

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

**DETERMINACION DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN ESPECIES DE *POUTERIA*
(*Sapotáceae*) USANDO ISOENZIMAS COMO MARCADORES GENÉTICOS**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

BALTAZAR DE JESÚS NUÑO REYES

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO**

Guatemala, Mayo del 2,001

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central**

DJ
01
+(1966)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Ing. Agr. EFRAÍN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr.	Edgar Oswaldo Franco Rivera
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr.	Walter Estuardo García Tello
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr.	Manuel de Jesús Martínez Ovalle
VOCAL TERCERO	Ing. Agr.	Alejandro Arnoldo Hernández Figueroa
VOCAL CUARTO	Prof.	Abelardo Caal Ich
VOCAL QUINTO	Br.	José Baldomero Sandoval Arriaza
SECRETARIO	Ing. Agr.	Edil René Rodríguez Quezada

Guatemala, Mayo del 2,001

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN ESPECIES DE *POUTERIA*
(*Sapotáceae*) USANDO ISOENZIMAS COMO MARCADORES GENÉTICOS**

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

En espera que la presente investigación llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente,


Baltazar de Jesús Nufflo Reyes

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Por iluminarme y permitirme culminar mi carrera

MIS PADRES

Guillermo Nufio Madrid (†)
Lucía Reyes Payes viuda de Nufio
Por sus sabios consejos y colaboración de mi formación.

MIS HERMANOS

José Guillermo, Mario Roberto, Héctor Adilio, Mary Luz, Francisca Victoria, Flor Marina, Lilian Beatriz y especialmente a Waldemar.

MI ESPOSA

Arely Martínez Granillo de Nufio
Por su apoyo incondicional

MIS HIJOS

José Guillermo y Amanda Lucía.

MIS SUEGROS

Rufino Martínez y Santos Granillo

MIS CUÑADOS

Job, Rony, Moisés, Raúl, Otto, Hernán, Amanda y especialmente a Sonia.

MIS AMIGOS

Víctor Estuardo, David Mendieta, Nestor Byron, Walter Arnoldo, Lionel Caín, Rodolfo Luarca, Rudy Teni, Mario Tarrot, José Batres, Carlos Rivera, Carlos Bonilla, Carlos Ruano, Mynor Pimentel, Plinio Sandoval, Willy Alfredo, Carlos Godínez, José Alfredo, Herman Lazo, Julio Gerardo, Enrique Bernardo y especialmente a mis amigos José Oswaldo y Daniel Rizo.

TESIS QUE DEDICO

A:

Mis Padres

Mi Familia

Guatemala

Escuela Rural Mixta “María Chinchilla”, Asunción Mita, Jutiapa

Instituto de Educación Básica con Orientación Vocacional, Mazatenango

Instituto Experimental de Educ. Básica “Efraín Nájera Farfán”, Jutiapa

Escuela Nacional Central de Agricultura, Bárcena, Villa Nueva.

Facultad de Agronomía, USAC

AGRADECIMIENTO

A:

Mis Asesores, Dr. Luis Mejía De León y especialmente al Dr. César Azurdía, por la amistad brindada e incondicional apoyo en la realización de este trabajo.

Waldemar Nufio Reyes, por su valioso apoyo durante el tiempo de realización de este trabajo, como también por sus sabios consejos y buenos ejemplos que han contribuido a formarme tanto profesional como humanitariamente.

Mis Catedráticos, dignos modelos de mi formación académica:

**César Augusto Vielman
Waldemar Nufio Reyes
Marco Tulio Aceituno
Luis Reyes Chávez
Luis Fernando Ortiz (†)
Romeo Pérez Morales
César Augusto Castañeda
Mauricio Sitún
Jorge Sandoval Illescas
Victor Cabrera
César Azurdía
Rolando Lara**

CONTENIDO GENERAL

Página

	Índice de figuras	i
	Índice de cuadros	ii
	Resumen	iii
1.	Introducción	1
2.	Definición del problema	4
3.	Marco Teórico	5
3.1.	Marco Conceptual	5
3.1.1.	Sapotáceas	5
3.1.2.	Electroforesis de Isoenzimas	6
3.1.3.	Genética de las isoenzimas vegetales	8
3.1.4.	Isoenzimas y análisis de la estructura genética en las plantas	9
3.2.	Marco Referencial	10
3.2.1.	Material Fitogenético Utilizado	10
3.2.1.1.	Zapote <i>Pouteria sapota</i> (Jacq.) Moores & Stearn	10
3.2.1.2.	Injerto <i>Pouteria viridis</i> (Pittier) Cronquist	11
3.2.1.3.	Canistel <i>Pouteria campechiana</i> (HBK.) Baehni	13
4.	Objetivos	14
4.1.	Objetivo general	14
4.2.	Objetivos específicos	14
5.	Hipótesis	14
6.	Metodología	15
6.1.	Determinación de protocolos	15
6.1.1.	Material vegetal	15
6.1.2.	Colecta y transporte de la muestra	15
6.1.3.	Obtención del extracto vegetal (muestra)	19
6.1.4.	Preparación de las geles de poliacrilamida	20
6.1.5.	Cargado de las muestras	20
6.1.6.	Realización de la corrida electroforética	20
6.1.7.	Tinción y revelación de enzimas	21
6.1.8.	Sistemas enzimáticos evaluados	21
6.2.	Análisis de la información	22
7.	Resultados	23
7.1.	Gel seleccionada y tinción de enzimas para cada especie	23
7.1.1.	Resultados para <i>Pouteria sapota</i>	24
7.1.2.	Resultados para <i>Pouteria viridis</i>	33
7.1.3.	Resultados para <i>Pouteria campechiana</i>	39
7.2.	Relaciones filogenéticas entre las especies de <i>Pouteria</i>	45
8.	Conclusiones	48
9.	Recomendaciones	50
10.	Bibliografía	51
11.	Apéndices	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1. Variación isoenzimática en Zapote, <i>Pouteria sapota</i> a) PRX b) 6PHD c) SOD	26
Figura 2. Variación isoenzimática en Zapote, <i>Pouteria sapota</i> a) EST b) ADH c) PGD	27
Figura 3. Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes accesiones de zapote (<i>Pouteria sapota</i>), utilizando marcadores isoenzimáticos	31
Figura 4. Variación isoenzimática en Injerto, <i>Pouteria viridis</i> a) PRX b) 6PHD c) SOD d) EST e) PGD f) ADH	35
Figura 5. Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes accesiones de injerto (<i>Pouteria viridis</i>), utilizando marcadores isoenzimáticos	38
Figura 6. Variación isoenzimática en Canistel, <i>Pouteria campechiana</i> a) PRX b) 6PHD c) SOD d) EST e) PGD f) ADH	41
Figura 7. Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes accesiones de Canistel (<i>Pouteria campechiana</i>), utilizando marcadores isoenzimáticos	43
Figura 8. Fenograma mostrando las relaciones entre cuatro especies de <i>Pouteria</i> , Sapotaceae	47

ÍNDICE DE CUADROS

	<u>Página</u>
Cuadro 1. Información ecofisiográfica y estado de domesticación de las accesiones de Zapote, <i>Pouteria sapota</i> , empleadas en el estudio de variación genética utilizando marcadores isoenzimáticos.	16
Cuadro 2. Información ecofisiográfica y estado de domesticación de las accesiones de Injerto, <i>Pouteria viridis</i> , empleadas en el estudio de variación genética utilizando marcadores isoenzimáticos.	17
Cuadro 3. Información ecofisiográfica y estado de domesticación de las accesiones de Canistel, <i>Pouteria campechiana</i> , empleadas en el estudio de variación genética utilizando marcadores isoenzimáticos.	18
Cuadro 4. Zimogramas presentes en las diferentes accesiones de Zapote (<i>Pouteria sapota</i>)	25
Cuadro 5. Zimogramas presentes en las diferentes accesiones de Injerto (<i>Pouteria viridis</i>)	34
Cuadro 6. Zimogramas presentes en las diferentes accesiones de Canistel (<i>Pouteria campechiana</i>)	40

**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN ESPECIES DE POUTERIA
(Sapotáceae) USANDO ISOENZIMAS COMO MARCADORES GENÉTICOS**

**DETERMINATION OF GENETIC VARIABILITY OF SPECIES OF POUTERIA (Sapotaceae)
USING ISOENZYMES AS GENETIC MARKER'S**

RESUMEN

La investigación realizada, es una caracterización isoenzimática en materiales genéticos del género *Pouteria*, *P. sapota*, *P. viridis* y *P. campechiana*, los cuales son especies nativas de Guatemala. Tal estudio es complemento de una caracterización agromorfológica y fenológica realizada por la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala en los años de 1997-1998.

En este estudio se estableció un total de 6 enzimas polimórficas —PRX, EST, SOD, PGD, 6PHD y ADH—, que reportaron diferentes zimogramas que permitieron mediante un análisis pertinente, identificar a cada una de las accesiones. Se determinó que los materiales genéticos de *P. sapota* provenientes del norte del país (Alta Verapaz y Petén) conforman un grupo homogéneo diferenciado del resto de accesiones provenientes de las otras localidades del país. Se determinó también, que los materiales genéticos en estado silvestre no se agrupan en conglomerados particulares, por lo que se puede adelantar que estos materiales no se diferencian de los materiales en estado cultivado. En *P. viridis* la máxima variación se observó en los materiales genéticos de Alta Verapaz, lo que permite suponer que dicha área es el centro de origen y dispersión de dicha especie. Los materiales genéticos en estado silvestre de *P. campechiana* no se diferencian plenamente de los materiales genéticos cultivados, debido a que como sucede en *P. sapota*, estos últimos no son el resultado de un proceso de mejora genética sino que en la mayoría de casos, son selecciones iniciales a partir de materiales en estado silvestre. La comparación entre las tres especies mencionadas y *P. fossicola*, de origen costarricense, indicó que *P. viridis* y *P. sapota* están más emparentadas entre sí, mientras que *P. campechiana* lo está con *P. fossicola*. La información generada por esta investigación, será la base para el desarrollo del programa de investigación relativo al establecimiento de tasas de cruzamiento y estructura genética en poblaciones de *Pouteria* de El Hato, San Augustin, El Progreso, que se tiene en marcha en la Facultad de Agronomía.

1. INTRODUCCION

Sapotaceae es una familia de origen tropical dentro de la cual se encuentran especies arbóreas de importancia frutícola, tal como el chico, *Manilkara zapota*; el caimito, *Chrysophyllum cainito*; el canistel, *Pouteria campechiana*; el injerto, *Pouteria viridis*; y el zapote, *Pouteria sapota*. Dichas especies son de amplia utilización dentro de las comunidades humanas, con las cuales están asociadas. Sin embargo, la Red Mesoamericana de Recursos Genéticos Vegetales (REMERFI), ha tenido a la vista el fomento de estas especies, debido a la poca transcendencia, más allá de sus regiones de origen, por lo que dicha institución declaró de importancia primordial el estudio y desarrollo del germoplasma de las sapotáceas. Este programa inició con el desarrollo de un inventario a nivel regional, acompañado de actividades en caracterización in situ, utilización, documentación y conservación.

Los primeros estudios de caracterización desarrollados en sapotáceas fueron a través del uso de caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos. Sin embargo, la clasificación con base a esta técnica es a menudo confusa dado a que los mismos son afectados generalmente por el factores ambientales en cierta medida. El uso de isoenzimas ofrece una mejor alternativa para clasificar y caracterizar colecciones de germoplasma, ya que éstas son más estables ante los efectos ambientales, así mismo presentan polimorfismos fácilmente medibles e interpretables desde el punto de vista genético.

El análisis isoenzimático ha contribuido en los últimos años a entender aspectos tales como la distribución geográfica de la variación genética y el origen, domesticación y evolución de plantas cultivadas (17)

La caracterización isoenzimática de germosplasma es útil para conocer el grado de diversidad genética y las relaciones dentro y entre las especies. Según Arulsekar *et al.* 1986 (5), como también Goldring *et al.* 1985 (21); Degani *et al.* 1990 (16); Ellstrand *et al.* 1987 (18); Tanksley *et al.* 1980 (49); y Weeden 1986 (53), en años recientes se han utilizado polimorfismos en isoenzimas para identificar cultivares y para determinar los niveles de diversidad genética en especies frutícolas.

Esta investigación se realizó con material vegetal perteneciente a la familia de las Sapotáceas, específicamente con las especies frutales del género *Pouteria* (*P. sapota*, *P. viridis* y *P. campechiana*) provenientes de diferentes regiones de Guatemala, entre ellas: Izabal, Alta Verapaz, Petén, Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos, Quetzaltenango, Huehuetenango, Chiquimula y Jutiapa (zapote); Chimaltenango, Sacatepéquez, Guatemala, Huehuetenango, Quiché, Cobán, Sololá, Jalapa y Santa Rosa (injerto); Escuintla, Quiché, Baja Verapaz y Santa Rosa (Canistel). De acuerdo a un estudio desarrollado por Azurdia *et al.* 1987 (11), concluye que las mencionadas regiones pueden ser las que contengan mayor diversidad genética en cuanto a especies del género *Pouteria*.

Esta investigación tuvo como objetivos: comprobar la existencia de variabilidad genética encontrada previamente con marcadores morfológicos (11) y determinar tanto los niveles de polimorfismo como las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies en mención.

Este estudio forma parte del proyecto "Variabilidad genética usando marcadores bioquímicos (isoenzimas) en especies de *Pouteria* (Sapotáceas) en Guatemala", que se ha realizado en el Laboratorio de Electroforésis de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con el apoyo del International Plant Genetic Resources Institute (IGPRI), a través del Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA).

2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La variabilidad genética es la materia prima de la evolución, por lo tanto lo es para el mejoramiento vegetal. La variabilidad presente en poblaciones vegetales de ciertas localidades o regiones puede ser determinada a través del uso de marcadores morfológicos, como también por medio de marcadores bioquímicos, como las isoenzimas.

Una de las ventajas del uso de la técnica de marcadores bioquímicos con respecto a la de los marcadores morfológicos es que dichos marcadores generan información sobre los caracteres genéticos, los cuales en comparación a los morfológicos, se transmiten con fidelidad de una generación a otra, lo que conlleva a decir, que dicha información guarda la identidad de dichos caracteres de padres a hijos.

Guatemala, es considerado como uno de los países de Mesoamérica que cuenta con mayor diversidad genética en Sapotáceas, tal observación fue determinada a través del uso de marcadores morfológicos en un estudio de exploración-recolección (11), pero aún así se desconoce los niveles y distribución de la variabilidad entre e intra específica del género *Pouteria*, por lo que se determinó en este estudio, el uso de las isoenzimas, como marcadores bioquímicos para tal propósito.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Marco Conceptual

3.1.1. Sapotáceas

Todos los géneros de la familia sapotáceas encontrados en Norte América también pueden ser encontrados en Guatemala. La familia también muy diseminada en Sur América incluso en el viejo mundo. Se encuentra por lo menos 25 géneros en el mundo (45).

Desde un punto de vista económico la familia tiene mucha importancia en nuestra región. La especie más importante es la sapotilla o chicozapote (*Manilkara sapota*) que se utiliza para la fabricación de chicle en el comercio y en adición a esto también es uno de los frutos tropicales más apetecidos (45).

Otros géneros de la familia como *Chrysophillum cainito* L. y *Manilkara chicle* también son aceptables como frutos y además son utilizados para la elaboración de chicle. Algunos árboles han presentado tener buena calidad de madera y algunos de ellos con madera muy duradera (45).

Por lo general son árboles o arbustos muy grandes, algunas veces maderables con espinas, con savia usualmente lechosa; algunas hojas alternas pecioladas, usualmente coriáceas; sin estípulas (45).

Flores pequeñas perfectas o raramente polígamas, fasciculadas en las axilas de las hojas o sobre los nudos defoliados por debajo de las hojas blanquecinas o amarillentas; sépalos de cuatro a doce, imbricados, anchos, por lo regular ceriseos, frecuentemente muy desiguales (45).

Corola gamopétala, lobada con un tubo usualmente corto y ancho por lo regular los apéndices en medio de los lóbulos, tanto estambres como lóbulos de la corola por lo regular alternos con los estaminodios, filamentos libres insertos sobre el tubo de la corola (45).

Ovarios sésiles de tres a cuatro lóculos, estilos unidos; óvulos solitarios en los lóculos estilos unidos; óvulos solitarios en los lóculos, anátropos, fruto una baya pequeña o por lo general muy grande; semilla una o más en cada fruto, por lo regular grandes, usualmente lisa y lustrosa sobre casi toda la superficie el embrión erecto (21).

Según Morera, 1992 (40), gran parte de las especies de frutas esféricas, dulces y con semillas grandes pertenecen a la familia de las sapotáceas, como "zapote" (*Pouteria sapota*); "zapote amarillo o injerto" (*Pouteria viridis*); "canistel" (*Pouteria campechiana*); "caimito" (*Chrysophyllum cainito*) y "chicozapote" (*Manilkara sapota*). El nombre de zapote se usa en especies de otras familias, como "zapote negro" (*Diospyros digyna*) y "zapote blanco" (*Casimiroa edulis*).

3.1.2 Electroforesis de Isoenzimas

La separación electroférica de mezclas complejas de proteínas se puede llevar a cabo en ciertos tipos de medios de soporte, incluyendo geles de almidón, poliacrilamida, agarosa y membranas de acetato de celulosa. Estos dos últimos generalmente no se emplean para polimorfismo enzimático. Cuando se requiere del poder máximo de resolución con frecuencia se prefiere con geles de poliacrilamida (13) Una propiedad valuable de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la astringencia molecular que se puede ser variada por una alternancia

de la concentración de acrilamida, entonces se incrementa la rango de los pesos moleculares que son separables (33).

Otras de las ventajas de las geles de poliacrilamida es la uniformidad y la transparencia facilitando la cuantificación densidométrica del producto. Permitiendo así una amplia compatibilidad de ensayos, usualmente en tiempos rápidos de corrida Chrambach, 1980 (14); Chrambach et al, 1971 (15); y Hames, 1981 (22).

Según Isola, 1981 (27); y Weeden, 1985 (55), algunas enzimas como la ribonucleasa y piruvato de carboxilasa, y también la amilasa Kiang, 1981 (29); y West, 1967 (56) son analizadas con el método PAGE, ya que los ensayos involucran la producción de precipitados blancos que son difíciles de observar en las geles de almidón.

La electroforésis en geles de almidón (44), continua siendo preferido para muchos estudios que involucran el análisis de un número de individuos de diferentes enzimas. Muchas son las razones: la simplicidad en la preparación de la gel de almidón, no toxicidad del material utilizado (la acrilamida monómera utilizada por el método PAGE es un neurotóxico), relativo bajo costo de equipo y facilidad del manejo de cargar las muestras dentro del gel. Las muestras de gel de almidón son homogenizadas en crudo sin centrifugar, pero el método PAGE requiere de la clarificación de las muestras. Probablemente la mayor razón para la continuación de la popularidad del gel de almidón es la diferencia en la cantidad de datos generados por gel, ya que las geles de almidón pueden ser cortadas en forma horizontal, permitiendo la multiplicidad (hasta seis) de ensayos del sistema de enzimas por el gel, mientras que las geles de poliacrilamida son usualmente revelada por una sola enzima (50).

En estudios en donde 20 o más enzimas de un gran número de plantas, es más recompensado por el relativo poder de resolución de la acrilamida (50).

Las Isoenzimas, son múltiples formas moleculares de las enzimas, es decir son enzimas que comparten un substrato común pero tienen diferente movilidad electroforética (36).

Las isoenzimas pueden observarse cuando los extractos del tejido se someten a electroforesis en uno de los varios tipos de geles y posteriormente se sumergen en soluciones conteniendo los colorantes específicos para cada enzima. El análisis genético pueden indicar que algunas de las variantes electroforética son codificadas por alelos alternos en un locus, en cuyo caso los productos alélicos se denominan aloenzimas. Los datos que se obtienen de las geles consisten de un número de productos enzimáticos con relativa movilidad 8 a 9 bandas, los que con análisis genético apropiado se transforman en genotipos con un locus o multilocus para cada individuo analizado (50).

3.1.3 Genética de la isoenzimas vegetales

La habilidad de observar variaciones alélicas en las isoenzimas en estudios de la genética bioquímica, ha evolucionado en gran medida entre las poblaciones genéticas (25). Esta variación llamada polimorfismo aloenzimico ha sido usada en plantas para examinar los procesos genéticos en todos los estadíos de su ciclo de vida y asegurar la diversidad genética en todos los cultivos (36).

El potencial para utilizar aloenzimas como marcadores genéticos no fue inmediatamente comprendido, sino hasta cuando la variabilidad de isoenzimas fue inicialmente descrito Hunter, 1957 (25); y Loveles, 1984 (36). Los estudios de polimorfismo de aloenzimas conducidos por

Kimura, 1983 (30) y Kimura et al, 1964 (31), han permitido establecer que algunas poblaciones presentaron relativamente altos niveles de polimorfismo en isoenzimas, lo cual ha conducido a una consideración de la teoría de la evolución.

El rol principal de la selección y mutación en la preservación del polimorfismo aloenzimático continua siendo un debate, pero estos desacuerdos no han interferido en el uso de estas variantes genéticas en un sin fin de aplicaciones (50).

3.2.2 Isoenzimas y análisis de la estructura genética en las plantas

Ecologistas y biólogos, estudiosos de la evolución de las plantas han reconocido que estas no están distribuidas al azar en comunidades, pero que si están distribuidas en distintas localidades. La heterogeneidad del ambiente usualmente es citado como un factor que juega un papel decisivo en dicha evolución, pero también lo son importantes los patrones de colonización y los eventos estocásticos que afectaran el establecimiento y la mortalidad (24). Recientemente los biólogos estudiosos de la evolución, han demostrado que la variación genética en poblaciones de las plantas también está distribuida de una forma no aleatoria, Allard et al, 1972 (2); Antonivics, 1971 (3) y Harrick, 1989 (23).

Más que las plantas en si, los genes y genotipos tienden a agruparse con algunas diferencias genéticas bastante marcadas sobre distancias con diferencias cortas. Esta distribución no aleatoria de variación genética es por regular referida como estructura genética de una población (34).

3.2 Marco Referencial

3.2.1 Material Fitogenético Utilizado

Las especies de *Pouteria* estudiadas son las siguientes: *P. sapota*, *P. viridis* y *P. campechiana*. Las regiones o sitios de recolección fueron aquellos que en un estudio previo de exploración y caracterización in situ, se determinó mayor diversidad morfológica en cuanto a algunas especies de sapotáceas (11). Dichas regiones son las siguientes: Petén Quiche, Suchitepéquez, San Marcos, Izabal, Guatemala, Escuintla, Quetzaltenango, Retalhuleu, Huehuetenango, Chiquimula, Jutiapa, Jalapa, Chimaltenango, Santa Rosa, Sololá, Sacatepéquez, Alta Verapaz y Baja Verapaz.

3.2.1.1 Zapote, *Pouteria sapota* (Jacq.) Moores & Stearn

Esta especie es probablemente nativa del sur de México, Guatemala, Belice Norte de Honduras y posiblemente extendiéndose a la costa Atlántica de Nicaragua (43). El nombre del Zapote se deriva del azteca "tzapotl" es un nombre colectivo que se aplica a varias especies de frutas esféricas, dulces y con semillas grandes (38) Este es un árbol que se ha considerado como parte de la selva alta, sin embargo su presencia en dicho tipo de vegetación es sumamente restringida, se le puede encontrar en forma ocasional en aquellas áreas protegidas del Norte de Petén (11).

El zapote crece en forma silvestre desde el nivel del mar hasta 1000 msnm con temperaturas que oscilan entre los 22° C y 32° C Puede adaptarse desde zonas secas hasta húmedas. Sin embargo se considera óptimo que reciba lluvias adecuadas y bien distribuidas. Son adecuados los suelos franco-arenosos y bien drenados, con buena fertilidad y con un pH entre 5 y 6.5 (39).

En general las sapotáceas se han propagado por semilla. Existen pocas plantaciones comerciales, los frutos para el consumo corriente provienen de los árboles solitarios que crecen cerca de las viviendas o intercalados con otros cultivos perennes tales como el caso cacao y el café. La producción se alcanza a los 7 y 8 años, al ser propagado por semilla. Esto genera gran variación en las poblaciones, disminuyendo en gran medida la posibilidad de cosechar genotipos uniformes en tamaño, peso, y calidad. Actualmente los métodos de propagación vegetativa se realizan por medio del injerto, este sistema mejora las características de productividad y reduce a la mitad el periodo entre la siembra y la cosecha (38).

Los frutos de zapote pueden ser consumidos como fruta fresca, la pulpa además puede ser usada para hacer jaleas o conservas, helados y jugos. La pulpa usualmente cocinada puede ser sustituto aceptable de la salsa de manzana o usarse en pastelería. De la semilla se pueden extraer aceites, los cuales tienen usos múltiples medicinales, como de tónico para la piel, como revitalizador del pelo evitando su caída (38).

3.2.1.2 Injerto, *Pouteria viridis* (Pittier) Cronquist

Esta especie se le puede encontrar en Sur Este de México, Guatemala, Honduras hasta Costa Rica. La mayoría de los materiales recolectados en Guatemala son originarios de bosques montanos, entre los 1000-1500 msnm de altitud; mientras que en Nicaragua y Costa Rica puede encontrarse en las tierras bajas en bosques húmedos entre 100-200 msnm (45).

En Guatemala se puede encontrar en localidades ubicadas a altitudes que van desde los 1100 hasta 1800 msnm, aunque existen algunos ejemplares localizados a menor altitud: La Joya, Nueva Santa Rosa a 900 msnm; Moyuta, Jutiapa a 750 msnm. También se le puede encontrar

Nueva Santa Rosa a 900 msnm; Moyuta, Jutiapa a 750 msnm. También se le puede encontrar asociada con el zapote, *Pouteria sapota*; en huertos familiares algunas pocas localidades de Guatemala, tal es el caso de Río Blanco, Sacapulas en el Quiché y Cuilco, Huehuetenango (10)

El injerto es una fruta que es consumida en fresco por una buena parte de la población guatemalteca. Sin embargo, no tiene la popularidad que tiene el zapote, fruto con el cual es comúnmente confundido; pero aún así en lo que es Guatemala, éstas dos especies crecen en habitat bien definido, afirmándose que el zapote es propio de zona cálidas, húmedas o secas y el injerto de áreas más templadas con alta humedad relativa (caso de Alta Verapaz) o humedad intermedia (alrededor de 1200 mm anuales). Su distribución queda reflejada en la expresión popular que dice que el injerto es un zapote de tierra fría, mientras que *P. sapota* es un zapote de clima cálido (10).

Según Standley y Styermark 1976 (48) estiman que los frutos de las especies son muy diferentes, de tal manera que no queda duda que ambos son taxa diferentes, aunque parece imposible separarlas mediante comparación de caracteres morfológicos. Adicionalmente Pennington (1990) menciona que a nivel de herbario estas especies pueden ser separadas observando las hojas densamente pubescentes que tiene *P. viridis*; además, este mismo autor menciona que a nivel de campo se pueden encontrar formas de fruto intermedio entre árboles cultivados de zapote e injerto; y que además pueden diferenciarse, ya que el fruto de *P. viridis* tiene un fino y más delicado sabor que de *P. sapota* (45)

Entre los nombres comunes con que se le conoce a esta especie en diferentes localidades o regiones están: injerto, yas-tul (Guatemala); zapote injerto (El Salvador); zapote blanco (Costa Rica); y zapote mico (Nicaragua) (45)

3.2.1.3 Canistel, Canitzé, Pouteria campechiana (HBK.) Baehni

Este es uno de los árboles típicos del bosque tropical, considerándose como indicador de dicho tipo de vegetación. Sin embargo, en la actualidad esta especie es cultivada en la Florida, Cuba y algunos otros lugares (43). Las semillas de esta especie tienen gran cantidad de reservas, lo que les permite germinar apropiadamente y formar raíces que pueden alcanzar el suelo dando como resultado que en el bosque se le encuentre con una alta densidad poblacional; además, el hecho que el fruto es apetecido por animales, ayuda en la dispersión de las semillas, favoreciendo de esta manera su alta densidad en el bosque (1). La madera de esta especie es de buena calidad y sus frutos pueden ser comestibles, aunque la mayoría de personas consultadas por *azurdia et al.* 1997 (11) manifestaron que no lo consumen sino que únicamente son utilizados por la fauna silvestre.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la variabilidad y relación filogenética entre especies frutales del género *Pouteria* (Sapotáceae) en Guatemala, usando marcadores bioquímicos (isoenzimas).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Desarrollar los protocolos adecuados para las diferentes isoenzimas a utilizar en el estudio de diversidad genética de las especies del genero *Pouteria*.
- 4.2.2 Determinar la variabilidad genética (niveles de polimorfismo) entre diferentes especies de *Pouteria* .
- 4.2.3 Determinar las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de *Pouteria*, utilizando índices de similitud.

5. HIPOTESIS

El uso de isoenzimas como marcadores bioquímicos revelará la variabilidad y las relaciones filogenéticas en el género *Pouteria*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Determinación de protocolos

6.1.1. Material Vegetal

El material experimental consistió de 37 accesiones de *Pouteria sapota* (cuadro 1), 21 accesiones de *Pouteria viridis* (cuadro 2) y 13 accesiones de *Pouteria campechiana* (cuadro 3), las cuales representan parte de la colección obtenida en el proyecto de inventario de Sapotáceas realizado durante 1995 y 1996 a nivel nacional. Para el caso de zapote, las accesiones representan la colección nuclear previamente elaborada (11). Los datos de pasaporte más importantes de estos materiales se presentan en el anexo 3.

Debido a que en Sapotáceas no se tenía referencias relativas a estudios isoenzimáticos, fue necesario probar diferentes protocolos para establecer los más adecuados y las isoenzimas polimórficas. Se utilizó inicialmente la información obtenida por en estudios conducidos en nuestro laboratorio en cacao, (*Theobroma cacao*), así como diversas fuentes bibliográficas pertinentes (37)

6.1.2 Colecta y transporte de la muestra

El tejido utilizado fue los brotes tiernos, ya que no era posible la extracción de las raíces, dada la condición de plantas únicas de tipo arbóreo. Los brotes se transportaron en bolsas de nylon debidamente identificadas. Estas bolsas se mantuvieron en una hielera con la finalidad de mantener la turgencia de las hojas, reduciendo la pérdida de humedad de las muestras.

Cuadro 1. Información ecofisiográfica y estado de domesticación de las accesiones de zapote, *Pouteria sapota*, empleadas en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Identificación	Departamento	Altitud (msnm)	Zona de vida	Estado de domesticación
AV-11	Alta Verapaz	960	bmh-S(c)	Cultivado
AV-16	Alta Verapaz	800	bmh-S(c)	Cultivado
AV-18	Alta Verapaz	90	bmh-S(c)	Cultivado
AV-34	Alta Verapaz	182	bmh-S(c)	Cultivado
AV-40	Alta Verapaz	290	bmh-S(c)	Cultivado
AV-47	Alta Verapaz	519	bmh-S(c)	Cultivado
CHQ-5	Chiquimula	890	bs-S	Cultivado
ESC-23	Escuintla	305	bmh-S(c)	Cultivado
HUE-12	Huehuetenango	1200	bh-S(t)	Cultivado
IZA-3	Izabal	50	bmh-S(c)	Cultivado
IZA-38	Izabal	400	bmh-S(c)	Cultivado
IZA-41	Izabal	50	bmh-S(c)	Silvestre
IZA-45	Izabal	5	bmh-S(c)	Cultivado
JUT-51	Jutiapa	850	bs-S	Cultivado
JUT-55	Jutiapa	550	bs-S	Cultivado
PET-4	El Petén	180	bh-S(c)	Silvestre
PET-5	El Petén	220	bh-S(c)	Silvestre
PET-8	El Petén	175	bh-S(c)	Cultivado
PET-12	El Petén	200	bh-S(c)	Cultivado
PET-16	El Petén	225	bmh-S(c)	Cultivado
PET-24	El Petén	150	bh-S(c)	Silvestre
PET-29	El Petén	200	bb-S(c)	Cultivado
PET-34	El Petén	151	bmh-S(c)	Cultivado
PET-37	El Petén	210	bmh-S(c)	Silvestre
PET-46	El Petén	330	bmh-S(c)	Cultivado
PET-51	El Petén	300	bmh-S(c)	Cultivado
QUE-21 A	Quetzaltenango	290	bmh-S(c)	Cultivado
QUI-1	El Quiché	800	bh-S(t)	Cultivado
REU-20	Retalhuleu	315	bmh-S(c)	Cultivado
REU-32	Retalhuleu	455	bmh-S(c)	Silvestre
REU-33	Retalhuleu	455	bmh-S(c)	Silvestre
REU-35	Retalhuleu	455	bmh-S(c)	Silvestre
REU-46	Retalhuleu	455	bmh-S(c)	Silvestre
REU-77	Retalhuleu	455	bmh-S(c)	Silvestre
SMA-72	San Marcos	180	bmh-S(c)	Cultivado
SUCH-57	Suchitupéquez	400	bmh-S(c)	Cultivado
Tzitzil	El Quiché	800	bh-S(t)	Cultivado

Cuadro 2. Información ecofisiográfica y estado de domesticación de las accesiones de injerto, *Pouteria viridis*, empleadas en el estudio de variabilidad genética, usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Identificación	Departamento	Altitud (msnm)	Zona de vida	Estado de domesticación
GUA-12	Guatemala	1,400	bh-S(t)	Cultivado
GUA-14	Guatemala	1,300	bh-S(t)	Cultivado
GUA-15	Guatemala	1,300	bh-S(t)	Cultivado
CHI-9	Chimaltenango	1,800	bmh-S(t)	Cultivado
CHI-11	Chimaltenango	1,850	bmh-S(t)	Cultivado
CHI-19	Chimaltenango	1,850	bmh-S(t)	Cultivado
SAC-2	Sacatepéquez	1,380	bh-S(t)	Cultivado
SOL-1	Sololá	1,650	bh-S(t)	Cultivado
SOL-4	Sololá	1,600	bh-S(t)	Cultivado
SOL-6	Sololá	1,600	bh-S(t)	Cultivado
SOL-7	Sololá	1,600	bh-S(t)	Cultivado
SOL-9	Sololá	1,600	bh-S(t)	Cultivado
SOL-13	Sololá	1,600	bh-S(t)	Cultivado
SOL-15	Sololá	1,600	bh-S(t)	Cultivado
SJCH-20	Alta Verapaz	1,350	bmh-S(f)	Cultivado
SJCH-37	Alta Verapaz	1,350	bmh-S(f)	Cultivado
SJCH-43	Alta Verapaz	1,350	bmh-S(f)	Cultivado
SJCH-45	Alta Verapaz	1,350	bmh-S(f)	Cultivado
SPC-2	Alta Verapaz	1,350	bmh-S(f)	Cultivado
Pie del Aguila	El Quiché	1,100	bh-S(t)	Cultivado
HUE-7	Huehuetenango	1,200	bh-S(t)	Cultivado

Cuadro 3. Información ecofisiográfica y estado de domesticación de las accesiones de Canistel, *Pouteria campechiana*, empleadas en el estudio de variabilidad genética, usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Identificación	Departamento	Altitud (msnm)	Zona de vida	Estado de domesticación
BV-1	Baja Verapaz	945	bh-S(t)	Cultivado
ESC-26	Escuintla	775	bmh-S(c)	Silvestre
ESC-27	Escuintla	775	bmh-S(c)	Silvestre
ESC-28	Escuintla	775	bmh-S(c)	Silvestre
QUI-1	El Quiché	1,100	bh-S(t)	Cultivado
QUI-57	El Quiché	1,100	bh-S(t)	Cultivado
QUI-59	El Quiché	1,100	bh-S(t)	Cultivado
QUI-62	El Quiché	1,100	bh-S(t)	Cultivado
QUI-65	El Quiché	1,100	bh-S(t)	Cultivado
STR-31	Santa Rosa	800	bmh-S(c)	Silvestre
STR-33	Santa Rosa	800	bmh-S(c)	Silvestre
STR-34	Santa Rosa	800	bmh-S(c)	Silvestre
STR-36	Santa Rosa	850	bmh-S(c)	Silvestre

6.1.3 Obtención del extracto vegetal (muestra)

Se tomaron de 50 a 80 mg de hoja tierna recién cortada y se homogenizaron con 800 a 1,000 microlitros de buffer de extracción en mortero frío. Cada muestra de extracto se trasladó a un tubo de reacción frío debidamente identificado, el cual se centrifugó durante 10 a 15 minutos a 3,500 rpm. en ambiente frío. Se tomaron 250 microlitros del sobrenadante de la muestra, los cuales se pasaron a otro tubo de reacción en frío, al cual previamente se le añadió 50 microlitros de glicerol con la finalidad de agregarle peso a la muestra. Al llegar a esta fase, las muestras estaban listas para dar inicio a la electroforésis. Estas muestras se mantuvieron en congelación un tiempo que no sobrepasó los 3 días.

El buffer de extracción utilizado fue el siguiente:

35 ml de 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5

2% de Triton X-100

2% de Dithioetrol

5% de Polyvinylpolypyrrolidone

Las dos últimas sustancias (Dithioetrol y Polyvinylpolypyrrolidone) se agregaron al momento de ser usado el buffer. También se agregó 1 mg de Bromofenol a cada 10 ml de buffer, que fue el que indicó el "frente" durante la corrida electroforética (32).

6.1.4 Preparación de las geles de poliacrilamida

El sistema que se utilizó fue un sistema discontinuo consistente en una gel de resolución con 12% de acrilamida y una gel de concentración al 4% de acrilamida (15), con una modificación de una tercera gel con un pH 8.3. La electroforesis se efectuó en una dimensión, siguiendo el método de (32), pero sin la adición de dodecilsulfato de sodio (SDS). Las soluciones madres para la preparación de las geles y amortiguadores se presentan en el anexo 1.

6.1.5 Cargado de las muestras

Cuando el aparato de electroforesis tenía colocadas las geles de concentración ya polimerizadas se procedió a añadir el buffer de electrodo frío. Inmediatamente después se depositaron 15 microlitros del extracto vegetal en cada pozo para geles pequeñas de 11.2 x 8.3 cm (Mini-PROTEAN II) o 60 microlitros, cuando se trabajó con geles grandes de 20 x 16 cm (PROTEAN II). En cada caso se realizó la aplicación utilizando una micropipeta.

6.1.6 Realización de la corrida electroforética

La corrida electroforética se realizó en un ambiente totalmente frío, manteniendo el aparato de electroforesis dentro de un refrigerador a una temperatura de -4°C , rodeado por maquetas de hielo. Además, a este aparato se le conectó un sistema de recirculación de agua fría. La corrida se realizó haciendo uso de un voltaje de 200 volts, proveniente de una fuente de poder de corriente continua, durante 1 hora para el aparato de geles pequeñas (Mini-PROTEAN II) o durante 4 horas para el aparato de geles grandes (PROTEAN II).

6.1.7 Tinción y revelación de enzimas

Durante el transcurso de la corrida, se procedió a pesar y a medir los reactivos para tefir dos enzimas, debido a que solo se corrieron dos geles en cada ensayo. Inmediatamente después de finalizado el tiempo de corrida, se procedió a apagar la fuente de poder y el recirculador y se separaron las geles en forma simultánea. Luego se diluyeron los reactivos para formar el colorante específico para la enzima que se quiso revelar. Para identificar la posición u orden de las muestras, a la gel se le hizo un corte en la esquina inferior izquierda. Para tefir se utilizaron 50 ml de colorante para geles pequeñas y 100 ml para geles grandes.

Cuando se obtuvo el revelado de enzimas, se procedió a lavar las geles con agua destilada y se fijaron con una solución compuesta de ácido acético, metanol y agua en proporciones de 1:2:4 (46).

6.1.8 Sistemas enzimáticos evaluados

Para la determinación de los protocolos, se realizaron pruebas para las siguientes isoenzimas: Alcohol dehidrogenasa (ADH:EC 1.1.1.1), 6. Fosfogluconato dehidrogenasa (6PGD: E.C.1.1.1.44), Xiquimato dehidrogenasa (SKD: E.C. 1.1.1.25), Isocitrato dehidrogenasa (IDH:E.C. 1.1.1.41), Malato dehidrogenasa (MDH: E.C.1.1.1.37), Enzima málica (ME: E.C.1.1.1.140), Fosfatasa ácida (ACP:E.C. 3.1.3.2), Peroxidasa (PRX: E.C. 1.11.1.7), Esterasa (EST: E.C. 3.1.1), Fosfogluconato dehidrogenasa (PGD: E.C. 1.1.1.44), Superoxido dismutasa (SOD: E.C. 1.15.1.1) entre otras. Se utilizaron tanto geles de almidón como de poliacrilamida. Las soluciones reveladoras de estas enzimas se describen en el anexo 2.

6.2 Análisis de la información

La información obtenida fue analizada para establecer la diversidad genética entre las diferentes especies (Coeficiente Nei) así como sus relaciones intraespecíficas (Coeficiente Dice) por medio del paquete estadístico NTYSYS.

Para el efecto se utilizaron dos variables: la distancia de migración de las bandas, la cual sirvió para establecer la figura de los zimogramas; la segunda variable es la presencia o ausencia de bandas, con la cual se elaboró el fenograma que agrupa a los materiales vegetales contemplados en esta investigación.

Se dibujaron a escala los zimogramas de las diferentes enzimas estudiadas y de acuerdo a la distancia de migración, se les dio un nombre. Las relaciones fenéticas y filogénicas entre e intra especies se establecieron a partir de los dendrogramas, tomando como parámetro los índices de similitud determinados con NTYSYS. Con los coeficientes de distancia genética, obtenidos también con NTYSYS, se determinó la variabilidad genética.

7. RESULTADOS

7.1 Gel seleccionada y tinción de enzimas para cada especie

El tipo de gel seleccionado fue la de acrilamida ya que las geles de almidón no reportaban detalle de las diferentes isoenzimas que presentaron actividad. Las geles de poliacrilamida mostraron mayor poder de resolución, especialmente en isoenzimas como Esterasa. El CIAT reporta similares resultados en estudios conducidos en las colecciones de yuca (26). El buffer de extracción utilizado fue el reportado por Mejía y Enríquez, 1996 (37), con la diferencia que en lugar de mercaptoethanol se empleó Dithiotreitol (DDT).

Para los diferentes protocolos probados para la tinción de las enzimas mencionadas, se obtuvieron los siguientes resultados: no mostraron actividad SDKH, IDH y MDH; baja resolución EM, ACP; alta resolución y polimorfismos PRX, ADH, EST, PGD, SOD y 6PGDH.

El protocolo de tinción utilizado para PRX fue el sugerido por Vallejos (48) y para el resto de isoenzimas polimórficas el reportado por Wendel, 1999 (52); Weeden, 1986 (53); y Smith, 1955 (46).

Para la presentación de los resultados de las tres especies estudiadas se elaboró, para cada especie, un cuadro (zimograma) y dos figuras (variación isoenzimática y fenograma).

7.1.1. Resultados para *Pouteria sapota*

La variación observada entre accesiones indica, que el germoplasma de zapote es altamente heterogéneo, existiendo diferencias cualitativas y cuantitativas que pueden ser utilizadas para la identificación de los materiales (Cuadro 4 y Figuras 1 y 2).

Peroxidasa mostró ser altamente polimórfica, teniendo un total de 15 zimogramas (Figura 1.a). Estudios conducidos en especies de *Phaseolus* indican alto polimorfismo, a tal grado que cada especie presenta su propio zimograma, es decir, tan sólo el zimograma de Peroxidasa es suficiente en la diferenciación de especies (12). Esta enzima presenta el problema que la interpretación genética se dificulta por lo complejo de los zimogramas. Weeden (1986), menciona que en *Phaseolus vulgaris*, *peroxidasa* puede considerarse como una enzima con dos alelos, presentando tres genotipos, aunque remarca el hecho que esta clasificación es tentativa, requiriéndose estudios adicionales para confirmarlo (51). Información adicional reportada por García *et al* (1982) indica que en centeno peroxidasa es una enzima monomérica (20).

Cuadro 4. Zimogramas presentes en las diferentes accesiones de zapote, *Pouuteria sapota*, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Identificación	Isoenzima					
	ADH	PRX	EST	PGD	6PHD	SOD
PET-5	a	a	a	k	a	a
PET-8	b	b	b	l	b	b
PET-12	c	c	c	m	b	c
PET-16	d	b	d	m	b	d
PET-24	e	c	a	m	c	e
PET-29	f	a	b	m	b	c
PET-34	g	a	e	n	c	b
PET-37	h	d	f	n	c	f
PET-51	b	d	g	a	c	b
PET-46	b	c	h	a	d	d
AV-16	i	b	i	o	b	a
AV-18	i	a	i	a	d	c
AV-40	c	b	b	p	b	b
AV-47	j	d	j	q	d	b
AV-11	k	e	k	a	d	b
AV-34	l	f	c	c	d	a
CHQ-5	l	f	k	r	d	g
REU-20	g	g	l	s	d	b
REU-77	m	h	j	s	b	c
SMA-72	n	l	j	s	e	a
PET-4	b	j	x	a	d	h
Rfo Blanco	l	j	m	b	e	l
Caquil	o	k	-	b	f	i
Tzitzil	p	j	n	c	f	j
REU-32	l	l	o	b	g	l
REU-33	b	j	p	b	b	d
REU-35	o	m	-	d	d	l
REU-46	n	j	p	b	b	l
IZA-3	b	n	o	e	d	i
IZA-38	n	j	q	f	a	d
IZA-41	c	n	r	a	b	d
IZA-45	b	m	s	b	b	d
JUT-51	p	n	t	g	c	c
JUT-55	l	o	u	h	c	c
QUE-21 A	b	m	h	i	c	d
HUE-12	b	k	v	j	c	d
ESC-23	b	m	d	i	a	i
SUCH-57	l	j	w	i	a	d

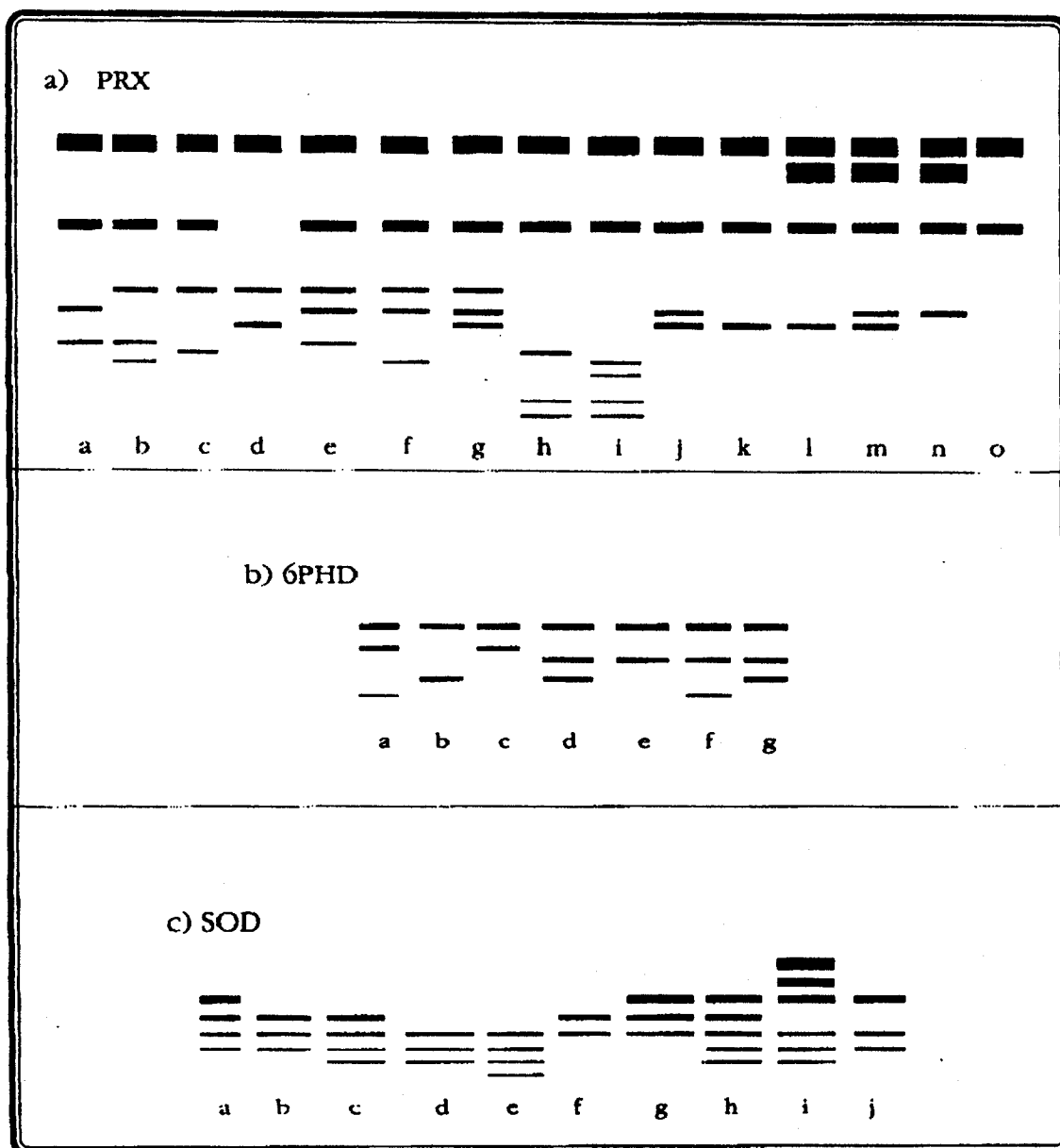


Figura 1. Variación isoenzimática en zapote, *Pouteria sapota*: a) PRX, b) 6 PHD, c) SOD, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

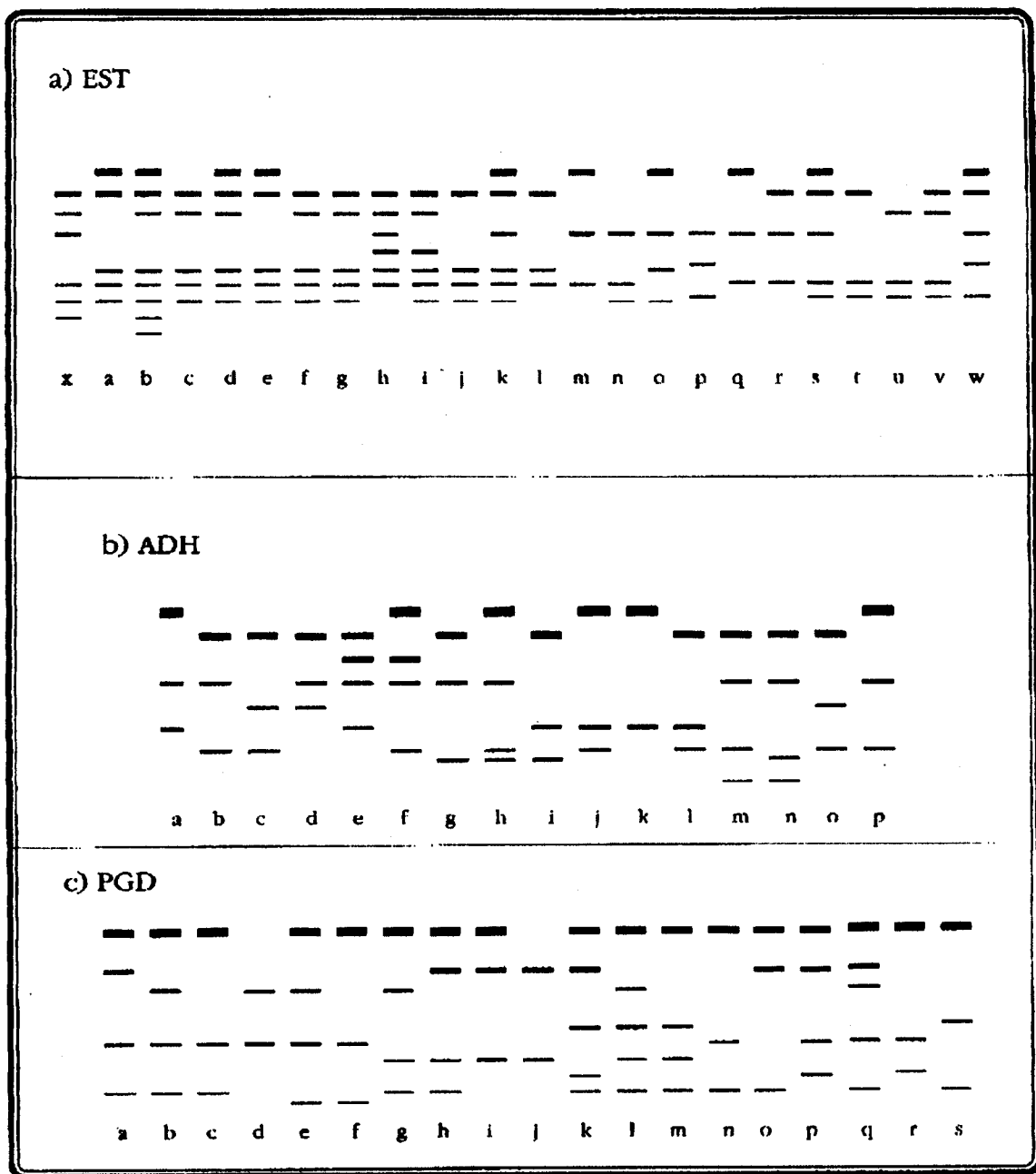


Figura 2. Variación isoenzimática en zapote, *Pouteria sapota*: a) EST, b) ADH, c) PGD, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

En la Figura 1.a se puede identificar una región que aparentemente representa un gene con dos alelos, siendo la proteína producida del tipo monomérico. Los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a la naturaleza estructural de la enzima, pueden ser diferentes a los reportados previamente en *Phaseolus* ya que en éstos se utilizó la raíz, la cual según dichos autores proporciona las bandas más claras y repetibles. En el caso del zapote, el zimograma "j" es el más abundante (18 % de las accesiones) y seguido por los zimogramas "a", "b" y "m" (11% de las accesiones).

La enzima 6PHD mostró un total de siete zimogramas diferentes (Figura No. 1.b) constituido cada uno de ellos por tres bandas. En forma preliminar se puede decir que se tiene la presencia de un gene con cuatro alelos. Sin embargo, otros estudios han indicado que en otras especies esta enzima es dimérica (41). El zimograma "b" fue el más frecuente (29 % de accesiones), seguido por los zimogramas "c" y "d" (21 % cada uno de ellos).

Superóxido dismutasa mostró 11 zimogramas constituidos por patrones de bandeo complejos (Figura 1.c), no pudiendo interpretarse la estructura de esta proteína. Información proveniente de otras especies indica que esta enzima puede ser dímera o tetrámera (41). Jaaska and Jaaska (1988) estudiando variación en *Phaseolus* y *Vigna* indican que en las especies pertenecientes a este género hay tres zonas de presencia de la enzima, cada una de ellas representando un monómero y con al menos dos alelos (28). En este estudio el zimograma "d" fue el más frecuente (24 % de las accesiones) y el "b" y "c" 16 % cada uno.

En el caso de Esterasa, se observaron un máximo de nueve bandas altamente reproducibles y que llegaban a conformar 24 zimogramas diferentes dentro de las 37 accesiones estudiadas (Figura 2.a). Estos resultados concuerdan con los planteados por Hussain *et al.* (1987) quienes

anotan que en Yuca (*Manihot*) la Esterasa es útil para caracterización de germoplasma debido a que presenta bandas altamente reproducibles y alto polimorfismo (26). Sin embargo, la interpretación genética de dichos zimogramas es dificultosa, tal como resultó en estudios conducidos en cacao (37). En otros estudios se ha reportado la Esterasa como una enzima producida por varios genes, siendo principalmente de tipo monomérica (tomate, (47); frijol, (54); para nuestro caso, solamente una región, la más catodal presenta características monoméricas con dos alelos (Figura 2.a). Por el alto número de zimogramas observados, esta enzima permite establecer diferencias entre la mayoría de accesiones estudiadas. Con la información de otros patrones enzimáticos se puede establecer un patrón de bandas específico para cada accesión, aspecto útil en identificación de materiales genéticos. Los zimogramas más frecuentes fueron el "b" y "j" (8% de accesiones).

Alcohol dehidrogenasa se cree que es un dímero (19 y 41). Sin embargo, como se observa en la figura 2.b, los zimogramas presentan varias regiones de reacción, sin poder identificarse la naturaleza de la enzima, por lo que no se tiene evidencia de que ADH sea dimérica. En el presente caso, los zimogramas de ADH indican que se trata de una enzima monomérica con tres alelos en la región más anodal. Se pueden observar 16 zimogramas, lo cual es valioso en el sentido de identificar numerosas accesiones particulares debido a que presentan un zimograma único. El zimograma más frecuente fue el "a" (24 % de accesiones) y el "c" (8 % de accesiones).

Fosfogluconato dehidrogenasa es reconocida como una enzima dímera (41 y 42) La figura 2.c muestra 19 zimogramas, los cuales no muestran ninguna evidencia de ser producto de una enzima dímera; más parecería ser el producto de una enzima monomérica; La región más catodal, por ejemplo, sugiere la presencia de cinco alelos. Los zimogramas más frecuentes son el "b" y "a" (15 % de accesiones cada uno) y el "m" (11 % de accesiones).

El análisis de grupos (Figura 3) muestra la alta variación presente en las accesiones analizadas. Se puede observar que existe una accesión procedente de Petén (PET-5), la cual presenta variación única. Sería importante considerar este material para conservación en colección de campo y para conformar una colección nuclear. Este último aspecto ya ha sido considerado por Azurdia *et al.* (11).

Los dos núcleos mayoritarios restantes están constituidos el primero por materiales procedentes de Petén y Alta Verapaz y el segundo, por los restantes materiales procedentes de las otras localidades bajo estudio. Aparentemente los materiales de Petén y Alta Verapaz conforman un grupo genético que puede ser diferenciado de los restantes del país. Esta región posee suelos y vegetación diferente a los presentes en las mismas zonas de vida de la costa sur del país, siendo ésta una posible causa de estas diferencias en cuanto a diversidad genética.

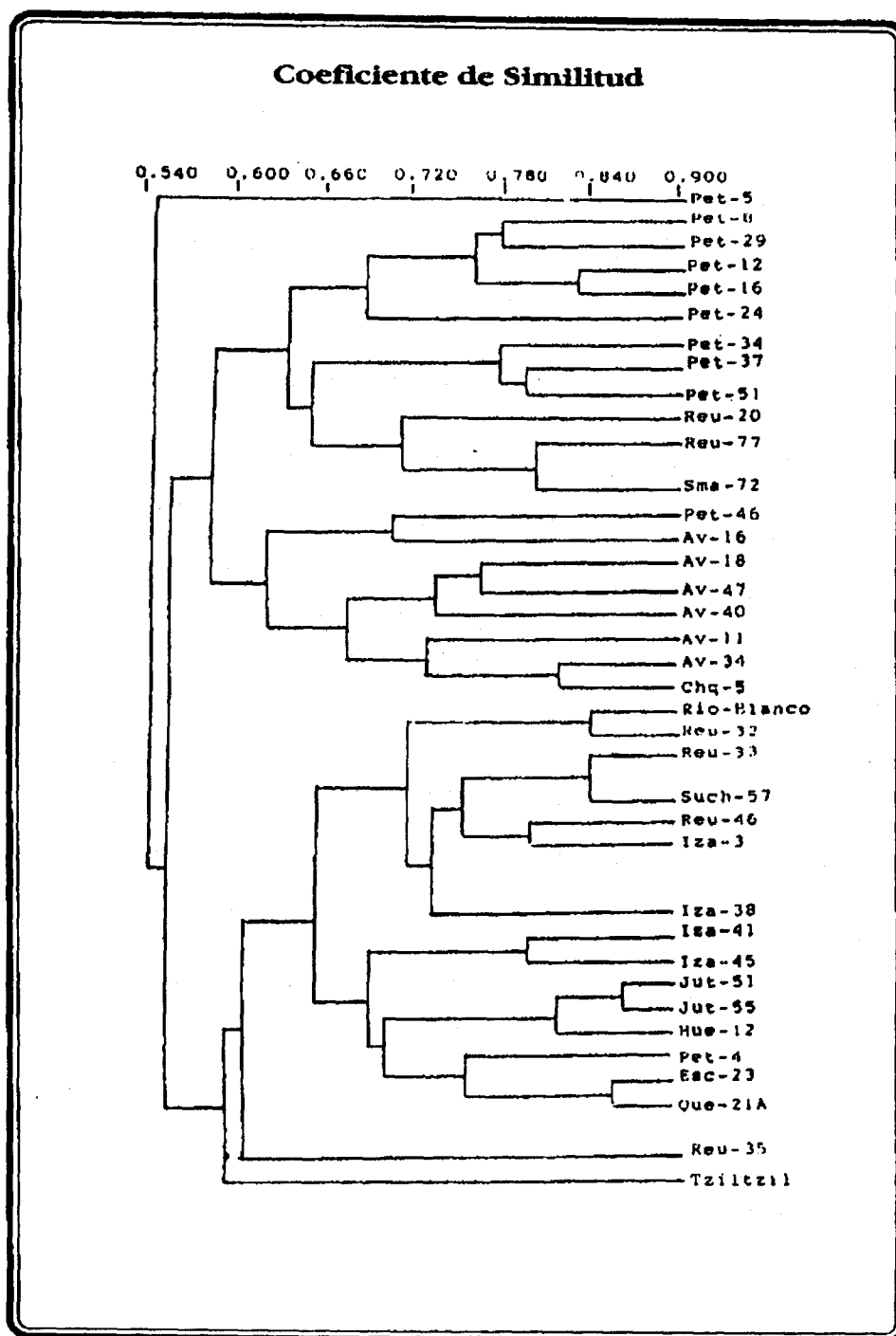


Figura 3. Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes accesiones de zapote, *Pouteria zapota*, usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Otro aspecto a considerar es el comportamiento de las accesiones en estado silvestre. En la agrupación definida por el análisis de grupos es notorio que las accesiones silvestres no conforman un núcleo particular, por lo tanto, no se pueden diferenciar claramente de los materiales cultivados. Debe recordarse que el zapote cultivado en Guatemala no representa el producto de un proceso de mejoramiento genético, sino que en la mayoría de los casos los materiales cultivados han sido obtenidos a partir de materiales genéticos en estado silvestre o bien son aquellos árboles que han quedado como remanentes de la vegetación original. En otras palabras, el zapote cultivado no presenta grandes diferencias morfológicas con respecto al silvestre, tal como ha sido anotado por Azurdia *et al.* (1995) para la región de Petén (8).

Es notorio que existe alta diversidad genética en el material estudiado, sin embargo, dada la información altamente confiable proporcionada por el análisis isoenzimático, es posible tomar un número de accesiones que represente la variabilidad total. En este sentido, se han seleccionado 24 accesiones para conformar la colección nuclear de zapote que representará a la colección nacional de zapote (11).

7.1.2. Resultados para *Pouteria viridis*

Los resultados sobre el polimorfismo en esta especie se pueden apreciar en el cuadro 5 y figura 4 . Se observa, por ejemplo, que PRX mostró un total de 18 zimogramas, con un total 9 bandas (Figura 4.a), siendo el zimograma identificado con la letra "m" el más frecuente (14 % de las accesiones lo presentaban).

Esta enzima es particularmente importante para injerto dado que es aún más polimórfica que en zapote, en donde como ya se mencionó, se presentaron tan sólo 15 zimogramas en 37 materiales genéticos. Con respecto a esta enzima, en injerto la mayoría de materiales genéticos analizados tienen su propio zimograma, lo cual es importante para establecer la identificación de cada accesión. La interpretación genética de los zimogramas se complica dado a que se observan varias zonas de actividad, siendo lo más probable que se trate de una enzima monomérica con tres alelos localizados en la parte más catodal.

La enzima 6PHD mostró seis zimogramas con un total de cinco bandas (Figura 4.b). La interpretación genética se dificulta debido a que las bandas mostradas no presentan un patrón específico que permita definir la naturaleza cuaternaria de la proteína, aparentemente, la región más catodal muestra una enzima monomérica con tres alelos. El zimograma "a" es el más frecuente (41 % de las accesiones), seguido de "b" y "c" (23 % de las accesiones cada uno).

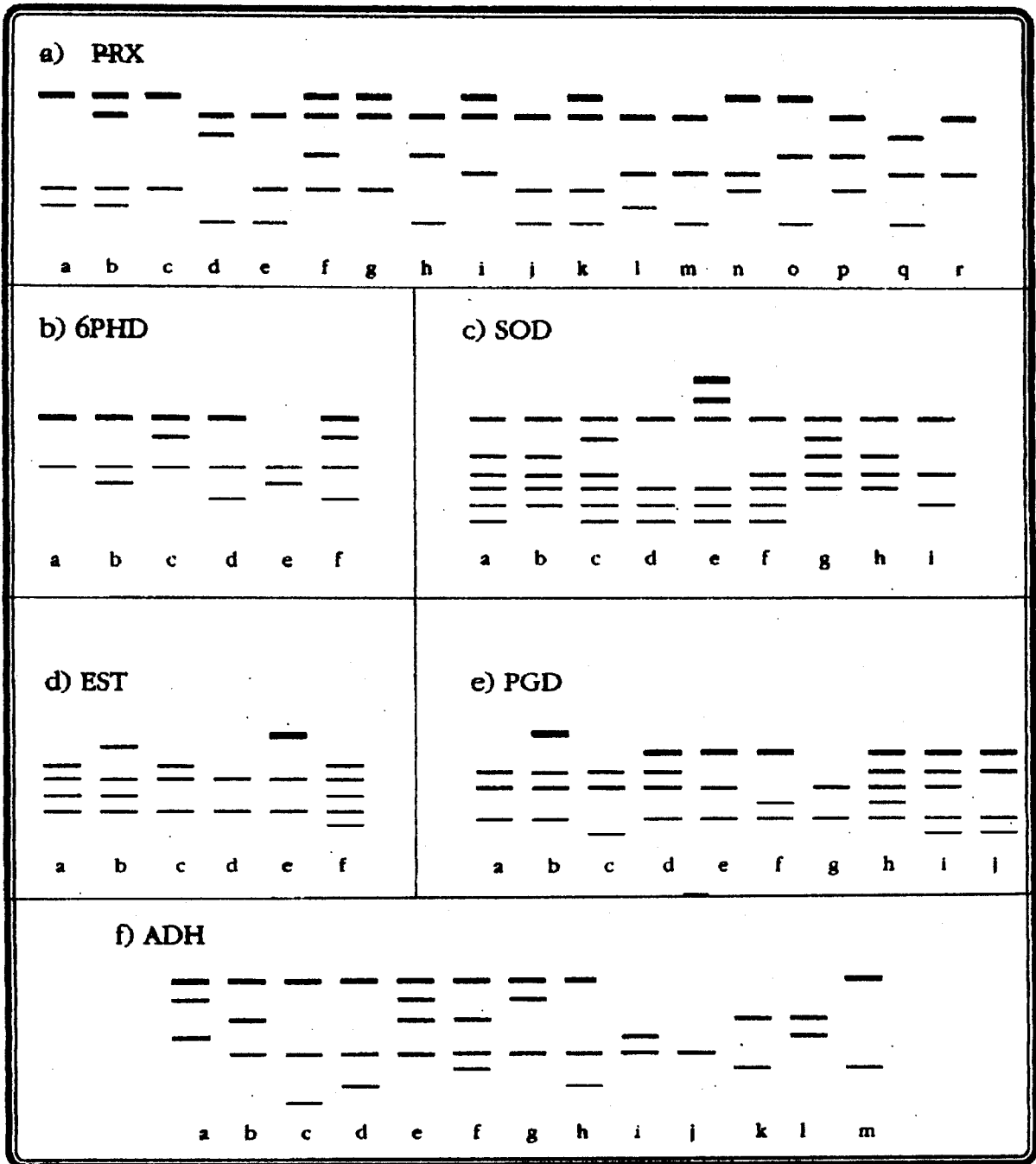


Figura 4. Variación inzoenzimática en injerto, *Pouteria viridis*. a) PRX, b) 6PHD, c) SOD, d) EST, e) PGD, f) ADH en el estudio de variabilidad con marcadores genéticos.

Para el caso de SOD (Figura 4.c) se identificaron 9 zimogramas con un total de nueve bandas siendo el zimograma "d" el más frecuente, presente en el 45% de accesiones, seguido por el zimograma "a" y "b" presente en el 9 % de accesiones. Si se comparan estos zimogramas con los presentes en zapote, se puede observar que los de injerto son más uniformes en el sentido de que se diferencian uno de otro en una o dos bandas, mientras que en zapote, cada zimograma presenta bandas más separadas. Al igual que en zapote, esta enzima no puede considerarse como dímera en base a la información contenida en la Figura 4.c.

Esterasa presentó seis zimogramas con un total de siete bandas (Figura 4.d), siendo el zimograma "a" el más frecuente (67 % de accesiones) seguido del "c" (19% de accesiones). Esta enzima es menos variable en injerto que en zapote, en donde como ya se mencionó, presenta un total de 25 zimogramas. Se observan varias regiones de actividad enzimática, sugiriendo la presencia de una proteína monomérica con dos alelos en la región más catodal.

PGD mostró 10 zimogramas con un total de siete bandas (Figura 4.e). El zimograma "a" es el más frecuente (32 % de las accesiones) seguido del "d" (21 % de las accesiones). No se comprobó la naturaleza dimérica reportada para esta enzima. Los datos mostrados en la Figura 4.e indican la presencia de al menos dos zonas de acción enzimática producto de una enzima monomérica con dos genes y dos alelos cada una de ellas. ADH es una enzima polimórfica con 13 zimogramas y un total de ocho bandas. El zimograma "b" es el más frecuente (24 % de las accesiones) y "k" (14 % de las accesiones). En los zimogramas mostrados en la Figura 4.e no se puede comprobar que esta enzima sea dimérica como se ha reportado.

La serie de zimogramas obtenidos para las seis enzimas polimórficas (Cuadro 5) muestra que ninguna accesión de injerto es similar a otra, es decir, cada una de ellas puede ser identificada plenamente por una combinación particular. Este aspecto es importante, dado que algunos materiales genéticos sobresalientes desde el punto de vista agronómico han sido seleccionados y propagados asexualmente para poder dedicarlos en el futuro inmediato a la producción comercial.

El análisis de grupos resultante de la información generada por las seis isoenzimas polimórficas muestra la variación genética existente entre las diferentes accesiones de injerto procedentes de diferentes regiones de Guatemala (Figura 5). Se puede observar inicialmente que se forman dos núcleos de variación dentro de los cuales se encuentran mezclados materiales genéticos provenientes de diferentes regiones. El primer núcleo tiene accesiones de Guatemala, Sololá, Alta Verapaz y Quiché, mientras que el núcleo dos, contiene accesiones de Guatemala, Chimaltenango, Sololá, Alta Verapaz y Sacatepéquez. Esto indica claramente que la variación genética de injerto en Guatemala no se organiza de acuerdo al origen de las accesiones. Esto es entendible si se anota el hecho que a lo largo del proceso de utilización de esta especie frutal, se ha dado un continuo intercambio de germoplasma entre las diferentes localidades en las cuales en la actualidad se cultiva.

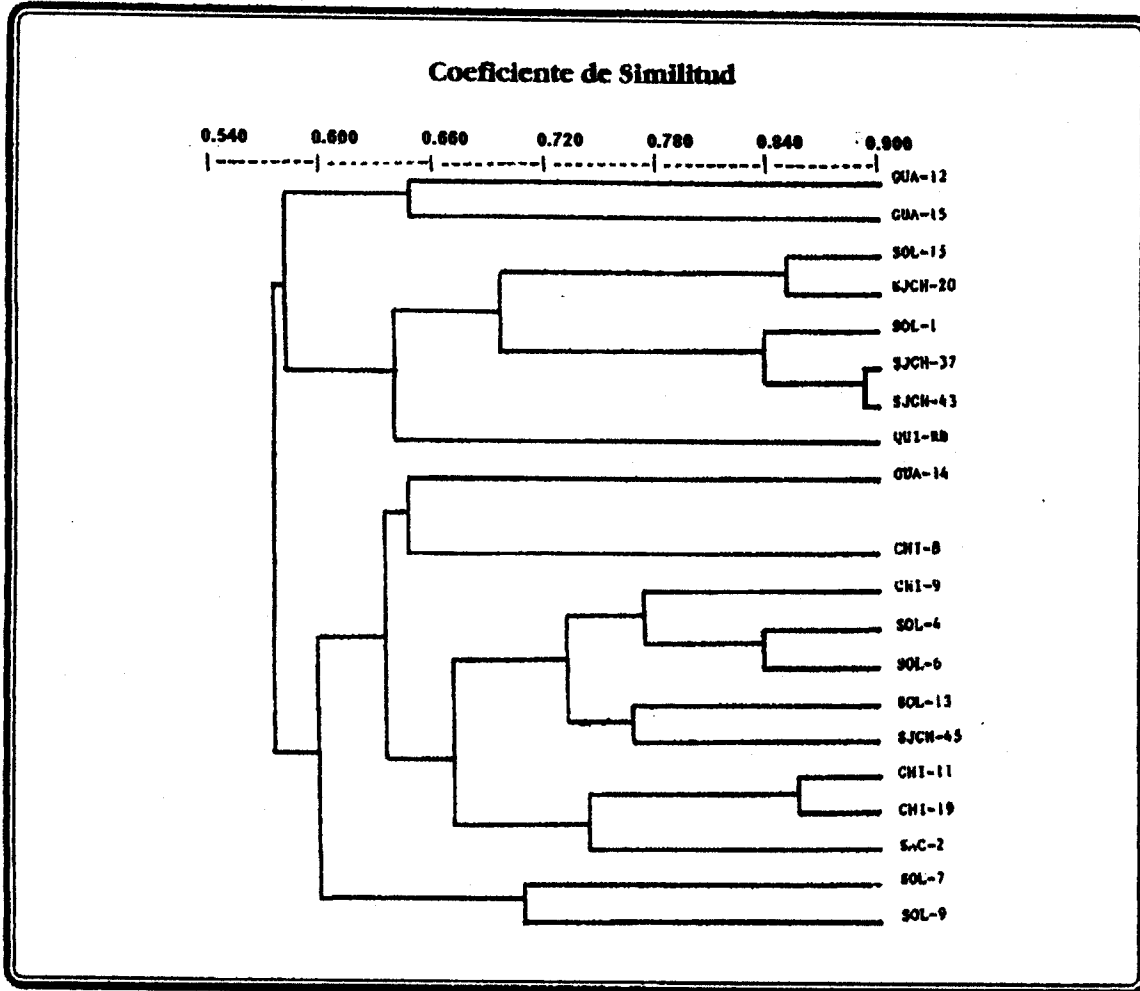


Figura 5. Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes accesiones de injerto, *Pouteria viridis*, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Sin embargo, si se analiza más cuidadosamente el fenograma, es notorio que los materiales genéticos de Alta Verapaz están presentes en ambos núcleos de diversidad genética, esto en parte podría corroborar lo planteado por Azurdia (6) y Azurdia *et al.* (7), quienes indican basados en información de tipo etnobotánico, morfológico y presencia de parientes silvestres, que el injerto podría ser originario del área de Alta Verapaz. Estudios adicionales utilizando marcadores moleculares pueden ayudar a esclarecer este punto.

7.1.2. Resultados para *Pouteria campechiana*

Al igual que en los casos de *P. sapota* y *P. Viridis*, en *P. campechiana* se observó abundante polimorfismo, especialmente en las isoenzimas PRX, EST y ADH, como se muestra en el cuadro 6 y figura 6. De tal manera que en esta especie también es posible identificar cada material genético por los zimogramas específicos que poseen (Cuadro 6). Por ejemplo, PRX presentó nueve zimogramas con un total de siete bandas diferentes, siendo el zimograma "a" y "h" los más frecuentes (23 % de accesiones para cada uno). Esta enzima aparentemente es de tipo monomérico con dos genes con tres alelos cada uno (Figura 6.a).

La enzima 6PHD presenta tres zimogramas (Figura 6.b) con un total de tres bandas, siendo el zimograma "c" el más frecuente (75 % de las accesiones) y el "a" (17 % de accesiones). Esta enzima aparenta ser una de tipo dimérica con al menos tres alelos, aunque en el zimograma "a" no se define exactamente la condición dimérica.

Cuadro 6. Zimogramas presentes en las diferentes accesiones de canistel, *Pouteria campechiana*, en el estudio de variabilidad genética usando Isoenzimas como marcadores genéticos.

Identificación	Isoenzima					
	ADH	PRX	EST	PGD	6PHD	SOD
STR-31	a	a	b	a	a	a
STR-33	b	b	a	a	b	b
STR-34	a	a	c	a	a	a
STR-36	c	a	d	a	c	a
ESC-26	d	c	e	b	c	c
ESC-27	e	d	c	c	c	b
ESC-28	e	e	f	c	c	c
QUI-57	f	f	c	c	c	a
QUI-59	g	g	g	c	c	a
QUI-62	g	h	h	c	c	a
QUI-65	g	h	h	c	c	a
BV-1	h	h	i	c	c	b
QUI-1	-	i	j	c	-	-

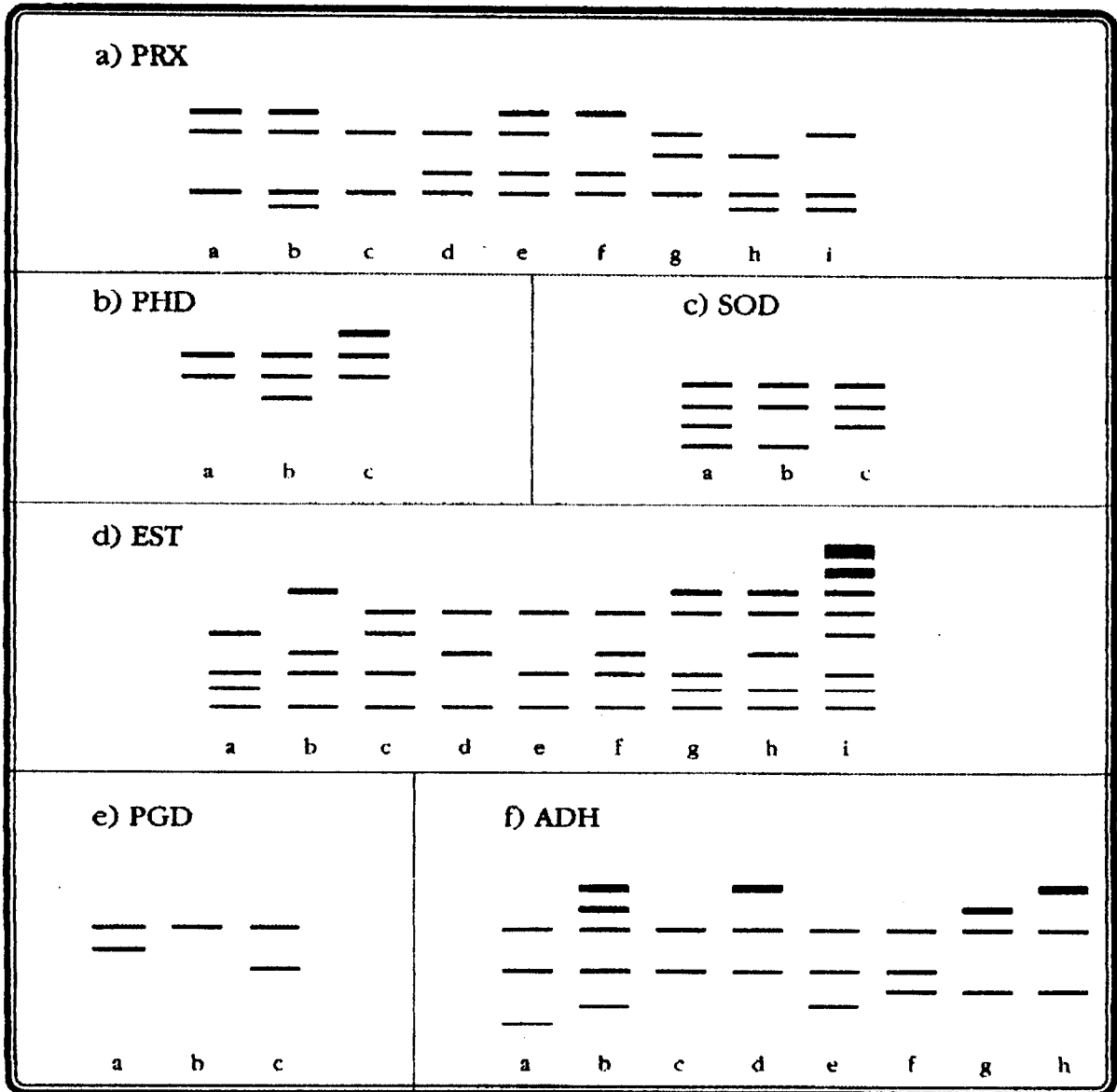


Figura 6. Variación inzoenzimática en canistel, *Pouteria campechiana*. a) PRX, b) PHD, c) SOD, d) EST, e) PGD, f) ADH, observada en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Para el caso de SOD, se observaron tres zimogramas (Figura 6.c), con un total de cuatro bandas, en donde el zimograma "a" es el más frecuente (58 % de las accesiones) y "b" (25 % de las accesiones). El patrón de bandeo observado indica que esta enzima es de estructura cuaternaria dimérica con tres alelos.

La enzima EST presenta un total de nueve zimogramas con un total de nueve bandas diferentes (Figura 6.d), en donde el zimograma "e" es el más frecuente (23 % de las accesiones) y el "h" (15% del asaccesiones).El patrón de bandeo observado es complicado, sin embargo, se puede identificar la presencia de dos genes en la región mas catodal con tres y dos alelos respectivamente.

Peroxidasa dismutasa presenta tres zimogramas con tres bandas (Figura 6.e) El zimograma "c" es el más frecuente (62 % de las accesiones) y el "a" (31 % de las accesiones) Aparentemente esta La enzima ADH muestra ocho zimogramas y siete bandas diferentes, siendo el zimograma más frecuente el "g" (25 % de accesiones) El patrón de bandeo resulta ser complicado por lo que no es posible adelantar la condición cuaternaria de la proteína.

En el análisis de grupos que se muestra en la figura 7, se muestra la clara separación entre los materiales tipo silvestre del departamento de Santa Rosa con respecto a los restantes de tipo silvestre y cultivado de las otras localidades del país.

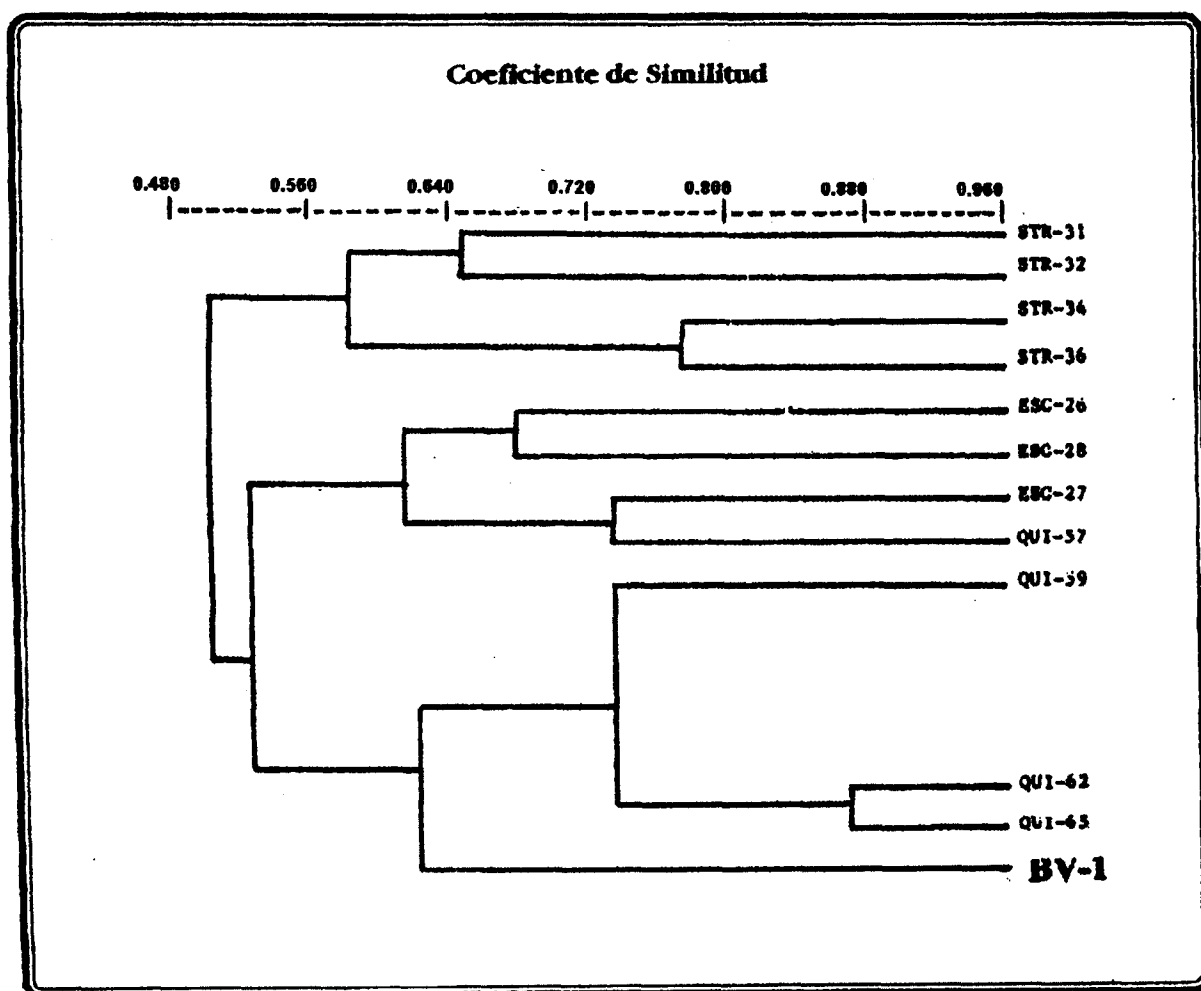


Figura 7 Fenograma mostrando las relaciones entre diferentes accesiones de Canistel, *Pouteria viridis*, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

Otro aspecto importante a considerar es el hecho que los materiales silvestres de Escuintla conforman un solo subnúcleo asociado en cierta medida a los materiales genéticos cultivados en una localidad de Quiché y de Baja Verapaz. Como ha sido discutido por Azurdia et. al (10), el canistel es una especie poco conocida por la población guatemalteca, a tal grado que crece cultivado solamente en pocas localidades del país, existiendo poblaciones considerables a nivel silvestre en el departamento de Petén y en algunas localidades de la costa sur de Guatemala.

Como sucede para zapote, los materiales silvestres no están totalmente diferenciados de los materiales cultivados, ya que estos últimos no son el resultado de un proceso de mejoramiento intensivo. No se puede esperar que exista una clara separación entre materiales cultivados y silvestres, tal como sucede con las variedades mejoradas procedentes de Florida, las cuales presentan frutos más grandes y plantas de porte más pequeño (observación personal del autor principal) Otro aspecto importante es que en Río Blanco, Sacapulas, Quiché; en donde es cultivado ampliamente, los materiales genéticos presentes muestran alta variabilidad como queda reflejado en la Figura 7, lo cual ya había sido adelantado por Azurdia y Ayala (1996) basados en observaciones realizadas sobre caracteres morfológicos (9). La inclusión de materiales genéticos procedentes de Petén es un punto a considerar en trabajos futuros, para el estudio de toda la gama natural de la distribución de esta especie en Guatemala.

7.2. Relaciones filogenéticas entre las especies de *Pouteria*

Utilizando cuatro isoenzimas (est. , PRC, 6PGH y SD) se generó información proveniente de 10 genes y 30 hálelos, en cuatro accesiones de *Pouteria campechiana*, una de *Pouteria fossicola*, cinco de *Pouteria viridis* y cinco de *Pouteria sapota*. El análisis de disimilitud mostrado en la Figura No. 8 indica que *P. viridis* está más cercanamente emparentada a *P. sapota* y que *P. fossicola* y *P. campechiana* comparten más semejanza genética entre sí. Estudios previos habían mencionado que *E. biribís* y *P. sapota* pertenecían al mismo taxón (33), sin embargo, Standley y Styermark (45) ya lo habían reportado como especies distintas; más recientemente, Pennington (43) las define igualmente como pertenecientes a diferente taxa. El informe más detallado que contribuye a establecer las diferencias sistemáticas entre *P. sapota* y *P. viridis* ha sido elaborado por Azurdia *et al* (1997), haciendo una comparación entre ambas especies con base en datos de tipo ecológico, morfoagronómico, etnobotánico, presencia de parientes silvestres y datos iniciales de caracterización bioquímica (10). Con la información contenida en la Figura 8 se refuerza el concepto de que *P. sapota* y *P. viridis* son dos especies distintas, pero con bastante similitud genética. Esta similitud genética existente entre ambas especies puede ser el resultado de que provengan de un antecesor común inmediato, así como por la posible introgresión genética existente en aquellas regiones en las cuales son simpátricas. Ya ha sido anotado por Pennington (1990) que ambas especies morfológicamente son muy similares, diferenciándose principalmente por caracteres de frutos más que por caracteres de tallo, hoja y flor (43).

P. campechiana es distinta a *P. viridis*, y *P. sapota* con base en caracteres morfológicos tanto de hoja, hábito y principalmente de fruto, por lo tanto no ha existido en ningún momento duda en cuando a su estatus taxonómico, por lo que los resultados mostrados en la Figura 8 no son sorprendentes. *P. fossicola* no se encuentra presente en territorio guatemalteco, siendo propia únicamente del sur de Costa Rica y Panamá (45) presentando características morfológicas distintivas al resto de especies de *Pouteria* motivo del presente estudio. Sin embargo, es de aclarar que de alguna manera, *P. fossicola* tiene cierto parecido a *P. zapota*, a tal grado que algunos la confunden con ella. Según Pennington, (1990) la diferencia entre *P. zapota* y *P. fossicola* se establece a nivel de fruto, ya que *P. fossicola* tiene un fruto con epicarpio delgado y liso, comparado con el clásico epicarpio grueso y rugoso de *P. sapota* (45). La similitud entre *P. fossicola* y *P. campechiana* es interesante, no pudiendo con los datos presentes conjeturarse las razones de dicho comportamiento. Vale la pena mencionar que en el área sur de Centro América ambas especies están presentes, pero no en Guatemala. En este sentido es necesario profundizar en estos estudios utilizando marcadores moleculares e incrementando el número de accesiones de *P. fossicola* y de *P. campechiana* tanto de Guatemala como del sur de Centro América.

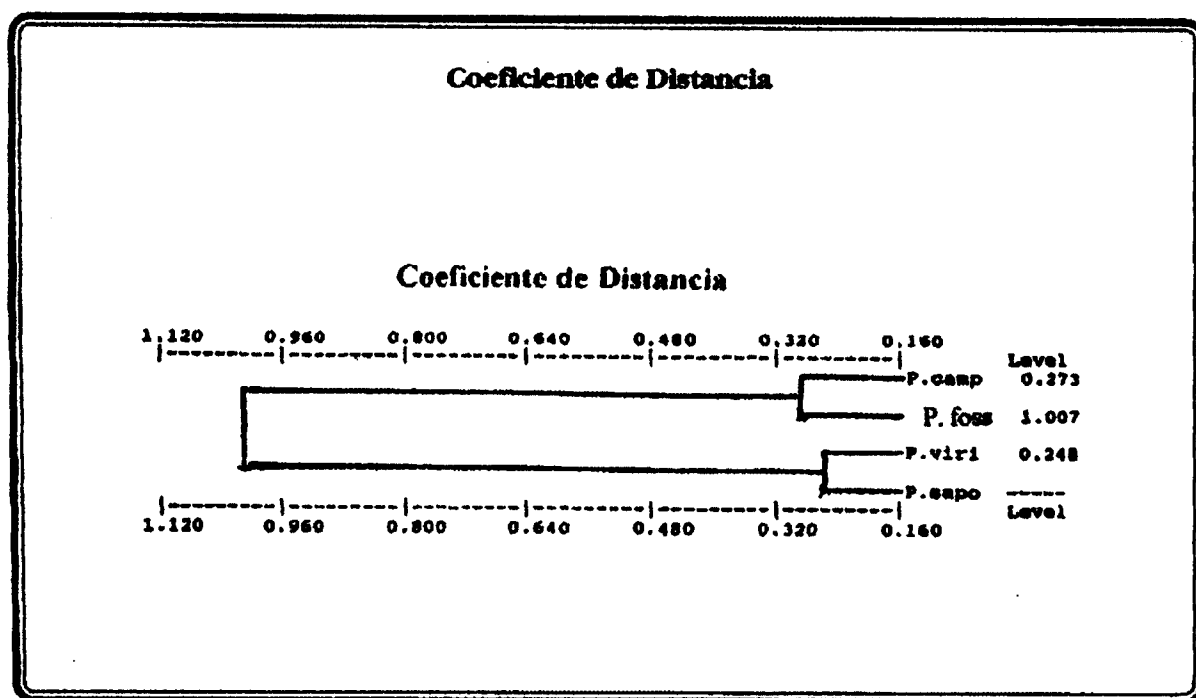


Figura 8 Fenograma mostrando las relaciones entre las cuatro especies de *Pouteria*, *Sapotaceae*, en el estudio de variabilidad genética usando isoenzimas como marcadores genéticos.

8. CONCLUSIONES

8.1. El alto grado de polimorfismos observados en las especies de *Pouteria* muestra la alta diversidad genética presente en su germoplasma. Esta heterogenidad encontrada puede deberse a que las especies estudiadas no han sido sometido a un proceso intenso de domesticación o que posiblemente tengan una tasa de cruzamiento alta.

8.2 El conjunto de zimogramas establecidos para las diferentes isoenzimas polimórficas, representa la identidad genética de cada una de las accesiones o materiales genéticos estudiados.

8.3. Datos de similitud genética indican que *Pouteria campechiana* es una identidad genética distinta a *Pouteria sapota*, mientras que *Pouteria fossicola* esta más emparentada con *Pouteria campechiana*.

8.4. Los materiales genéticos de *P. sapota* provenientes del norte del país (Alta Verapaz y Petén) conforman un grupo homogéneo diferenciado del resto de accesiones provenientes de las otras localidades del país.

8.5. Los materiales genéticos de P. Sapota, en estado silvestre, provenientes del norte del país (Alta Verapaz y Petén), no se agrupan en conglomerados particulares por lo que se puede adelantar que estos materiales no se diferencian de los materiales en estado cultivado.

8.6. En los materiales genéticos de P. viridis, la máxima variación se observó en los provenientes de Alta Verapaz, lo que permite suponer que dicha área es el centro de origen y dispersión de dicha especie.

8.7. Los materiales genéticos en estado silvestre de P. campechiana no se diferencian plenamente de los materiales genéticos cultivados, debido a que no son el resultado de un proceso de mejora genética sino que, en la mayoría de casos, son selecciones iniciales a partir de materiales en estado silvestre.

8.8. La comparación entre las tres especies mencionadas y P. fossicola de origen costarricense indicó que P. viridis y P. sapota están más emparentadas, mientras que P. campechiana lo está con P. fossicola.

9. RECOMENDACIONES

9.1. Con el objeto de incrementar el número de marcadores polimórficos, debe continuarse con este estudio, utilizando mayor número de marcadores bioquímicos; debe confirmarse la naturaleza genética de las isoenzimas determinadas, haciendo análisis en poblaciones segregantes.

9.2. Dado el alto grado de polimorfismo observado en este género, realizar la segunda fase de este estudio, para determinar la tasa de cruzamiento, la estructura genética y los límites entre poblaciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1 AGUILAR, J. M.; AGUILAR, J. A. 1992. Árboles de la biosfera Maya Petén. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología, Centro de Estudio Conservacionistas. p 12-15.
- 2 ALLARD, R. W.; et al. 1972. Evidence for coadaptation in avena barbata. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.E.U.U.) no.69:3043-3048.

Citado por: HANRICK, J. L. 1989. Isoenzymes and análisis of genetic structure in plant Biology populations. En: Isoenzymes in Plant Biology. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canadá, Dioscoride Press. p 87-105 (Advances in Plant Sciencies series. v. 4)
- 3 ANTONIVICS, J. 1971. The effects of a heterogeneun enviroment on the genetics of natural populations. Evolutions. Amer. Sci. (E.E.U.U.) no.59:593-599.

Citado por: HANRICK, J. L. 1989. Isoenzymes and análisis of genetic structure in plant populations. En: Isoenzymes in Plant Biology. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portalnad, Oregon, Cánada, Dioscoride Press. p 87-105. (Advances in Plant Sciencieds series. v. 4)
- 4 ARAGON, U.; AZURDIA, C.; MELGAR, M. 1988. Caracterización preliminar del ramon (*Brosimum alicastrum Swrtz*) en el bosque muy húmedo Subtropical Cálido de Petén. Tikalia (Gua.) 6 (1):45-55.
- 5 ARULSEKAR, S.; PARFIT, D. E. 1986. Isozyme analysis procedures for stone ruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. HortScience (E.E.U.U.). 21(4):34-47.
- 6 AZURDIA, C. 1994. Algunas reflexiones acerca del origen del injerto *Pouteria viridis*. Boletín de Recursos Fitogenéticos (Gua.) no.4:5-6.

- 7 _____; AYALA, H. 1996. Germoplasma de muc o canistel (*Pouteria campechiana*) en la aldea Rio Blanco, Sacapulas, Quiché: rico reservorio de una especie en peligro de extinción. Boletín de Recursos Fitogenéticos (Gua.) no.5:1-3.
- 8 AZURDIA, C.; MARTÍNEZ, AYALA, H. 1995. Algunas Sapotáceas de Petén, Guatemala. TIKALIA (Gua.) 13(1):33-45.
- 9 _____. 1996. Distribución, variabilidad y riesgo de erosión genética de canistel o caca de niño (*Pouteria campechiana*) en Guatemala: Lecturas en recursos fitogenéticos. Azurdia, C. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 121-124.
- 10 _____; MEJIA, L; NUFIO, B. 1996. Zapote, *Pouteria sapota*, e Injerto, *P. Viridis*, dos entidades taxonómicas de Sapotaceae. Boletín de Recursos Fitogenéticos (Gua.) no.7:1-6.
- 11 AZURDIA, C.; et al. 1997. Colección nuclear, una alternativa para el manejo de colecciones de germoplasma: caso del zapote, *Pouteria sapota*, en Guatemala. Boletín de Recursos Fitogenéticos (Gua.) no.1:1-8.
- 12 BASSIRI, A.; ADAMS, M. W. 1977. An electrophoretic survey of seedling isozymes in several *Phaseolus* species. *Euphytica* (E.E.U.U.) no. 27:447-459.
- 13 BLACKSHEAR, P. J. 1984. Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in Enzimol* (E.E.U.U.) no.104:237-255.

Citado por: WENDEL, J. P.; WEEDEN, N. F. 1989. Visualización and interpretation of plant isoenzymes. En: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Orégon, Cánada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v. 4).

- 14 CHRAMBACH, A. 1980. Electrophoresis and electrofocusing on polyacrylamide gels in the study of native macromolecules. *Molecules. Mol. Cell Biochem.* (E.E.U.U.) no.29:23-46.
- Citado por: WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989. isoenzimes. En: Isoenzimes in Plant Biology. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis Pórtland, Oregón, Cánada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 15 CHRAMBACK, A.; RODBAR, D. 1971. Polycrymide gel electrophoresis. *Sciencie* (E.E.U.U.) no.172:440-451.
- Citado Visualization and interpretation of plant isoenzimes, En: soenzimes in plant Biology. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis Pórtland, Orégon, Cánada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v. 4).
- 16 DEGANI, C.; EL-BATSRI, R.; GAZIT; S. 1990. Enzyme polymorphism in mangoe. *J. Amer Soc. Hort. Sci.* (E.E.U.U.) no.115:884-847.
- 17 DOEBLEY, J. 1989. Isozymic evidence and the evolution of crop plants. En: E. Soltis and P. Soltis (eds). *Isozymes in plant biology.* E.E.U.U. Dioscorides Press. 72 p.
- 18 ELLSTRAND, N.C.; LEE, J.M. 1987. Cultivar identification of cherimoya, *Annona cherimola* Mill, using isozymes markers. *Scientia Horticulturae* (E.E.U.U.) no.32:2531.
- 19 FREELING, M.; SCHWARTZ, D. 1973. Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenases of maize. *Biochem. Genet.* (E.E.U.U.) no. 8:27-36.
- 20 GARCÍA, P.; VEGA, P. DE LA; BENITO, C. 1982. The inheritance of rye peroxidases. *Theor. Appl. Genet.* (E.E.U.U.) no. 61:341-351.
- 21 GOLDRING, A.; ZAMIR, D.; DEGANI, C. 1985. Duplicated phospholuco- seisomerase genes in avocado. *Theor. Appl. Genet.* (E.E.U.U.) no.71:491-494.

- 22 HAMES, B. D.; RICWOOD, D. 1981. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press, Washington, D.C.
- Citado por: Wendel, J.F.; Weeden, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isoenzymes. En: Isozymes in Plant Biology. Ed. Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 23 HANRICK, J. L. 1989. Isoenzymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: Isoenzymes in plant Biology. Ed. Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 24 HAMRICK, J. L., et. al. 1972. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U. no.69: 2100-2104.
- Citado por: HANRICK, J. L. 1989. Isoenzymes and análisis of genetic structure in plant populations. In : Isoenzymes in Plant Biology. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 25 HUNTER, R. L.; MARKERT, C. L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125: 1294-1295.
- Citado por WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989. Visualization And interpretation of plant isoenzymes. In: Isozymes in Plant Biology. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Science series v.4).
- 26 HUSSAIN et al. 1987. Identification of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. Seed Sci. & Technol. (E.E.U.U.) no.15:19-22.
- 27 ISOLA, M.C.; FRANZONI, L. 1981. Changes in electrophoretic pattern of ribonucleases during aging of potato tuber slices. Z. Pflanzenphysiol. (E.E.U.U.) no. 103: 277-283.
- Citado por WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1987. Visualization and interpretation of isoenzyme. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).

- 28 JAASKA, V.; JAASKA, V. 1988. Isoenzyme variation in the genera *Phaseolus* and *Vigna* (Fabaceae) in relation to their systematics: aspartate aminotransferase and superoxide dismutase. *Pl. Syst. Evol.* (E.E.U.U.) no. 159:145-159.
- 29 KIANG, Y.T. 1981. Inheritance and variation of amylase in cultivated and wild soybeans and their formylde. (E.E.U.U.) no. 101:279-295.

Citado: por WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isoenzymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 30 KIMURA, M., 1983. The neutral theory of molecular evolution. In M. Nei and R. K. Koehn. *Evolution of genes and proteins*, 208-233. Sinuer, Sunderland, M.A.

Citado por WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989 Visualization and interpretation of plant isoenzymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 31 _____; CROW, F.T. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. (E.E.U.U.) no.49:725-738.

Citado por: WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989. Visualization And interpretation of plant isoenzymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 32 LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the of bacteriophage t4. *Nature*. (Inglaterra) no.227:680-685.
- 33 LEABACK, D. H. 1976. Concentration gradient polyacrymide gel electrophoresis. II. Smith (ed.), *Chromatographic and electrophoretic techniques*. (E.E.U.U.) Vol. II: 250-271, Heminemann Medical Books.

Citado por: WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isoenzymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).

- 34 LEON, J. 1968. Botánica de los Cultivos Tropicales. San José, Costa Rica, IICA. p 212.
- 35 _____ . 1987 Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Turrialba, Costa Rica, IICA. p. 215.
- 36 LOVELES, M. D.; HAMRICK, J. L. 1984. Ecological determinantes of genetic structure in plant populations. Ann. Rec. Ecol. Syst. (E.E.U.U.) no.15:65-95.
- Citado por: HANRICK, J. L. 1989. Isoenzymes and análisis of genetic structure in plant populations. In: Isoenzymes in Plant Biology. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Pórtland, Oregón, Cánada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 37 LUNDELL, C. L. 1937. The vegetation of Péten. Carnegie Institution of Washington. 221 p.
- 38 MARKET, C. L.; MOLLER, F. 1959. multiple forms of enzymes: tissue, ortogenetic, and species speciefec patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.E.U.U) no.45:753-763.
- Citado por: WENDEL, J. F.; WEEDEN, N .F. 1989. Visualization and interpretation of plant isoenzimes. In: Isozimes in Plant Biology. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Pórtland, Oregón, Cánada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 39 MEJIA, L.; ENRIQUEZ, E. 1996. Identificación de 25 clones de cacao *Theobroma cacao* L. por electroforesis de isoenzimas. Tikalia (Gua.) 14(2):11-26.
- 40 MORERA, J. A. 1992. El zapote. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) serie técnica no. 193.
- 41 MORERA, J.; et al. 1990. Manual de recomendaciones sobre cultivos promisorios: Zapote, pimienta macadamia y vainilla. Turrialba C. R. Centro agonómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Serie Técnica no. 53:20 p.

- 42 MORERA, J. 1993. Zapote (*Pouteria sapota*) In Cultivos marginados: Otra perspectiva de 1942; Hernández Bermejo, E. And Leon, J. (eds.), Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome Italy, pp. 101-107
- 43 MURPHY, R.W.; SITE, J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, CH.H. 1992. Protein I: isozyme electrophoresis. En: D.M. Hillis and C. Mortiz (eds.). 1992. Molecular systematics. E.E.U.U., Sinauer Associate Inc. 86 p.
- 44 OCHSE, J.J. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Ed. Limusa Wiley, S.A. México. Vol 1. p. 827.
- 45 PENNINGTON, T. D. 1990. Sapotaceae. En: Flora Neotrópica. 1990. N.Y; E.E.U.U., The New York Botanical Garden. Monograph 52. p. 500.
- 46 SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. (E.E.U.U.) no.61:629-641.
- Citado por WENDEL, J. F.; WEEDEN, N. F. 1989. Visualization and tinterpretarion of plant Isoenzimes. In: Izozymes in Plant Biology. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. Pórtland, Oregón, Cánada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 47 STANDLEY, P.; STYERMARK, J. 1976. Flora of Guatemala. Chicago, E.E.U.U. Field Museum of Natural History. v.23, Pte. 8, p 261.
- 48 STUBERT, C. W.; WENDEL, J. F.; GOODMAN, M. M.; SMITH, J.S.C. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). North Carolina, E.E.U.U., State University, Agricultural Research Service. Technical Bulletin 286. 35 p.
- 49 TANKSLEY, S. D.; RICK, C. M. 1980. Genetics of esterase in species of *Lycopersicon*. Teo. Appl. Genet. (E.E.U.U.) no. 56:209-219.
- 50 VALLEJOS, E. 1983. Enzyme activity staining. En: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). 1983. Isozymes en plant genetic and breeding, Pte. A. Amsterdam. The Nederlanden. Elsevier. p. 469-516.

- 51 VITHANGE, V.; WINKS, X. W. 1992. Isozymes as genetic markers for *Macadamia*. *Scientia Hort.* (E.E.U.U.) no. 49:103-115.
- 52 WENDEL, J. F.; WEEDEN, N. F. 1999. Visualization and interpretation of plant isoenzymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. Por Douglas E. Soltis y Pamela Soltis. Portland, Oregon, Canada, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).
- 53 WEEDEN, N. F. 1986. Genetic confirmation that the variation in the zimograms of 3 enzyme systems is produced by allelic polymorphisms. *Characterization Informativa Boletyn.* (E.E.U.U.) no. 29:117-118.
- 54 _____ 1989. Genetic of plant isozymes. En: D. Soltis and P. Soltis (eds). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press.
- 55 _____, LAMB, R.C. 1985. Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* (E.E.U.U.) no.110:508-515.
- 56 WEST, N. B.; GARBER, E. D. 1967. Genetic studies of variant enzymes II. The inheritance of esterase and leucine aminopeptidases in *Phaseolus vulgaris* x *P. coccineus*. *Can. J. Genet. Cytol.* (Canada) no.9:646-655.
- 57 ZEHENDER, H. D.; TREACHER; ULLRICH, J. 1993. Activity stain for pyruvate decarboxylase in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* (E.E.U.U.) no.135:16-21.
- Citado por: WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1999. Visualization and interpretation of plant Isoenzymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela, Soltis. Portland, Oregon, Canadá, Dioscoride Press. p 5-45 (Advances in Plant sciences series. v. 4).
- 58 ZIMNIAK—PRZYBYLSKA, Z.; BLIXT, S.; PRZYBYLSKA, J. 1995. Isoenzyme variation. In: the genus *Pisum*. IV. Further electrophoretic analysis of amylases from cotyledons of germinated seeds. *Genetica Polonica.* (E.E.U.U.) no. 26:303-306.
- Citado por: WENDEL, J. F.; WEEDEN, N. F. 1999. Visualización and interpretation of plant Isoenzymes. En: *Isozymes in Plant Biology*. Ed. por Douglas E. Soltis y Pamela, Soltis. Portland, Oregon, Canadá, Dioscoride Press. p 4-45 (Advances in Plant Sciences series. v.4).

v. B.
Miriam De La Roca

11 APÉNDICES

Apéndice 1

Soluciones madre para preparar geles de poliacrilamida (Laesli 1970)

- A** Acrilamida / bis (30 %T, 2.6% C)
87.6 g acrilamida (29.2 g/100 mL)
2.4 g NN bismethylene - acrilamida (0.9 g/100mL)
- Hacerlo en 300 ml con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4 °C en oscuridad (máximo 30 días)
- B.** 1.5 M Tris—HCl, pH 8.8
27.23 g Tris base (12.15 g/100 ml)
90 mL de agua destilada
- Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N
Hacer 150 mL con .agua destilada y almacenar a 4 °C.
- C** 0.5 M Tris—HCl, pH 6.8
6 g tris base
60 ml de agua destilada
- Ajustar a pH 6.8 con HCl 1N.
Hacer 100 ml con agua destilada y almacenar a 4° C
- D** Amortiguador de electrodo de 5X, pH 8.3
Trisbase..... 9.0 g
Glicina..... 43.2 g
En 400 mL de agua destilada.
Almacenar a 4° C Temperatura. En temperatura ambiente, antes de su uso puede ocasionar precipitación.
Diluir 60 mL de solución stock 5X en 240 ml de agua destilada para una corrida electroferética.

Las cantidades que anteriormente se describieron se refieren a geles pequeñas (11.2 x 3); si en un momento dado se requiere de geles grandes (se utilizarán 10 veces la cantidad indicada para las geles pequeñas)

**GEL DE RESOLUCIÓN [12 %]
0.375 M Tris, pH 8.8**

H ₂ O	3.35 mL
Solución B	2.5 mL
Solución A	4.0 mL
Persulfato Amonio	50.0 uL
10% preparado el mismo dia	
TEMED	50.0 uL

**GEL DE CONCENTRACIÓN [4%]
0.125 M Tris, pH 6.8**

H ₂ O	6.1 mL
Solución C	2.5 mL
Solución A	1.3 mL
Persulfato Amonio	50.0 uL
10% preparado el mismo dia	
TEMED	50.0 uL

**GEL DE CONCENTRACIÓN [<4 %]
0.125 M Tris, pH 8.3**

H ₂ O	6.1 mL
Solución D	2.5 mL
Solución A	1.3 mL
Persulfato Amonio	50.0 uL
10% preparado el mismo dia	
TEMED	50.0 uL

Apéndice 2

Fórmulas para la tinción de enzimas

1. ALCOHOL DEHIDROGENASA (ADH)
(Vallejos, 1983)

0.1M Tris—HCl, pH 8.0	100 mL
0.03 % NAD	30 mL
0.02 % MTT	20 mL
0.004 % PMS	4 mL

2. ISOCITRATO DEHIDROGENASA (IDH)
(Weeden, 1986)

0.1M Tris— HCl, pH 7.2	100 mL
0.1% Ácido Isocítrico trisodium SALT	100 mg
1.0 % Cloruro de magnesio 6H ₂ O	1 g
0.01 % MADP	10 mg
0.015 % MTT	15 mg
0.002 % PMS	2 mg

3. MALATO DEHIDROGENASA (MDH)
(Vallejos, 1983 modificación de Soltis, 1993)

0.1 M Tris—HCl, pH 8.3	50 mL
0.4 % DI—ácido etílico	200 mg
0.03 % MAD	3 mg
0.02 % MTT	10 mg
0.004 % PMS	2 mg

4. GLUTANATO OXALACELATO TRANSAMINASA (GOT)
(Weeden, 1989)

0.1 M Tris- HCl, pH 8.0	25 mL
Ácido L-aspártico	50 mL
Ácido alfa-keloglutámico	5 mL
Piridoxal -5- fosfato	2 mL
Fast Blue "BB" SALT*	trace

*Debe agregarse justamente después de prepararse la mezcla de los reactivos de tinción.

5.	FOSFOGLUCOSÁISOMERASA (PGI) (Weeden, 1989)	
	1M Tris—HCl, pH 8	2.5 mL
	Agua destilada	20.0 mL
	0.1 M Cloruro de Magnesio	0.5 mL
	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	54.0 uL
	D- fructosa-6-fosfato	5.0 mL
	NADP	3.0 mL
	MTT	3.0 mL
	Meldola Blue	trace
6.	GLUCOSA -6-FOSFATO ISOMERASA (GPI) (Weeden, 1989)	
	50 mM Tris-HCl, pH 8.0	50 mL
	NAD	10 mg
	Fructuosa -6-fosfato Na salt	20 mg
	Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa (NAD)	20 units
	MTT	10 mg
	PMS	2 mg
7.	ENZIMA MÁLICA (ME) (Weeden, 1989)	
	Agua destilada	22.5 mL
	1 M Tris malate, pH 7.2	2.5 mL
	0.1 M Mg Cl	2.5 mL
	L- malate (acido málico)	10.0 mL
	NADP	3.0 mL
	MTT	3.0 mL
8.	ACIDO SHIKÍMICO DEHIDROGENASA (SKDH) (Weeden, 1989)	
	0.1 M TRIS HCl pH 8.0	5.0 mL
	Agua destilada	45.0 mL
	Acido Shikimico	25.0 mL
	MTT	7.5 mL
	NADP	5.0 mL
	PMS	1.0 mL
9.	6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA (6 PHD) (Weeden, 1989)	
	0.1 M Tris- HCl, pH 7.2	25.0 mL
	6-Fosfogluconato	6.0 mg
	NADP	4.0 mg
	MTT	4.0 mg
	MENDOLA BLUE	trace

10. GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH)
(Stubert et al, 1988)

0.1 M Tris-HCl, pH 8.5	50.0 mL
Acido Glutámico	150.0 mg
CaO	50.0 mg
NAD	20.0 mg
NBT	15.0 mg
PMS	5.0 mg

11. FOSFOHEXOSA ISOMERASA (PHI)
(Weeden, 1985)

0.05 M Tris-CH1, pH 8.0	50.0 mL
D- Fructosa -6-fosfato	50.0 mg
MfC1	50.0 mg
NADP	5.0 mg
MTT	5.0 mg
PMS	1.5 mg
NADP Dependt Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	10.0 units

12. 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA (6 PGD)
(Weeden, 1989)

0.05 M Tris-Cl, pH 8.0	50.0 mL
Acido-6-fosfogluónico	20.0 mg
MgCl	50.0 mg
NADP	5.0 mg
MTT	5.0 mg
PMS	1.5 mg
NADP dependt glucose-6-fosfato deshidrogenasa	10.0 units

13. DIAFORASA (DIA)
(Stubert et al, 1988)

1 M Tris-HCl, pH 8.0	5.0 mL
Agua destilada	45.0 mL
NAPD	14.0 mg
MTT	20.0 mg
2,6 DICOROFENOL	trace

Apéndice 3

PROCEDENCIA DE LOS MATERIALES GENÉTICOS

1. ZAPOTE (*Pouteria sapota*)

Ident.	Municipio	Depto.	Altitud (msnm)	Long.	Lat.
PET-4	Sn. Andrés	Petén	150	89° 54'	16° 58'
PET-5	Sn. Andrés	Petén	100	89° 55'	16° 58'
PET-6	Flores	Petén	127	89° 53'	16° 55'
PET-12	Flores	Petén	127	89° 53'	16° 55'
PET-16	Melchor de Mencos	Petén	75	89° 09'	17° 03'
PET-24	Flores	Petén	150	90° 03'	16° 59'
PET-27	Flores	Petén	200	90° 03'	16° 57'
PET-29	La Libertad	Petén	190	90° 07'	16° 47'
PET-34	Sayaxché	Petén	145	90° 10'	16° 32'
PET-37	Sayaxché	Petén	212	90° 05'	16° 31'
PET-46	La Ceibita, Sn. Luis	Petén	120	90° 27'	16° 11'
PET-53	Chinchila, Sn. Luis	Petén	110	90° 25'	16° 12'
IZA-3	Fca. Villa Phoenix	Izabal	500	90° 11'	15° 32'
IZA-3	Campo 3, Amates	Izabal	400	90° 10'	15° 32'
IZA-40	Ruinas, Quiriguá	Izabal	500	90° 05'	15° 19'
IZA-41	Ruinas, Quiriguá	Izabal	500	90° 03'	15° 19'
IZA-45	Rio Zarco, Estor	Izabal	05	90° 20'	15° 39'
AV-11	Tamahú	A. Verapaz	960	90° 10'	15° 17'
AV-16	Pancaxté, Tukurú	A. Verapaz	500	90° 02'	15° 17'
AV-1	La Tinta, Panzos	A. Verapaz	900	90° 50'	15° 20'
AV-26	Rubel, Quiché	A. Verapaz	1000	90° 01'	15° 56'
AV-34	La Tubería Cobán	A. Verapaz	1200	90° 43'	15° 55'
AV-46	Secocpur, Cobán	A. Verapaz	600	90° 30'	15° 35'
ES-23	Siquinalá	Escuintla	305	90° 39'	14° 22'
REU-20	Sn. Sebastián	Retalhuleu	315	91° 40'	14° 39'
REU-32	Sn. Martín Zap.	Retalhuleu	455	91° 39'	14° 39'
REU-33	Sn. Martín Zap.	Retalhuleu	455	91° 39'	14° 39'
REU-35	Sn. Martín Zap.	Retalhuleu	455	91° 39'	14° 39'
REU-46	Sn. Martín Zap.	Retalhuleu	455	91° 39'	14° 39'
REU-77	Sn. Martín Zap.	Retalhuleu	455	91° 39'	14° 39'
SUC-57	Sn. Bernardino	Suchitepeq.	400	91° 27'	14° 31'
QUE-21 A	Coatepeque	Quetzalten.	290	91° 57'	14° 22'
SMA-72	Nica, Malacatan	Sn. Marcos	250	92° 09'	14° 49'
JUT-51	La perla, Jup.	Jutiapa	550	94° 04'	14° 20'
JUT-55 Fc.	Mongoy, A. Mita	Jutiapa	50	94° 50'	14° 07'
CHQ-5	Quetzaltepeque	Chiquimula	90	92° 00'	14° 39'
QUI-1	Rio Blanco, Sacapulas	Quiché	1240	91° 01'	15° 17'
QUI-2	Tziltzil, Joyabaj	Quiché	1176	90° 46'	15° 59'
HUE-12	Cuilco	Huehueten.	1200	90° 51'	15° 29'

14. FOSFATASA ÁCIDA (ACP)
(Stubert et all, 1988)
- | | |
|---|---------|
| 0.1 M Acetato de Sodio (buffer), pH 5.0 | 50.0 mL |
| Fast Garnet GBC SALT | 50.0 mg |
| MgCl | 50.0 mg |
| Acido alfa-naftil fosfato (NAP) | 50.0 mg |
15. PEROXIDASA (PRX)
(Vallejos, 1983)
- | | |
|---------------------------------|---------|
| 0.1 M Acetato de Sodio, pH 5.0 | 50.0 mL |
| 0.25 % 3- amino-9-etilcarbazol* | 25.0 mg |
| 0.015% Cloruro de Calcio (CaCl) | 15.0 mg |
| Agua Oxigenada al [30%] | 30.0 mu |

* se disuelve en 2 ml de N,N-Dimetilformamide

16. ESTERASA (EST)**
(Stubert et all, 1988)
- | | |
|------------------------------|----------|
| 0.1 M Buffer Fosfato, pH 7.1 | 97.0 mL |
| Fast buffer RR salt | 100.0 mg |
| Alfa - Naftil acetato [2%]* | 30.0 mg |
| Beta - Naftil acetato [2%]* | 30.0 mg |
17. ESTERASA (EST)
(Stubert et all, 1988)
- | | |
|------------------------------|----------|
| 0.1 M Buffer Fosfato, pH 7.0 | 97.0 mL |
| Fast Blue RR salt | 100.0 mg |
| Alfa -Baftil acetato [2%]* | 30.0 mg |
| Beta- naftil acetato [2%]* | 30.0 mg |

* se disuelven en 3 mL de Acetona para ambas Esterasas

** Esterasa que fué identificada como isoenzima polimórfica y con una alta resolución.

2. INJERTO (*Pouteria viridis*)

Ident.	Municipio	Depto.	Altitud (msnm)	Long.	Lat.
CHI-6	Parramos	Chimalt	1800	90° 50'	14° 40'
CHI-9	Sn. Andres Itzapa	Chimalt.	1850	90° 51'	14° 37'
CHI-11	Sn. Andres itzapa	Chimalt.	1859	90° 52'	14° 39'
CHI-19	Parramos	Chimalt.	1800	90° 51'	14° 41'
SAC-2	Antigua	Sacatepeq.	1380	90° 44'	14° 34'
GUA-12	Magdalena, Amati.	Guate	1800	90° 24'	14° 34'
GUA-15	Zona 14, Ciudad	Guate	1500	90° 28'	14° 37'
AV-26	Sn. Juan Chamelco	Alta V.	1240	90° 29'	14° 50'
AV-37	Sn. Juan Chamelco	Alta V.	1240	90° 29'	14° 50'
AV-43	Sn. Juan Chamelco	Alta V.	1240	90° 29'	14° 50'
AV-45	Sn. Juan Chamelco	Alta V.	1240	90° 29'	14° 50'
SCV-55	Sn. Cristóbal V.	Alta V.	1393	90° 39'	15° 21'
SPC-2	Sn. Pedro Carchá	Alta V.	1300	90° 15'	15° 29'
SOL-1	Sta. Catarina P.	Sololá	1580	91° 05'	14° 06'
SOL-4	Panajachel	Sololá	1550	91° 08'	14° 15'
SOL-6	San Lucas Toliman	Sololá	1500	91° 14'	14° 52'
SOL-7	Santiago Atitlán	Sololá	1592	91° 05'	14° 06'
SOL-9	Sn. Pedro Atitlán	Sololá	1570	91° 12'	14° 04'
SOL-7	Sn. Juan la Laguna	Sololá	1580	91° 18'	14° 07'
SOL-7	Sn. Pablo la laguna	Sololá	1600	91° 15'	14° 13'
HUE-7	Aguacatan	Huehue	1660	91° 19'	15° 20'

3. CANISTEL (*Pouteria Campechiana*)

Ident.	Municipio	Depto.	Altitud (msnm)	Long.	Lat.
ESC-26	Guanagazapa	Escuintla	400	90° 38'	14° 10'
ESC-27	Guanagazapa	Escuintla	405	90° 40'	14° 06'
ESC-28	Guanagazapa	Escuintla	410	90° 41'	14° 05'
BV-1	Salamá	B. Verapaz	910	90° 21'	15° 07'
STR-31	Taxisco	Sta. Rosa	800	90° 28'	14° 05'
STR-32	Taxisco	Sta. Rosa	810	90° 23'	14° 10'
STR-33	Taxisco	Sta. Rosa	810	90° 24'	14° 11'
STR-34	Taxisco	Sta. Rosa	800	90° 23'	14° 10'
QUI-57	Sacapulas	Quiché	1110	91° 01'	15° 97'
QUI-59	Sacapulas	Quiché	1110	91° 01'	15° 97'
QUI-62	Sacapulas	Quiché	1110	91° 01'	15° 97'
QUI-65	Sacapulas	Quiché	1110	91° 01'	15° 97'



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

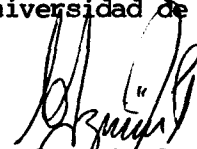
LA TESIS TITULADA: "DETERMINACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA EN ESPECIES DE
Pouteria (Sapotaceas) USANDO ISOENZIMAS COMO MARCADORES
GENETICOS".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: BALTAZAR DE JESUS NUFIO REYES


CARNET No: 8910091

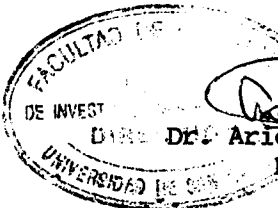
HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Marco Tulio Aceituno Juárez
Ing. Agr. Francisco Javier Vásquez Vásquez

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha
cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía
de la Universidad de San Carlos de Guatemala.


Dr. César Augusto Azurdia Pérez
A S E S O R


Dr. Luis Mejía de León
A S E S O R


Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
DIRECTOR DEL IIA.



I M P R I M A S E


Ing. Agr. M.Sc. Edger Osvaldo Franco Rivera
D E C A N O



cc:Control Académico
IIA.
Archivo
AO/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TEL/FAX (502) 476-9794
e-mail: llusac.edu.gt § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>