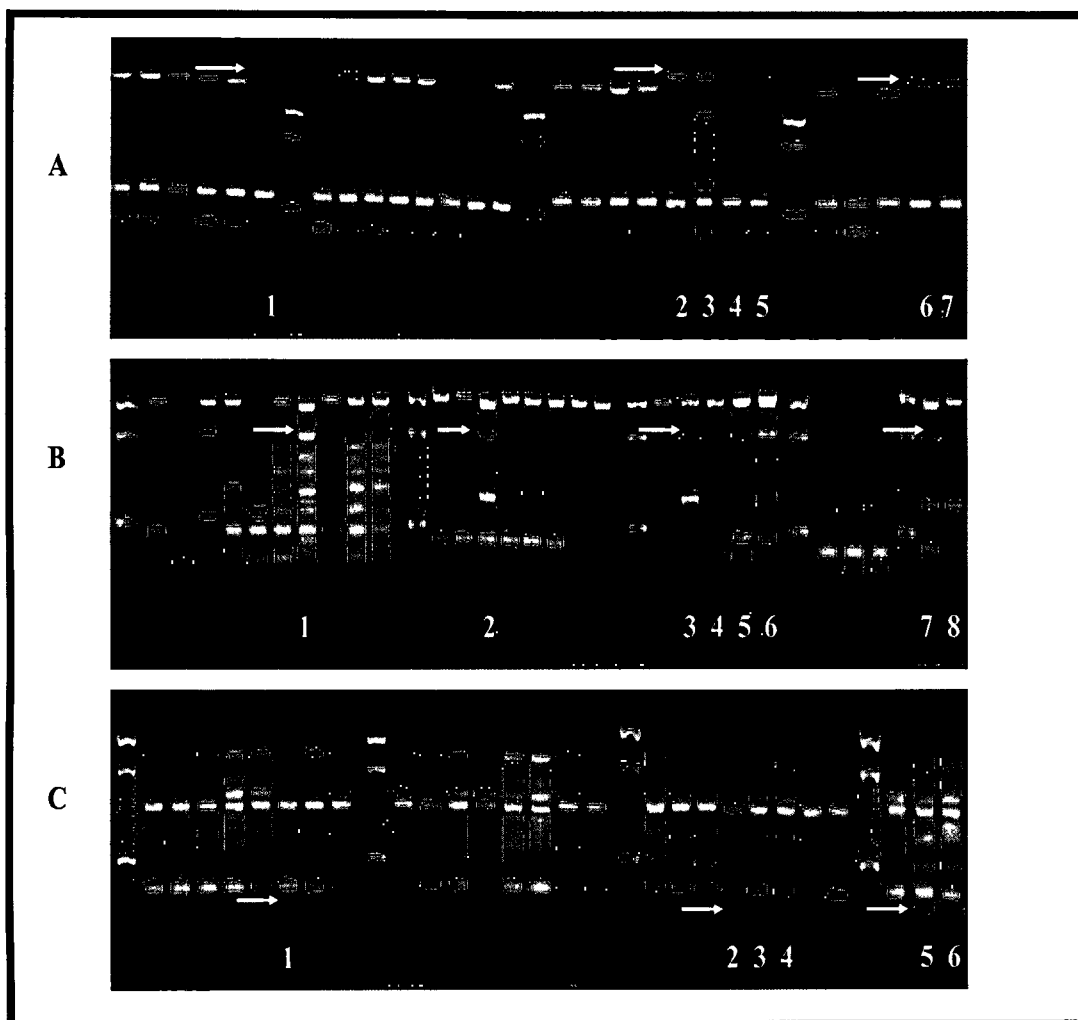


Figura 4.6. Polimorfismo y presencia de marcadores importantes obtenidos con algunos oligonucleótidos.

OpN17 (A) para las muestras 'Chino' (1), 'Mendoza 2' (2), 'Mendoza 1' (3), 'Loreto' (4), 'Oregon' (5), 'Chileno 2' (6) y 'California 3' (7);

OpF12 (B) para 'Chino' (1), 'Coreano' (2), 'Mendoza 2' (3), 'Mendoza 1' (4), 'Loreto' (5), 'Oregon' (6), 'Chileno 2' (7) y 'California 3' (8);

OpG12 (C), para 'Chino' (1), 'Mendoza 1' (2), 'Loreto' (3), 'Oregon' (4), 'Chileno 2' (5) y 'California 3' (6).

4.3. Relaciones genéticas

4.3.1. Método aglomerativo (AGNES)

A partir de la matriz binaria de los datos registrados (ver Anexo 2) y de la de disimilitud de Jaccard, el método aglomerativo generó un dendrograma (Fig. 4.7) que separa las muestras consideradas en tres grandes grupos.

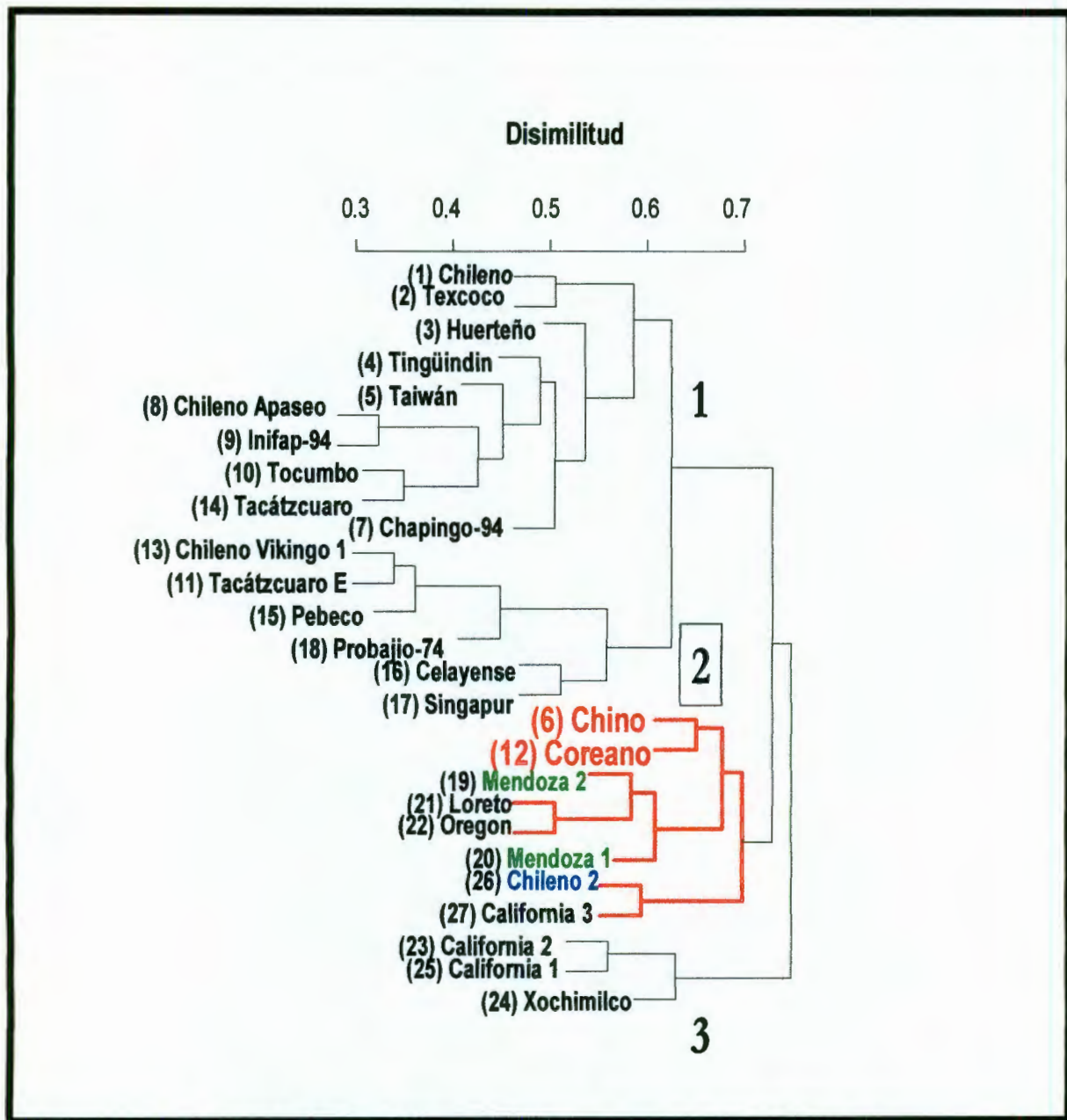


Figura 4.7. Dendrograma obtenido con el método AGNES

El primer grupo (del 1 al 17, señalados en el dendrograma) está constituido por un total 16 muestras, a saber: 'Chileno', 'Texcoco', 'Huerteño', 'Tingüindín', 'Taiwán', 'Chileno Apaseo', 'Inifap-94', 'Tocumbo', 'Tacátzcuaro', 'Chapingo-94', 'Chileno Vikingo 1', 'Tacátzcuaro Especial', 'Pebeco', 'Probajío-74', 'Celayense' y 'Singapur'. Este grupo se encuentra integrado en su mayoría por las muestras nacionales proporcionadas por INIFAP y que son representativas de las que se

comercializan en el país. Los ajos que forman este grupo son fundamentalmente de bulbo de color morado.

El segundo grupo (del 6 al 27) está constituido por un total de ocho muestras, entre ellas, las muestras de referencia de China y Corea obtenidas en INIFAP, muestras importadas de Santiago de Chile y Mendoza, Argentina, obtenidas con productores de Guanajuato y Aguascalientes y muestras de supuesta procedencia del país y de EE.UU., de sospechosa introducción ilegal de China, información que fue obtenida mediante entrevistas con los comerciantes en la Central de Abastos. Los ajos incluidos en este grupo son en su mayoría de bulbo blanco.

El tercer grupo (del 23 al 25) contiene dos muestras de la variedad 'California' de importación de EE.UU. y una muestra con un supuesto origen de otra región del país.

La disimilitud entre el primer y segundo grupos fue de 0.73 y entre los dos anteriores y el tercero, de 0.75, siendo esta última, la mayor disimilitud obtenida con este método. La menor disimilitud fue la de 0.32 entre las muestras 'Chileno Apaseo' e 'Inifap-94'. Choi *et al.* (2003) reportan una disimilitud de 0.4 entre dos grandes grupos formados a partir de un total de 75 muestras, pero ellos emplearon el coeficiente "M" o de afinidad. Ipek *et al.* (2003), por su parte, obtuvieron una disimilitud de 0 entre muestras y de 0.75 (la más alta) entre los dos grandes grupos formados mediante el coeficiente de Jaccard, lo que indica que no tuvieron una adecuada diferenciación entre muestras al interior de los grupos. Finalmente, Al-Zahim *et al.* (1997), en un estudio para evaluar la diversidad y estudiar las relaciones genéticas entre el progenitor *Allium longicuspis* y el resto de los materiales de ajo, con 27 cultivares de ajo colectados de diferentes partes del mundo, y 26 oligonucleótidos, reportan una disimilitud nula entre dos muestras y de 0.82 (la mayor) entre dos grandes grupos, utilizando los coeficientes de Jaccard y de afinidad.

El grupo 1 se divide a su vez en dos subgrupos, el primero (1 al 7) contiene 10 genotipos, y va de 'Chileno' a 'Chapingo-94'. Aquí se encuentran dos variedades originales, es decir variedades introducidas de otros países sin proceder de

selecciones de alguna variedad nacional, 'Chileno' y 'Taiwán', una selección individual de 'Chileno' y siete variedades derivadas de 'Taiwán'. El segundo subgrupo va de 'Chileno Vikingo 1' a 'Singapur', encontrándose también una selección individual de la variedad original 'Chileno' y tres variedades derivadas de 'Taiwán'.

En el subgrupo que va del 1 al 7 se puede observar una relativamente importante cercanía genética (disimilitud = 0.32) entre las variedades 'Chileno Apaseo' e 'INIFAP-94'. Ambas muestras presentan un tamaño mediano de bulbo, color morado y jaspeado; no obstante, su origen parece ser diferente, pues 'Chileno Apaseo' es derivado de 'Chileno' mediante selecciones individuales e 'INIFAP-94' es derivado de 'Taiwán', también mediante selección (Heredia, 2000), por lo cual, en principio, tendrían que encontrarse en el dendrograma más cerca de sus respectivos derivados. También llama la atención en el subgrupo que va del 13 al 17, la cercanía entre 'Chileno Vikingo 1' y 'Tacátzcuaro Especial' (0.34); el primero presenta un tamaño de bulbo pequeño de color morado y, el segundo, es más bien mediano, y de color "jaspeado", derivados mediante selecciones de 'Chileno' y 'Taiwán', respectivamente (Heredia y Delgadillo, 2000). El caso se repite para las muestras 'Chileno' y 'Texcoco', provenientes de variedades diferentes y que se agrupan con una disimilitud mayor a los otros casos (0.51).

Para tratar de explicar el que variedades con orígenes diferentes aparezcan agrupadas muy cercanamente en el dendrograma, sería importante recordar cómo se liberaron 'Chileno Apaseo', 'Inifap-94', 'Chileno', 'Texcoco', 'Chileno Vikingo 1' y 'Tacátzcuaro Especial', además de algunos aspectos de la variabilidad en el ajo. En el ciclo 1978-1979 se llevó a cabo en el INIFAP, Campo experimental Bajío, un proceso de selección clonal individual en la variedad 'Chileno', empleando como criterio principal la selección de bulbos con menor número de dientes con respecto a la media de la variedad original y, después de seis ciclos consecutivos de selección, se llegaron a separar los seis mejores clones (selecciones individuales) y dos compuestos (selecciones masales).

En 1987, las selecciones individuales se liberaron con los nombres de 'Chileno Vikingo 1', 'Chileno Vikingo 2' y 'Chileno Apaseo'. La variedad de Taiwán comenzó también a mejorarse utilizando el mismo criterio de selección que el usado

para la variedad 'Chileno'. La variedad 'Taiwán' había sido introducida comercialmente a México en 1978 y, después de ocho ciclos de selección, se liberaron nuevas variedades, tales como: 'Tacátzcuaro', 'Tingüindín', 'Tocumbo', 'Texcoco', 'Huerteño', 'Chapingo-94', 'INIFAP-94' y 'Celayense' (Heredia Zepeda y Heredia García, 2000).

Esta información permite suponer que, además de los parámetros morfológicos considerados para llevar a cabo la selección de clones con mejores características, es de suma ayuda establecer la identidad genética de los materiales, es decir, contar con información molecular como la que es brindada por los RAPD para así verificar cómo se llevan a cabo las agrupaciones a nivel molecular.

También es importante señalar que el ajo presenta una gran variabilidad genética incluso al interior de un supuesto clon, muchos estudios han indicado que, en condiciones de estrés genómico *in vitro*, se pueden presentar rupturas en los cromosomas y, si las posiciones de dichas rupturas se encuentran en regiones heterocromáticas, esta situación puede conducir a la aparición de aberraciones cromosómicas, tales como translocaciones, inversiones o deleciones (Benzion y Phillip, 1988; Lapitan *et al.*, 1988). En el ajo, estas regiones heterocromáticas están localizadas en los sitios proximales al satélite de los cuatro cromosomas que llevan la organización de la región nucleolar y soportan la constricción secundaria (Sato y Kawamura, 1981). Esta situación puede explicar que, con el paso del tiempo, esta susceptibilidad a mutar en el ajo propicie que los materiales antes clasificados cercanos desde el punto de vista morfológico, al paso del tiempo ya no lo sean, desde el punto de vista molecular.

Finalmente, es importante comentar sobre la posibilidad de que las muestras que presentan dicha semejanza genética (disimilitud = 0.32) pudieran pertenecer al mismo grupo varietal y que por dicha razón se presenten agrupadas cercanamente.

También en este grupo 1 resulta interesante subrayar la disimilitud observada entre las muestras 'Tocumbo' y 'Tacátzcuaro' (0.35), lo cual podría deberse a que ambas muestras son derivadas de la variedad 'Taiwán'. Ambas presentan un color jaspeado del bulbo.

En el grupo 2 destacan las muestras 'Chino' y 'Coreano' que se agruparon con una disimilitud de 0.65 y originalmente proceden de China y Corea respectivamente, aunque se cultivan en México. Éstas fueron consideradas muestras de referencia pues fueron proporcionadas en el INIFAP. En este grupo también están presentes las muestras 'Loreto' y 'Oregon', con una disimilitud entre ellas de 0.51, ambas fueron obtenidas en la Central de Abastos de Querétaro y se supone eran provenientes del estado de Zacatecas, México y Oregon, EE.UU. Sin embargo, después de haber realizado entrevistas con los comerciantes, se tuvo conocimiento de que estos materiales podrían tener una procedencia ilegal de China y, a causa de esto, los comerciantes les asignaron los nombres de regiones de México y EE.UU, tratando de indicar un supuesto origen nacional, para evitar así, problemas legales.

También en este grupo se encuentran las muestras 'Chileno 2' y 'California 3', con una disimilitud entre ellas de 0.6. Cabe recordar que la muestra 'Chileno 2' es proveniente de Santiago de Chile, supuestamente producida por Alimentos Chile, S.A., y colectada en la empacadora "Arnime" de Cortazar, Guanajuato. La muestra 'California 3', por su parte, fue proporcionada por productores de Aguascalientes. Como se puede observar, 'Chileno 2', por su supuesto origen de Chile, debería tener más semejanza genética con la variedad 'Chileno' cultivada en México desde la década de los '60 (Heredia, 2000), que se encuentra encabezando el grupo 1 que va de la muestra 1 a la 17 en el dendrograma, sin embargo, aparece con las muestras originarias de China y Corea. El hecho de que las muestras 'Mendoza 1', 'Mendoza 2', 'Chileno 2', 'Loreto' y 'Oregon' estén agrupadas con las muestras 'Chino' y 'Coreano' permite suponer que pudieran tener un origen asiático.

Finalmente, el grupo 3, como se recordará, está constituido por las muestras 'California 2', 'California 1' y 'Xochimilco'. La disimilitud genética entre 'California 2' y 'California 1' fue de 0.56. Estas muestras fueron colectadas en la Central de Abastos de Querétaro, 'California 1' y 'California 2' son muestras de la variedad 'California' y son importadas de ese estado. Como se puede observar, 'California 3' no aparece en el grupo 3, lo cual sugiere que no tiene el mismo origen genético que 'California 2' y 'California 1', sino que tiene más semejanza genética con las muestras de China y

Corea, mientras que las otras dos sí tienen mayor semejanza entre ellas. La muestra 'Xochimilco', que lleva el nombre de esa región de México, se presumía sospechosa de ser procedente de China debido a la información brindada por los propios comerciantes de la Central de Abastos. Sin embargo, el que no se haya agrupado con la muestra de referencia de ese país indica que tiene un origen diferente y mayor semejanza con las muestras 'California 1' y 'California 2'.

Con respecto a la estructura de agrupación generada en el presente estudio, se puede mencionar que Al-Zahim *et al.* (1997) lograron agrupar las muestras de ajo de diferentes naciones de acuerdo a la variación morfológica, la presencia de escapo floral y la variedad botánica, pero no indicaron la relación de estos factores con el origen geográfico como se discute en este trabajo. Maas y Klass (1995) lograron establecer grupos de acuerdo al origen geográfico y la especie.

En este estudio los tres grandes grupos formados en el dendrograma, además de estar agrupados de acuerdo al origen geográfico como se comentó anteriormente, comparten algunas características morfológicas y fisiológicas al interior de los grupos, podemos destacar que en el primer grupo (del 1 al 7) los ajos presentan en su mayoría bulbos jaspeado y un número en días requeridos para llegar a un desarrollo completo del brote interno en un rango de 26 a 43 en su mayoría; el segundo grupo (6 al 27) son ajos en su mayoría de bulbo blanco y con días requeridos para desarrollo completo de brote interno de 70 a 77; finalmente el grupo 3 (de 23 al 25) incluye ajos de bulbo jaspeado a blanco, y un rango de días para el desarrollo total de brote interno de 71 a 72 (ver Anexo 1).

4.3.2. Método divisivo (DIANA)

El método divisivo (DIANA) generó un dendrograma (Fig. 4.8) muy similar al obtenido por el método AGNES, la menor disimilitud presentada fue de 0.32 entre las muestras 'Chileno Apaseo' e 'Inifap-94', al igual que con el método AGNES; y la mayor fue de 0.81. Las pequeñas diferencias que se tienen, son: en primer lugar, dentro del grupo 1 (muestras en su mayoría nacionales) la muestra 'Tingüindín' se agrupa con 'Taiwán', con una disimilitud de 0.46, mientras que en el AGNES

aparecían separados también dentro del grupo 1; en segundo lugar, se observa aquí una mayor disimilitud entre la muestra de China y la de Corea.

Estas pequeñas diferencias pueden deberse a los principios en que se basa cada método pues, como se recordará, el método AGNES agrupa sucesivamente, hasta que todos los individuos conforman un solo gran conglomerado, mientras que el método DIANA va dividiendo sucesivamente hasta que cada individuo representa un conglomerado de ahí que, las muestras una vez separadas por el método DIANA considerando todas las bandas de manera simultánea, no se pueden volver a juntar (Kaufman y Rosseeuw, 1990).

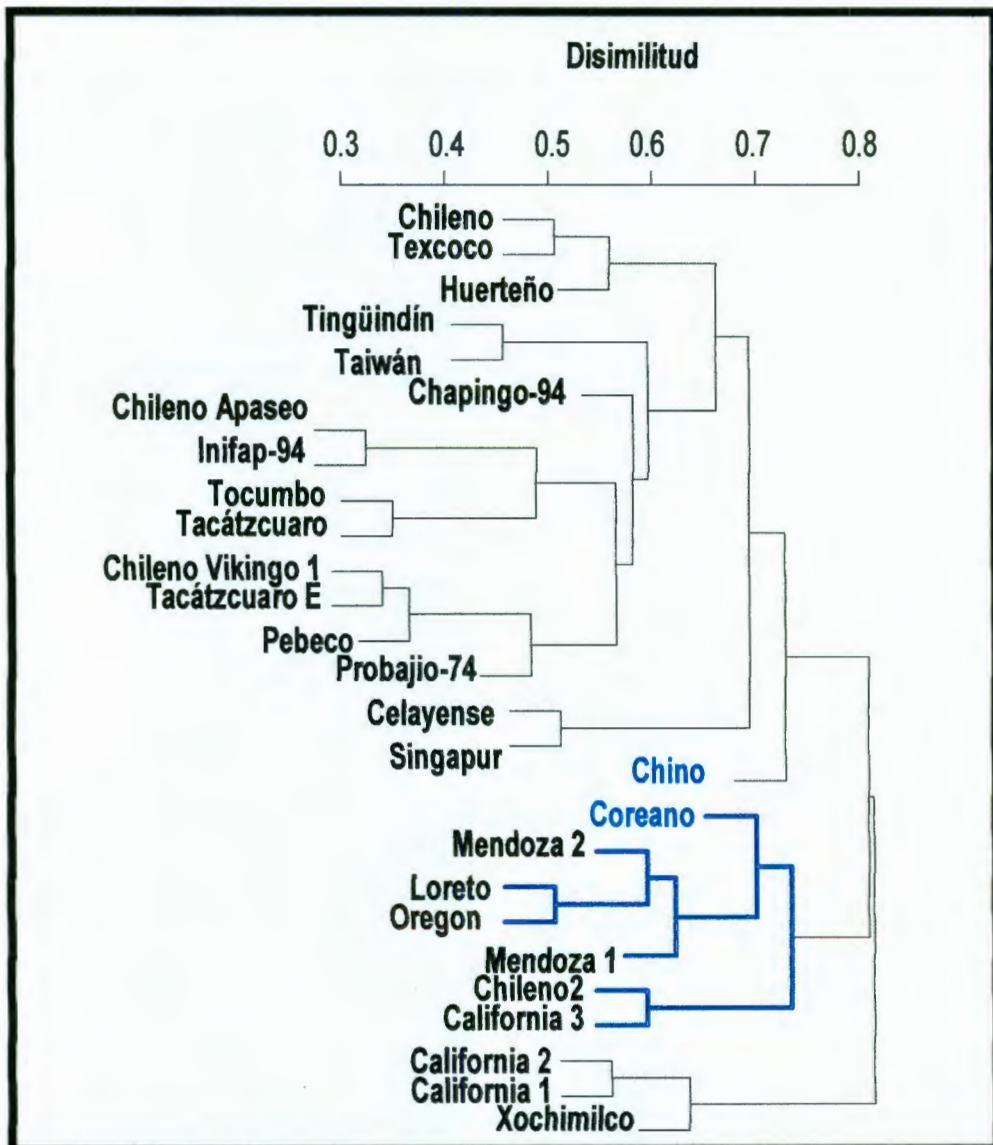


Figura 4.8. Dendrograma obtenido con el método DIANA

4.3.3. Análisis monotético (MONA)

El análisis monotético (MONA) proporcionó una estructura divisiva (Figura 4.9), parecida también a las obtenidas mediante los métodos AGNES y DIANA, debido a que las muestras se dividieron, en un primer paso, en dos grandes grupos de acuerdo al origen geográfico. En el primer grupo se encontraron las muestras en su mayoría nacionales y en el segundo las muestras de China, de Corea, las de importación de Argentina y Chile y las de sospechosa introducción ilegal de China. En la Figura 4.9 se indica la banda responsable de cada división con la letra B y el número asignado de acuerdo al orden en la matriz binaria.

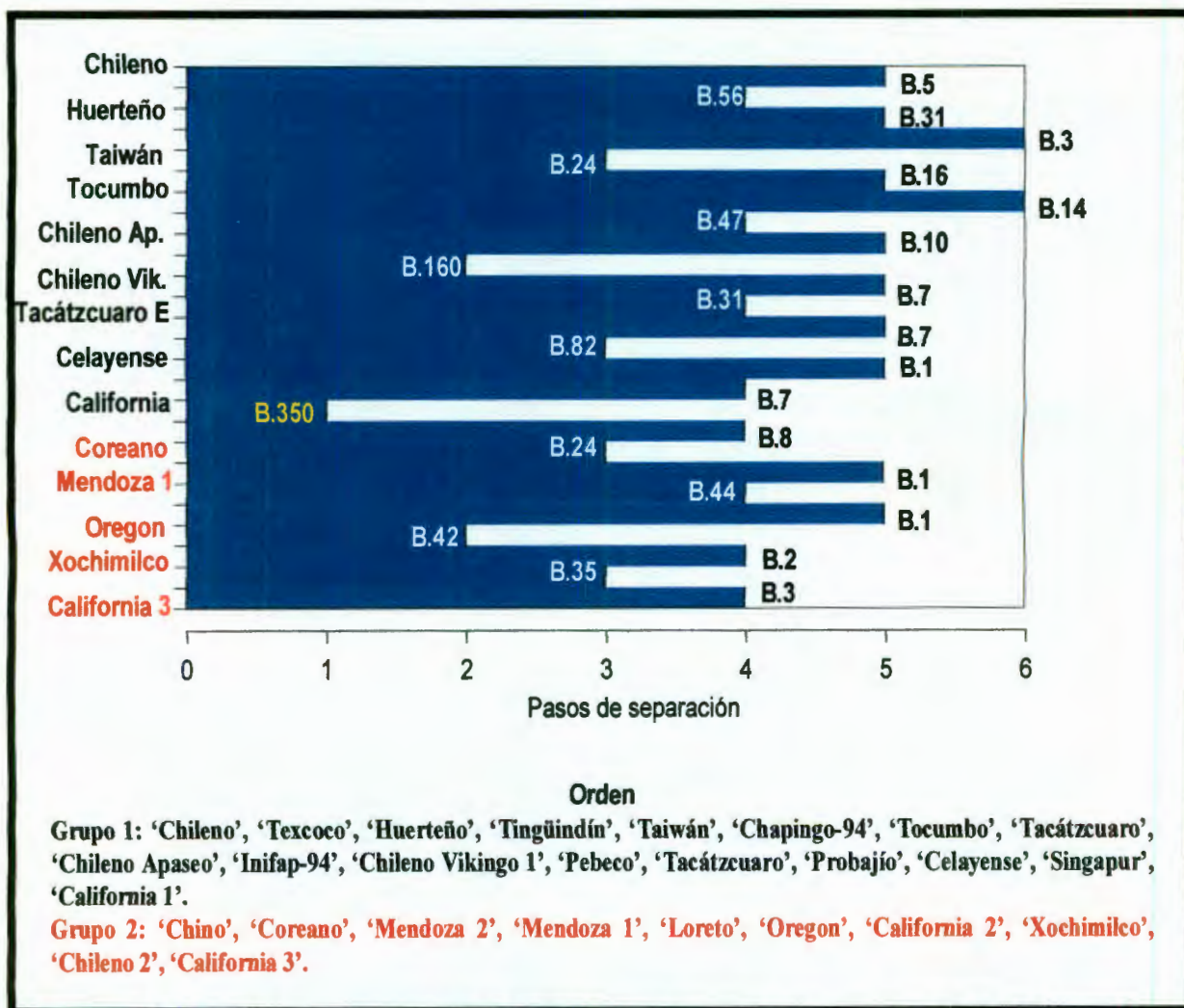


Figura 4.9. Estructura divisiva obtenida mediante el análisis MONA

La Tabla 4.7 presenta las bandas que utilizó el análisis MONA para generar la estructura divisiva presentada anteriormente. Estas bandas son consideradas por el análisis como las variables requeridas para llevar a cabo las divisiones de la población en seis pasos sucesivos. El número total de estas variables fue de 26, cada variable corresponde a una banda de ADN, pero algunas bandas fueron utilizadas en más de una división, de ahí que en la tabla se presentan sólo 19 variables correspondientes a las 19 bandas.

Tabla 4.7. Bandas empleadas para las divisiones en el análisis MONA

No. Banda	Oligonucleótido que la generó
1	OpB16
2	OpB16
3	OpB16
5	OpB16
7	OpB16
8	OpB16
10	OpB16
14	OpB16
16	OpB16
24	OpC07
31	OpC07
35	OpF12
42	OpF12
44	OpF12
47	OpM17
56	OpM17
82	OpC09
160	OpC13
350	OpN07

El número con que se designan corresponde a la posición que tienen en la tabla de contingencia. Se tiene así que: la banda 1 se utilizó tres veces en el paso de separación 5, la banda 3 dos veces en los pasos de separación 4 y 6, la banda 7 tres veces en los pasos 4 y 5, la banda 24 dos veces en el paso 3, y finalmente, la banda 31 en los pasos 4 y 5. El resto de las bandas fueron utilizadas sólo en un paso de separación, la banda 350 en el paso 1, la 42 y 160 en el 2, la 35 y 82 en el 3, la 2, 8, 31, 44, 47, y 56, en el 4, la 5, 10 y 16 en el 5, y finalmente, la banda 16 en el paso 6.

La banda 350, de un peso molecular mayor a 2072 pb, estuvo ausente en las muestras 'Chileno', 'Texcoco', 'Huerteño', 'Tingüindín', 'Chapingo-94', 'Tocumbo', 'Tacátzcuaro', 'Chileno Apaseo', 'Inifap-94', 'Chileno Vikingo 1', 'Pebeco', 'Tacátzcuaro Especial', 'Probajío-74', 'Celayense', 'Singapur' y 'California 1', integrantes del primer grupo y presente en las muestras 'Chino', 'Coreano', 'Mendoza 2', 'Mendoza 1', 'Loreto', 'Oregon', 'Chileno 2', 'California 2', 'California 3' y 'Xochimilco', integrantes del segundo grupo y esto, en la primera gran división que se observa en la estructura. Resulta interesante subrayar que en la separación de las muestras por esta banda aparecen, por un lado, aquellos genotipos que, en una prueba a pequeña escala realizada en el laboratorio, estuvieron, en su mayoría en un menor rango de días para llegar a 100 % de desarrollo de brotación interna y, por el otro, los que presentaron un rango mayor (ver Anexo 1). Estudios más profundos, a mayor escala y considerando los factores ambientales que afectan el requerimiento de días de brotación, ayudarían a esclarecer si esta banda pudiera ser un marcador relacionado a dicho parámetro.

Además de la banda 350 es importante mencionar a las bandas 160 y 42, de 1300-1200 y 800-700 pb respectivamente, la primera ocasionó la división del grupo 1 en dos subgrupos, el primero integrado por: 'Chileno', 'Texcoco', 'Huerteño', 'Tingüindín', 'Chapingo-94', 'Tocumbo', 'Tacátzcuaro', 'Chileno Apaseo', 'Inifap-94'; el segundo integrado por: 'Chileno Vikingo 1', 'Pebeco', 'Tacátzcuaro Especial', 'Probajío-74', 'Celayense', 'Singapur', 'California 1'. En este punto es importante comentar que en la separación de las muestras por esta banda están presentes, en un grupo, aquellos genotipos en su mayoría con un rango alto de peso de bulbo y en el otro, los que fundamentalmente tuvieron un rango menor (ver Anexo 1). Cabe mencionar que dicha característica de peso aunque está ligada al cultivar, puede ser modificada por el medio ambiente.

La banda 42, por su parte, divide al segundo grupo de la primera división en dos subgrupos, el primero formado por: 'Chino', 'Coreano', 'Mendoza 2', 'Mendoza 1', 'Loreto', 'Oregon'; y el segundo por: 'Chileno 2', 'California 2', 'California 3', 'Xochimilco'. Los bulbos de las muestras presentes en el primer grupo fueron en su mayoría grandes y los del segundo grupo medianos y algunos grandes (ver

Anexo 1). Es importante mencionar que el tamaño del bulbo, es un parámetro que se ve afectado por la influencia de diversos factores ambientales sujetos aún a estudio.

El resto de las bandas continúan dividiendo los grupos sucesivamente, hasta que cada muestra queda separada una de la otra.

Como se puede observar, los grupos que se van formando en cada división siguen un patrón similar que en los métodos AGNES y DIANA.

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

Para la extracción de dicho ADN es recomendable utilizar hojas de 20 a 30 cm. de largo, pues se obtiene un mejor rendimiento de ADN.

La concentración de ADN obtenida en tejido foliar fresco a partir de distintas muestras de bulbos de ajo fue de un promedio de 5012.4 ± 137.0 ng/ μ l.

La temperatura de hibridación de 38° C resultó ser la mejor para amplificar ADN de ajo en el laboratorio.

De los 97 oligonucleótidos que se probaron, aquellos que proporcionaron el mayor número de bandas polimórficas, bandas únicas y de adecuada resolución fueron OpA01, OpB16, OpC05, OpC07, OpC09, OpC13, OpD03, OpF12, OpF16, OpG11, OpG12, OpM17, OpN01, OpN03, OpN07, OpN14, OpN17, OpN19, OpO18 y OpAC02. Éstos podrían utilizarse en posteriores estudios de diversidad genética en ajo.

El análisis RAPD permitió detectar polimorfismo en las muestras de ajo analizadas; ya que se obtuvieron 442 bandas totales con 20 oligonucleótidos; de éstas, 430 (97.28%) fueron polimórficas (dentro de éstas, 75 fueron únicas) y 12 fueron monomórficas (2.72%). El peso molecular de estas bandas varió desde 100 hasta 2072 pb.

Los oligonucleótidos OPF12, OPG12 y OpN17 generaron algunos marcadores para las muestras de China, Corea, las de importación de Argentina y Chile, junto con las muestras colectadas en el mercado de Abastos sospechosas de introducción ilegal de China, estos marcadores pueden ser útiles en la identificación de materiales de ajo introducidos al mercado nacional, pues podrían estar relacionados con un origen asiático.

Las bandas únicas obtenidas en este estudio pueden ser de gran utilidad en trabajos posteriores, para desarrollar la huella genética de materiales de interés. La presencia de estas bandas en algunas muestras de interés resultó de suma

importancia en la selección de oligonucleótidos y en la diferenciación genética de las muestras.

Los métodos AGNES y DIANA generaron dendrogramas en los que se formaron tres grupos de acuerdo al origen genético y geográfico de las muestras.

El hecho de que en el segundo grupo se encontraran las muestras de referencia de China y Corea, junto con las muestras de importación de Argentina y Chile, además de muestras de sospechosa introducción ilegal de China con nombres de “supuestas” regiones de México y EE.UU.; sugiere que estas últimas pudieran tener procedencia asiática, lo cual apoya la hipótesis de que sí se está introduciendo ajo de manera ilegal a nuestro país, o a través de triangulaciones mediante países terceros.

La mayor disimilitud obtenida en los dendrogramas generados por los métodos AGNES y DIANA fue comparable (0.75 y 0.81, respectivamente).

La menor disimilitud con ambos métodos se obtuvo con las muestras ‘Chileno Apaseo’ e ‘Inifap-94’ (0.32).

El hecho de que se haya obtenido una disimilitud relativamente pequeña entre muestras de diferente procedencia; muestra que, además de los parámetros morfológicos considerados en la selección de clones, también es de suma ayuda establecer la identidad genética de los materiales, es decir, contar con información molecular como la que es proporcionada, por ejemplo, por los RAPD. Además, la susceptibilidad a mutar en el ajo puede ocasionar que los materiales que antes se consideraran cercanos desde el punto de vista morfológico, al paso del tiempo ya no sea así, desde el punto de vista molecular; o como otra hipótesis, pudiera ser que la cercanía genética se debiera a un grupo varietal común.

En el análisis monotético, la banda 350, de un peso molecular superior a 2072 pb, y obtenida con el oligonucleótido OpN07, dividió las muestras en dos grupos: el de las muestras de México y el grupo de las muestras fundamentalmente de China, Corea y aquellas de importación, así que esta banda podría tener importancia para identificar materiales de sospechosa procedencia ilegal.

Además, el hecho de que esta banda estuviera ausente en aquellos genotipos que requirieron un menor número de días para llegar a 100 % de

desarrollo de brote interno y, presente en los que requirieron un rango mayor, sugiere que ésta pueda ser un marcador relacionado con el tiempo de brotación que el ajo requiere. Sin embargo, para demostrarlo, se necesitan estudios más profundos, a mayor escala y considerando los factores ambientales que afectan el requerimiento de días de brotación.

Los tres algoritmos de agrupación (AGNES, DIANA y MONA) generaron estructuras de agrupación con una tendencia similar, lo cual refleja consistencia en los datos analizados.

Los resultados obtenidos muestran que el análisis RAPD puede ser una herramienta para identificar el origen genético y geográfico de las variedades de ajo de nuestro país, de aquellas provenientes del extranjero y también de las de ser sospechosas de haber sido introducidas de manera ilegal; esto con el fin de proteger el mercado nacional de prácticas de *dumping* y así, evitar que la producción de ajo y la superficie sembrada en México de esta importante hortaliza siga cayendo drásticamente como ha ocurrido en los últimos años.

Finalmente, para futuros trabajos de investigación se recomienda realizar la huella genética de variedades líderes cultivadas en México, China, Chile y Argentina y buscar las bandas de estas variedades en los materiales introducidos al país con procedencia de naciones sudamericanas como Chile y Argentina, y materiales de importación en general, realizando muestreos periódicos en coordinación con los responsables de las centrales de abastos de México y otros mercados, con el fin de obtener la suficiente variedad y cantidad de muestras requeridas.

De la misma manera, también sería importante trabajar en coordinación con las autoridades gubernamentales relacionadas con el asunto del *dumping* y con la entrada de esta hortaliza al país, a fin de que todo esto se traduzca en una acción concreta para la defensa de los intereses, tanto de productores como del país mismo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, L. J. A.** 2003. Estudio de la diversidad genética en poblaciones de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] establecidas en el centro del país en base a marcadores moleculares de tipo RAPD. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. pp: 37-46.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** 1994. Molecular Biology of the Cell. 3a. Ed. New York: Garland Publishing. pp: 1050-1055.
- Al-Zahim, M., Newbury, H.J. and Ford-Lloyd, B.V.** 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. HortScience 32 (6): 1102-1104.
- Al-Zahim, M., Ford-Lloyd, B.V. and Newbury, H.J.** 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Reports 18: 473-477.
- Arcade, A., Anselin, F., Faivre, R., Lesage, M., Pâques, L. and Prat, D.** 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theor. Appl. Genet. 100: 299-307.
- Bachman, K.** 1994. Molecular markers in plant ecology. New Phytologist 126: 403-418.
- Bell, A. and Bryan A.** 1991. Plant form: An illustrated guide to flowering plant morphology. In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 24.
- Benzion G. and Philips R.L.** 1988. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. Genome 30: 318-325.
- Biderbost, E.J., Peiretti, D.A., Carreras, J.J. y Errasti, J.M.** 1985. Variabilidad genética de una población de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado paraguayo. In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y

- tecnología de producción, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 29.
- Bradley, K.F., Rieger, M.A. and Collins, G.G.** 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 36(5): 613-618.
- Broertjes, C. and van Harten, A.M.** 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops: An interpretative literature review. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 29.
- Burba, J.L.** 1992. Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum* L.) *In: Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate*, eds. Izquierdo, J. y Gaetano A. FAO. pp: 63-126.
- Burba, J.L., Moriconi D.N., Saluzzo, J.A., Blanco, M.P, Dallari, P. Conci V.C. y Nome, S.F.** 1988. Estudio preliminar de descriptores morfológicos para caracterización del banco de germoplasma en ajo (*Allium sativum* L.). *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 20.
- Campos, H.A.** 1995. Marcadores moleculares. Conceptos. Notas técnicas. *AGROSUR* 23: 63-75.
- Cerna, C.J.** 1999. Estudio de la diversidad genética en materiales de nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Korch] del centro de la República Mexicana a partir de marcadores moleculares de tipo AFLP. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. pp: 46-85.
- Choi, H.K., Kim, K., Ahn, Y., Dim, D., Woo, J., and Lim, Y.P.** 2003. Analysis of genetic relationships in garlic germplasm and fertile garlic by RAPD. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 44 (5): 595-600.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J. B.** 1983. A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol. Bio. Reporter* 1:19-21.

- Douglas, E., Soltis, P. and Doyle, J.** 2000. Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. Ed. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, USA. pp: 442-458.
- Eom, E. and Lee, D.** 1999. Characterization of chromosomal DNA and DNA polymorphism in Korean cultivars of *Allium sativum* L. Journal of Plant Biology 42 (2):159-167.
- Etoh, T.** 1986. Fertility of the garlic clones collected in Sovietic Central Asia. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 17.
- Etoh, T. and Hong, C.** 2001. RAPD markers for fertile garlic. Acta Hort. 555:209-212.
- FAO,** 2002. Internet: <http://apps.fao.org>.
- González, C. M.** 1999. Caracterización de aislados mexicanos de *Colletotrichum lindemuthianum* usando marcadores moleculares de ADN y variedades diferenciales, y búsqueda de resistencia en variedades mexicanas. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de I.P.N. Unidad Irapuato. México. pp: 20-106.
- González, H. A.** 2002. Estudio de la diversidad genética de poblaciones de manzano (*Malus spp.*) de Cadereyta, Qro. revelada por marcadores moleculares de tipo RAPD. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. pp: 31-50.
- Hanelt, P.** 1990. Taxonomy, evolution and history. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 18-19.
- Harris, H.** 1966. Enzyme polymorphisms in man. Proceedings of the Royal Society of London, 164: 298-310.
- Hartmann, H.T. and Kester, E.D.** 1986. Propagación de plantas: Principios y practicas. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G. E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 29.

- Havey, M.J., King, J.J., Bradeen, J.M. and Bark, O.** 1996. Molecular markers and mapping in bulb onion, a forgotten monocot. *HortScience* 31 (7): 1116-1118.
- Heredia, G.E.** 1997. Number of cloves per bulb: Selection criteria for garlic improvement. I. Results with "Chileno" type. *Acta Horticulturae* 433: 265-270.
- Heredia, G.E.** 2000. El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción. SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 14-102.
- Heredia, Z.A. y Heredia G.E.** 2000. Mejoramiento genético de ajo en el INIFAP. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción.* SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 29.
- Hoisington, D., Khairallah, M. and González-de-León, D.** 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. Mexico, D.F. CIMMYT.
- Hu, J. and Quiros, C.F.** 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 501-511.
- Hubby, J. L. and Lewontin, R.C.** 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.
- Ipek, M., Ipek, P. and Simon P.** 2003. Comparison of AFLPs, RAPD Markers, and Isozymes for Diversity Assessment of Garlic and Detection of Putative Duplicates in Germplasm Collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128 (2): 246-252.
- Izquierdo, J., Paltrinieri, G. y Arias C.** 1992. Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización del ajo, cebolla y tomate. FAO. pp: 63-126.
- Jaramillo, J.** 1994. *Allium* genetic resources in Latin America: situation and perspectives. *Acta Horticulturae.* 358:147-149.
- Johnson, R. and Wichern, D.** 1982. Applied Multivariate Statistical Analysis. Ed. Prentice Hall International Inc. pp: 20-80.

- Karp, A., Seber O. and Buiatti, M.** 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78:143-149.
- Kauffman, L. and P. Rousseeuw.** 1990. Finding Groups in data. An introduction to Cluster Analysis. John Wiley and Sons. Inc. USA. pp: 1-310.
- Komissarov, V.** 1965. On the biology of garlic. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 17.
- Koul, A.K., Gohil, R.N. and Langer, A.** 1979. Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding systems. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 29.
- Lapitan, NLV., Sears, R. G. and Gill, B. S.** 1998. Amplification of repeated sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 75: 381-388.
- Lattier, D. L., Gordon, D. A., Silbiger, R.N., McCormick, F., and Smith, M.K.** 1996. Extremely RAPD Fingerprinting: A Versatile Tool for Population Genetics. *In: Techniques in Aquatic Toxicology*, eds. Ostrander, G.K., CRC Press, Inc., Lewis Publishers. pp: 569-575.
- Lewontin, R.C.** 1974. The Genetic Basis of Evolutionary Change. *In: Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, eds. Douglas, E., Soltis, P. and Doyle, J., Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, USA. pp: 442.
- Lewontin, R.C.** 1991. Twenty-five years ago in genetics. Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone? eds. Douglas, E., Soltis, P. and Doyle, J., Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, USA. pp: 442.
- Lewontin, R.C. and Hubby J.L.** 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Lin, J. J., Kuo, J.A., Saunder, H.S., Beard, M.H., Macdonald, W. and Kenworthy, G.N.** 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP,

- RAPD, and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14 (2): 156-169.
- Lin, Y.H. and Yao, W.H.** 1995. Protease activities before and after germination of garlic. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36: 189-194.
- López, G., León, F., Mercado, E., Castaño, E. and Vázquez, E.** 2002. Kinetics of sprouting and quality changes of garlic cv. 'Perla' during storage at different conditions. Annual Meeting of IFT, Anaheim, California. pp: 271-272.
- Maas, H. I. and Klaas, M.** 1995. Infrasespecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet* 91: 89-97.
- Macías, M. L.** 2002. Mejoramiento de ajo blanco (*Allium sativum* L.) mediante selección individual. Congreso Nacional de Fitogenética, Saltillo, Coahuila; México.
- Mercado, S. E.** 2002. Desarrollo Tecnológico para mejorar el almacenamiento de ajo del bajo mexicano. Proyecto, SIHGO, CONACYT: pp: 2-12.
- Michelmore, R.W. and Hulbert, S.H.** 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology* 25: 383-404.
- Nabulsi, I., Al-Safadi, B., Ali, N. Mir and Arabi, M.I.E.** 2001. Evaluation of some garlic (*Allium sativum* L.) mutants resistant to white rot disease by RAPD analysis. *Annals of Applied Biology* 138 (2): 197-202.
- Nienhuis, J. and Santos, J.** 1994. Genetic distance among tomato cultivars as measured by RAPD molecular markers. *Acta Hort.* 376: 59-66
- Nnadozie, C.O. Gardiener S.E., Basset, C.M., Mirko, S., Ball, R.D., Bus, G.M. and White, A.G.** 2001. Genetic diversity and relationships in *Malus spp*: Germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126 (3): 318-328.
- Nybom, H.** 1994. DNA fingerprinting-a useful tool in fruit breeding. *Euphytica* 77: 59-64.
- Peiwen, X., Srinives, P. and Yang, C.** 2001. Genetic identification of garlic cultivars and lines by using RAPD assay. *Acta Hort.* 555:213-220.

- Pooler, M.R.** and Simon P.W. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. *Euphytica* 68:121-130.
- Purseglove, J.** 1985. Tropical crops: Monocotyledons I. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 22-23.
- Rivera, B. R., Torres, P. I., Garzon, T. J. A. y Herrera, E. L.** 1991. Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería Genética de Plantas. CINVESTAV-IPN, INIFAP-SAGAR. Guanajuato, México. pp: 190-222.
- SAGARPA**, 2002. Internet: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Sato, S.,** and Kawamura, S. 1981. Cytological studies on the nucleolus and the NOR-carry segments of *Allium sativum*. *Cytologia* 46: 781-790.
- Sharma, S.K., Dawson, I.K. and Waugh R.** 1995. Relationship among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91: 647-654.
- Shasany, A.K., Ahirwar, O.P., Kumar, S. and Khanuja, S.P.** 2000. RAPD analysis of phenotypic diversity in the Indian garlic collection. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences. Abstr.* 22 (1B): 586-592.
- Shigyo, M., Miyazaki, T. and Tashiro Y.** 2002. Development of randomly amplified polymorphic DNA markers in cultivated and wild species of sections *Cepa* and *Phyllodolon* in *Allium*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77 (3): 373-377.
- Simpson, J.** 1999. Molecular markers *In: Molecular Biotechnology for Plant Food Production*, eds. Paredes, L.O., Technomic Publishing CO., INC.E.U. pp: 275-297.
- Smith, J. S., and Williams, J.G.** 1994. Arbitrary primer mediated fingerprinting in plants: Case studies in plant breeding, taxonomy and phylogeny *In: Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, eds. Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. and De Salle. R. pp: 5-15.

- Sobral, B.W.** and Honeycutt, R.J. 1994. Genetics, plants and the polymerase chain reaction. *In: The Polymerase Chain Reaction*, eds. Mullis, K.B., Ferre, F. and Gibbs, R.A. pp: 304-319.
- Song, Y.S.,** Nunome, T., Choi, I., Jang, Y.S., Choi, W.Y. and Park, J.H. 2001. Detection of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers related to bolting, bulb color, and clove adherent type of garlic (*Allium sativum* L.) *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. Abstr. 42 (3): 304-309.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- S-PLUS.** 2001. S-PLUS 6 for Windows, Guide to Statistics, Volume 1. Insightful Corporation. Seattle, WA.
- Tagaki, H.** 1990. Garlic *Allium sativum* L. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 19-23.
- Visser, A.A.** 2000. Characterization of banana and plantain using random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Hort.* 540: 113;123.
- Vos, P.,** Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21): 4407-4414.
- Vvedensky, A.** 1946. The genus *Allium* in the URSS. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 17.
- Waugh, R.** and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186-191.
- Weising, K.,** Wigand, F., Driesel, A., Kahl, J., Zischler, H. and Epplen. 1989. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. *Nucleic Acids Res.* 17: 10128.
- Wilkie, S.E.,** Issac, P.G. and Slater, R.J. 1992. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497-504.

- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zebrowska, J.I. and Tyrka M. 2003.** The use of RAPD markers for strawberry identification and genetic diversity studies. *Food, Agriculture and Environment* 1 (1): 115-117.
- Zeven, A. and Wet, M. 1982.** Dictionary of cultivated plants and their regions diversity. *In: El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*, ed. Heredia, G.E., SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. pp: 17.

ANEXOS

Anexo1. Características morfológicas y fisiológicas de los genotipos de ajo utilizados en el presente trabajo.

MUESTRA	TAMAÑO	ALTURA/ BULBO (cm)	DIÁMETRO/ BULBO (cm)	COLOR	PESO(g)/ BULBO	No. DIENTES/ BULBO	No. días/ IB 100%*
'Chileno'	Mediano	5.76	5.76	Morado	59	19	30
'Texcoco'	Mediano	4.96	5.76	Jaspeado	67.7	11	34
'Huerteño'	Mediano	5.02	6.24	Jaspeado	72.4	14	30
'Tingüindín'	Mediano	5.36	5.88	Jaspeado	83.4	14	36
'Taiwán'	Mediano	4.82	5.42	Jaspeado	67.2	12	34
'Chapingo-94'	Mediano	4.46	5.42	Jaspeado	67.7	7	40
'Tocumbo'	Mediano	4.88	5.9	Jaspeado	62.8	8	33
'Tacáctzcuaro'	Grande	7.22	6.34	Jaspeado	83.8	9	33
'Chileno Apaseo'	Mediano	4.36	5.5	Morado	44	14	61
'Inifap-94'	Mediano	4.84	6.2	Jaspeado	55	13	60
'Chileno Vikingo 1'	Pequeño	4.82	3.32	Morado	40.3	10	37
'Pebeco'	Mediano	4.76	5.78	Jaspeado	73.9	12	43
'Tacáctzcuaro E'	Mediano	4.56	5.64	Jaspeado	68.1	10	32
'Probajío-74'	Pequeño	3.12	4.38	Blanco	20.13	7	26
'Celayense'	Mediano	4.66	5.68	Jaspeado	67.4	13	31
'Singapur'	Mediano	4.1	5.44	Jaspeado	44.83	11	37
'California 1'	Mediano	4.32	5.27	Blanco	63.3	13	77
'Chino'	Grande	7.24	6.32	Blanco	102.375	15	77
'Coreano'	Grande	7.68	6.65	Blanco	95.83	12	77
'Mendoza 2'	Grande	7.1	6.5	Blanco	76.3	11	70
'Mendoza 1'	Grande	7.32	6.78	Blanco	79.16	11	71
'Loreto'	Grande	6.92	6.1	Jaspeado	77.41	12	75
'Oregon'	Grande	7.12	6.54	Jaspeado	75.61	13	74
'California 2'	Pequeño	3.23	4.37	Blanco	41.6	11	76
'Xochimilco'	Grande	7.45	6.42	Jaspeado	94.66	14	72
'Chileno 2'	Mediano	4.91	5.5	Rosado	67.15	12	71
'California 3'	Mediano	4.27	6.27	Blanco	60.25	11	72

Nota: Mediciones realizadas a pequeña escala

* Número de días que tardó en desarrollarse completamente el brote dentro del diente, donde IB = índice de brotación.

Anexo 2. Matriz binaria con registro de ausencia y presencia de las bandas obtenidas con la totalidad de las muestras y de los oligonucleótidos.

		Muestra																											
Oligo	Banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
OpB16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	9	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
	10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	14	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	16	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	19	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	20	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OpC07	23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	24	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	27	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	30	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	31	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	34	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0

Nota: El número 1 indica la presencia de una banda y 0 la ausencia.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. Ramón A. Martínez Peniche.