

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO MEDIANTE MARCADORES SSR Y SRAP.****Genetic diversity of soursop populations (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico using SSR and SRAP markers**Rosalba LIRA-ORTIZ<sup>1</sup>, Moisés Alberto CORTÉS-CRUZ<sup>2</sup>, Graciela Guadalupe LÓPEZ-GUZMÁN<sup>4</sup>, Yolotzin Apatzingan PALOMINO-HERMOSILLO<sup>3</sup>, Isaac SANDOVAL-PADILLA<sup>5</sup>, Verónica Alhelí OCHOA-JIMÉNEZ<sup>3</sup>, Leticia Mónica SÁNCHEZ-HERRERA<sup>3</sup>, Rosendo BALOIS-MORALES<sup>1,3</sup>, Guillermo BERUMEN-VARELA<sup>1,3</sup>\*<sup>1</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela km. 9. C.P. 63780. Xalisco, Nayarit.<sup>2</sup> Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Boulevard de la Biodiversidad 400, Tepatlán de Morelos, México.<sup>3</sup> Unidad de Tecnología de Alimentos-Secretaría de Investigación y Posgrado. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura S/N. C.P. 63000. Tepic, Nayarit.<sup>4</sup> Unidad Académica de Agricultura. Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela km. 9. C.P. 63780. Xalisco, Nayarit.<sup>5</sup> Doctorado en Biosistemática, ecología y manejo de Recursos naturales y agrícolas. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, Zapopan, México. Camino Ramón Padilla Sánchez Núm. 2100. Nextipac, Zapopan, Jalisco. C.P.45200.\* **For correspondence** guillermo.berumen@uan.edu.mx**Received:** 18<sup>th</sup> June 2020. **Returned for revision:** 22<sup>nd</sup> January 2021. **Accepted:** 29<sup>th</sup> April 2021.**Associate Editor:** Leonardo Galindo**Citation/ citar este artículo como:** Lira-Ortiz, R., Cortés-Cruz, M. A., López-Guzmán, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Sandoval-Padilla, I., Ochoa-Jiménez, V. A., Sánchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., y Berumen-Varela, G. (2022). Diversidad Genética de poblaciones de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México mediante marcadores SSR y SRAP. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 104-112. <https://doi.org/10.15446/abc.v27n1.88241>**RESUMEN**

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un cultivo de importancia económica para Nayarit, México. Los frutos han tenido una excelente aceptación en el mercado regional, dificultando su comercialización a lugares lejanos porque la producción es altamente perecedera, aunado a que los árboles de los huertos de guanábana son en su mayoría ecotipos o fenotipos sin ningún plan de mejoramiento genético. Debido a la falta de variedades comerciales y de un banco de germoplasma, es importante conocer la diversidad genética para identificar y seleccionar genotipos; una de las herramientas para este propósito es el uso de marcadores moleculares. El objetivo de esta investigación fue analizar la diversidad genética de guanábana de las principales zonas productoras de Nayarit. Se extrajo ADN genómico de hojas de guanábana, las cuales fueron recolectadas de 11 huertos (poblaciones) de las siguientes zonas: Compostela (cinco poblaciones), Tepic (tres poblaciones) y San Blas (tres poblaciones). Posteriormente, se realizó un análisis mediante marcadores moleculares SSR y SRAP. Los resultados indicaron que los SSR no mostraron polimorfismo entre las poblaciones. Por otro lado, en los marcadores SRAP se obtuvieron 116 loci polimórficos con un promedio de porcentaje de loci polimórfico (*P*) entre las zonas productoras de 29,55 %. Asimismo, se realizó un AMOVA, el cual mostró que el mayor porcentaje de varianza se encuentra dentro de las poblaciones. Además, los análisis de agrupamiento demostraron la formación de tres grupos independientes. Por tanto, se obtuvo una alta homocigocidad y baja diversidad genética de guanábana entre las zonas y poblaciones estudiadas.

**Palabras Clave:** distancia genética, microsatélites, poblaciones, polimorfismo.**ABSTRACT**

Soursop (*Annona muricata* L.) is a crop of economic importance for Nayarit, Mexico. Soursop fruits have had an excellent acceptance in the regional market, making it difficult its commercialization to distant places because the production is highly perishable, in

addition to the fact that the trees in the soursop orchards are mostly ecotypes or phenotypes without any genetic improvement plan. Due to the lack of commercial varieties and a germplasm bank, it is important to know the genetic diversity to identify and select genotypes; one of the tools for this purpose is the use of molecular markers. The objective of this research was to analyze the genetic diversity of soursop in the main producing areas of Nayarit. Genomic DNA was extracted from soursop leaves from 11 orchards (populations) in the following areas: Compostela (five populations), Tepic (three populations) and San Blas (three populations). Subsequently, we performed molecular analysis using SSR and SRAP molecular markers. The results indicated that the SSRs showed no polymorphism between the populations. On the other hand, we found 116 polymorphic loci in the SRAP markers with an average percentage of polymorphic loci ( $P$ ) among the producing areas of 29.55 %. Likewise, an AMOVA was performed, showing that the highest percentage of variance is found within the populations. Furthermore, cluster analyzes demonstrated the formation of three independent groups. Therefore, a high homozygosity and low genetic diversity of soursop were obtained between the areas and populations studied.

**Keywords:** genetic distance, microsatellites, populations, polymorphism.

## INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.) pertenece a la familia de las anonáceas (Linnaeus, 1753), cuyo centro de origen algunos autores lo presentan en América tropical (Nugraha et al., 2021). Agustín y Segura Ledesma (2014) realizaron un análisis sobre la conservación de anonáceas en México, reportando que la conservación de guanábana es *in situ* (huertas de traspatio) y *ex situ* (bancos de germoplasma) mediante la conservación de semillas.

Escobedo-López (2019) realizó un estudio de las principales zonas productoras de anonas en México, reportando que el germoplasma del género *Annona* está distribuido en áreas tropicales y subtropicales. En este sentido, Nayarit es el principal productor a nivel nacional con el 73 % de la producción total, concentrándose en los municipios de Compostela, Tepic y San Blas (SIAP, 2019). Sin embargo, existe escasa información respecto a la variabilidad genética de la guanábana debido principalmente al poco conocimiento de su genoma (Berumen-Varela et al., 2019). Por tanto, se necesita establecer un programa de mejoramiento genético para analizar la diversidad genética de guanábana mediante el uso marcadores moleculares, ya que permiten evaluar variaciones y polimorfismos en las secuencias del ADN.

Los marcadores moleculares se basan en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias de ADN entre individuos, siendo diversos, y de carácter dominante, favoreciendo la generación de datos multiloci o codominante que permite la identificación de homocigotos y heterocigotos (Canales-Delgado et al., 2015). Uno de los principales marcadores moleculares son los microsatélites (SSR), los cuales son de carácter codominante y permiten determinar las variaciones entre poblaciones e incluso entre especies (Vázquez et al., 2014). Presentan ventajas sobre otros marcadores debido a su elevado grado de polimorfismo, el tipo de segregación carácter codominante y una interpretación rápida (Carneiro et al., 2016). Otra de las ventajas que muestran los microsatélites, es que son marcadores homólogos para diferentes especies e incluso géneros, lo que permite hacer estudios comparativos entre éstos (Lassois et al., 2016).

Asimismo, los marcadores conocidos como polimorfismo amplificado relacionado a la secuencia (SRAP) se basan en dos amplificaciones específicas que nos permiten obtener datos de carácter dominante (Li y Quiroz, 2001).

En una investigación sobre el análisis de la diversidad genética de algunas especies de *Annonas*, se analizaron 11 genotipos de saramuyo (*Annona squamosa* L.) mediante marcadores RAPD (Bharad et al., 2009), donde se encontró que cinco oligonucleótidos produjeron bandas reproducibles; además, se generaron un total de 26 marcadores, de los cuales 19 fueron polimórficos. El análisis de RAPD demostró que tres genotipos fueron diferentes y el resto fueron similares, agrupándose en tres grupos diferentes. Asimismo, Guimarães et al. (2013) analizaron 64 accesiones de *Annona squamosa* L. provenientes del norte de Minas Gerais, Brasil utilizando marcadores RAPD. Los autores reportaron 167 fragmentos, de los cuales 48 fueron polimórficos (28,7 %) encontrándose bajo porcentaje de polimorfismo, lo que indica un bajo nivel de variación genética entre las accesiones evaluadas.

Por otro lado, se han realizado estudios de diversidad genética de guanábana en diferentes países, como Indonesia, Venezuela, Brasil y la India, encontrando baja variabilidad genética entre cada una de las accesiones del mismo país (Brown et al., 2003; Suratman et al., 2015; Anuragi et al., 2016; Hasan et al., 2017; Berumen-Varela et al., 2019). En México, Jiménez-Zurita et al. (2016) realizaron una caracterización morfológica de tres selecciones de frutos de guanábana en Tepic, Nayarit. Los resultados de esta investigación, mostraron variabilidad entre las selecciones evaluadas, agrupándose en cuatro grupos a partir de los datos de la masa de la cáscara, pulpa y semilla, diámetro longitudinal y ecuatorial, luminosidad y cromaticidad, entre otras. Por otro lado, Talamantes et al. (2019) evaluaron la diversidad genética de 88 genotipos de guanábana de huertos comerciales de Compostela, Nayarit usando SRAP, concluyendo que existen niveles bajos a moderados de diversidad genética en guanábana, indicando vulnerabilidad a factores ambientales.

Como puede observarse, existen escasos estudios a nivel genético de los árboles de guanábana en México. Debido

a la importancia económica que posee el fruto de éste en Nayarit, es importante generar el estudio y conocimiento de la diversidad genética para identificar ecotipos o fenotipos y así poder establecer un programa de mejoramiento genético para obtener variedades con características deseables para su comercialización. Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue analizar la diversidad genética de guanábana de las principales zonas productoras de Nayarit, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se recolectó tejido foliar de 219 árboles de guanábana durante la temporada otoño-invierno 2016 y 2017 a partir de huertos ubicados en Compostela (Tonino, Las Varas uno, Las Varas dos, Chacala uno y Chacala dos), San Blas (El Cocodrilaro, La Palma y Tecuitata) y Tepic (Trapichillo, V. Carranza y El Limón) sin daños físicos, libre de plagas y enfermedades.

Los árboles de guanábana de los huertos de Compostela, fueron propagados por semilla, y durante el estudio éstos tenían una edad entre los diez y 12 años (poblaciones de Las Varas y Chacala) y de 31 años para El Tonino. Por otro lado, se desconoce la edad de los árboles de guanábana de San Blas y Tepic, ya que éstos se encuentran a campo abierto o de traspatio, considerándolos como plantas silvestres; con excepción de los árboles establecidos en el ejido de Venustiano Carranza (Tepic), que fueron propagados por semilla, y tienen una edad de 20 años.

En seguida, el tejido foliar fue almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h en un ultracongelador (Thermo Scientific Revco Value Series ULT1386-3-a41, USA) y después fue liofilizado (Free Zone 2.5, LABCONCO, Houston, Texas, USA), a 420 mBar,  $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 48 h. Posteriormente, el tejido fue pulverizado por medio de un molino (KRUPS GX4100, Israel) y finalmente almacenado a temperatura ambiente hasta su uso.

### Extracción de ADN

El ADN genómico de guanábana se extrajo a partir de 50 mg de tejido foliar de acuerdo a la metodología reportada por Lira-Ortiz et al. (2020). La concentración y calidad del ADN se determinó mediante un nanoespectrofotómetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, 17 Waltham, MA, USA), a longitudes de onda de A260/280 nm y A260/230 nm así como por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %.

### Marcadores microsatélites (SSR)

Se seleccionaron 22 marcadores microsatélites para el género *Annona* (*Annona crassiflora* y *Annona cherimola* Mill.) a partir de trabajos previamente reportados (Pereira, 2007;

Escribano et al., 2008; Zonneveld et al., 2012) los cuales se muestran en el Anexo 1. La reacción de PCR consistió en 4  $\mu\text{L}$  de 0.8x REDTaq ready Mix™ PCR Reaction Mix R2523 (Sigma Aldrich Spruce Street, St. Louis, USA), 0.5  $\mu\text{L}$  de cada marcador (0.5 mM), 2  $\mu\text{L}$  de ADN (12.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) y 3  $\mu\text{L}$  de agua libre de ADNasa para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de PCR fueron las siguientes: a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido de 35 ciclos de  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 seg (desnaturalización),  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 seg y  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min (extensión) con una extensión final de  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min en un equipo Termociclador Prime Thermal Cycle (5PRIME/02, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, OSA, UK).

### Marcadores SRAP

Se seleccionaron tres marcadores SRAP a partir de lo previamente reportado (Li y Quiroz, 2001; Ferriol et al., 2003; Alghamdi et al., 2012; Aneja et al., 2013) como se observa en el Cuadro 1. La reacción de PCR consistió en 2  $\mu\text{L}$  de 0.8x REDTaq ready Mix™ PCR Reaction Mix R2523 (Sigma Aldrich Spruce Street, St. Louis, USA), 0,25  $\mu\text{L}$  de cada marcador (0,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  de ADN (12,5 ng/ $\mu\text{L}$ ) y 1,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de ADNasa para un volumen final de 5  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido por cinco ciclos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min y  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 min, para desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente. Posteriormente, se utilizaron 35 ciclos de  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min para desnaturalización,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min para alineamiento y  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min para extensión. La extensión final se llevó a cabo a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

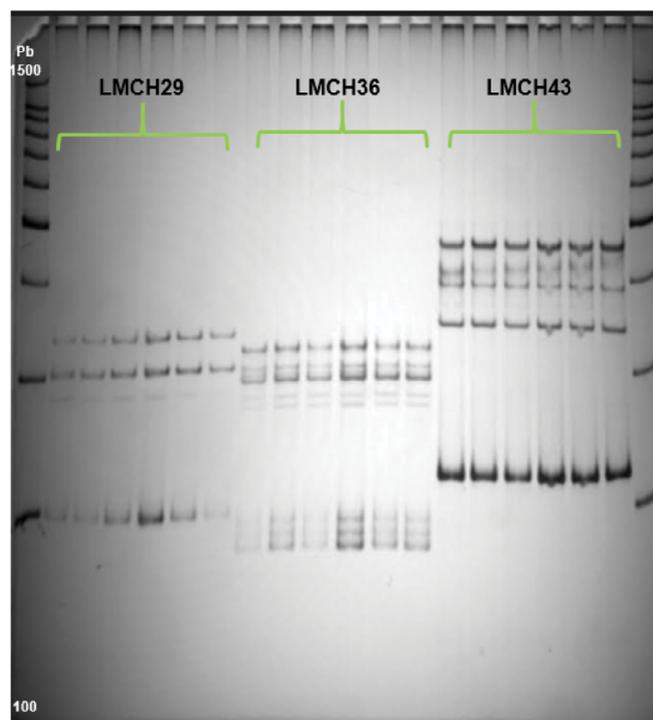


Figura 1. Polimorfismo de las poblaciones de guanábana mediante algunos marcadores SSR

## Geles de poliacrilamida por tinción de plata

El producto amplificado por PCR mediante los marcadores SSR y SRAP fue analizado en geles de poliacrilamida al 8 % a 250 V por 2 h. El revelado de los geles se llevó a cabo por tinción de plata mediante el método reportado por Sanguinetti et al. (1994).

## Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante la elaboración de una matriz de datos binarios de ausencia (cero) y presencia (uno) de bandas. Se determinaron los parámetros de diversidad genética: Índice de Shannon ( $I$ ) (PLA, 2006), Porcentaje de loci polimórfico ( $P$ ), y Heterocigocidad esperada ( $He$ ) (Nei, 1978), y análisis de componentes principales (PCA) mediante programa GenAlEx 6.5. La estructura genética fue evaluada mediante: análisis gráfico de agrupamiento por medio de la Agrupación promedio con media aritmética no ponderada (UPGMA), Distancias genéticas de Nei ( $D$ ) (Nei y Feldman, 1972), Prueba de exactitud (Raymond et al., 1995), mediante el software TFGA version 1.3 desarrollado por Miller (1997). El índice de diferenciación  $F_{ST}$  (Wright, 1965) se realizó mediante el software Arlequin version 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Las fórmulas de los parámetros de diversidad genética así como los valores de identidad/distancia genética se encuentran en el Anexo 3 y 4, respectivamente. Además, se llevó a cabo un análisis bayesiano de asignación de individuos mediante el software STRUCTURE version 2.3.4 (Evanno et al., 2005).

## RESULTADOS

### SSR

Con el fin de analizar la diversidad genética de guanábana en el estado de Nayarit, se utilizaron diferentes tipos de marcadores moleculares. Los marcadores SSR no mostraron polimorfismo en ninguna de las regiones analizadas (Fig. 1).

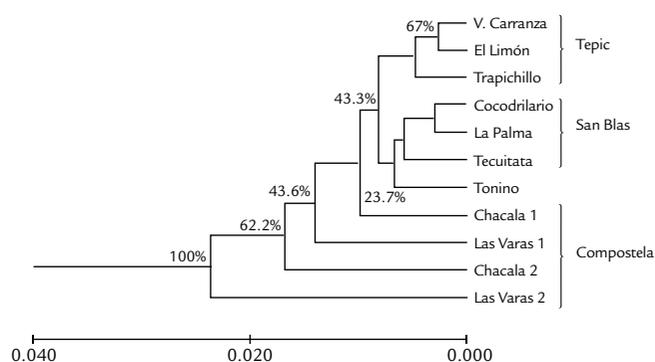
### SRAP

En los marcadores SRAP se visualizó un patrón de bandas de 116 loci polimórficos en un rango de diez a 500 pb. Además, se realizó una matriz de datos binomial, mediante cero (ausencia) y uno (presencia) de acuerdo a la presencia de bandas en el gel para obtener los parámetros de diversidad genética. En ese sentido, se obtuvo un promedio de porcentaje de loci polimórfico ( $P$ ) de las tres zonas analizadas de 29,55 % Compostela presentó el promedio de  $P$  más alto (43,5 %), seguido de San Blas (20,7 %) y Tepic (15,2 %) (Cuadro 2).

El índice de Shannon ( $I$ ), refleja la heterogeneidad de una población sobre dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. De las tres zonas

**Tabla 1.** Marcadores SRAP utilizados para la identificación de polimorfismos en guanábana

No. Marcador	Tipo de marcador	Secuencia del Primer
SRAP 1	Forward (5'-3') me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
	Reverse (5'-3') em12	GACTGCGTACGAATTGTC
SRAP 2	Forward (5'-3') me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
	Reverse (5'-3') em13	GACTGCGTACGAATTGTT
SRAP 3	Forward (5'-3') me4	TGAGTCCAAACCGGACC
	Reverse (5'-3') em15	GACTGCGTACGAATTCTG



**Figura 2.** Dendrograma de distancias genéticas de poblaciones de guanábana analizadas.

evaluadas, Compostela presentó los valores más altos de índice de Shannon ( $I$ ), con un valor promedio de 0,127. Este valor es considerado bajo dentro de las poblaciones. Asimismo, San Blas y Tepic también presentaron bajos valores de  $I$  de 0,061 y 0,043, respectivamente. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la población es poco abundante en especies.

El coeficiente de heterocigocidad esperada ( $He$ ) oscila entre valores de -1 a 1, valores negativos muestran heterocigocidad y positivos homocigocidad (Eguiarte, 2007). El promedio de  $He$  de las tres zonas evaluadas fue de 0,050, Compostela obtuvo un valor de  $He$  promedio de 0,074, seguido de San Blas con un valor de 0,036 y Tepic con un valor de 0,024. Por consiguiente, estos resultados indican que la guanábana de las tres zonas evaluadas son materiales clonados y por lo tanto, la variabilidad tiende a ser cero.

Como puede apreciarse, se obtuvieron bajos índices de diversidad genética ( $P$ ,  $I$ , y  $He$ ) en todas las zonas analizadas (Tabla 2). Compostela presentó los valores más altos en todos los índices analizados. Por otro lado, en esta investigación se realizó un análisis de varianza molecular AMOVA (Anexo 2) en el cual se observa que el mayor porcentaje de varianza se ubica dentro de las poblaciones al presentar un valor del 100 %. Esto indica que dentro de las poblaciones existe una alta diferencia genética. Asimismo, no se encontraron diferencias entre las zonas, así como entre poblaciones dentro de las zonas.

Se realizó una prueba de exactitud con una significancia de  $p < 0,05$ . El valor  $q$  de la prueba de exactitud para Nayarit fue de  $0,0710 \pm 0,0175$ , valor bajo a nivel zona y poblacional. Un valor análogo a  $q$  es el valor estadístico de  $F_{ST}$  de Wright, el cual fue calculado, obteniendo un valor de 0,00.

Por otro lado, se realizó un dendograma por el método de agrupación UPGMA (Fig. 2) a partir de la matriz de datos de Identidad/Distancia (Anexo 2) mediante el método de Nei y Feldman (1972). Los resultados mostraron la formación de dos grupos principales, el primero conformado solamente por la población de Las Varas dos y el segundo con las diez poblaciones restantes (Chacal dos, Las Varas uno, Chacala uno, V. Carranza, El Limón, Trapichillo, El Cocodrilario, La Palma y Tecuitata). Sin embargo, la distancia genética entre las poblaciones fue bajo (menores a 0,050), lo que demuestra una escasa diferenciación genética. La distancia genética entre los subgrupos formados (grupo dos) fue de 0,0080.

**Tabla 2.** Índices de diversidad genética de guanábana

Zona	Población	P	I	He
	Tonino	31.9	0.78	0.043
	Las Varas uno	52.59	0.152	0.088
Compostela	Las Varas dos	45.69	0.125	0.072
	Chacala uno	53.45	0.125	0.091
	Chacala dos	33.62	0.157	0.076
		43.45 ± 4.57 %	0.127	0.074
	El Cocodrilario	12.93	0.05	0.031
San Blas	La Palma	31.03	0.074	0.04
	Tecuitata	18.1	0.06	0.036
		20.68 ± 5.38	0.061	0.036
	Trapichillo	16.38	0.045	0.025
Tepic	V. Carranza	12.93	0.041	0.024
	El Limón	16.38	0.043	0.024
		15.23 ± 1.15 %	0.043	0.024

P: Porcentaje de loci polimórfico, He: Heterocigocidad esperada, I: índice de Shannon

Además, se realizó un gráfico de PCA basado en los datos obtenidos (Fig. 3a). Se identificaron tres grupos, el primer y segundo grupo (segundo y tercer cuadrante) formados por las poblaciones que pertenecen a la zona de Compostela y el tercer grupo, formado por las zonas de Tepic, San Blas y algunos huertos de las poblaciones de Compostela (cuarto cuadrante). El primer y segundo grupo se encontró más alejado en comparación con el tercer grupo. Esto coincide con lo obtenido por el dendograma de distancias genéticas, donde se observó que la población de Las Varas dos (Compostela) formó un grupo independiente. Estos resultados indican que algunos huertos de la zona de Compostela poseen mínimas diferencias genéticas en comparación con los de Tepic y San Blas.

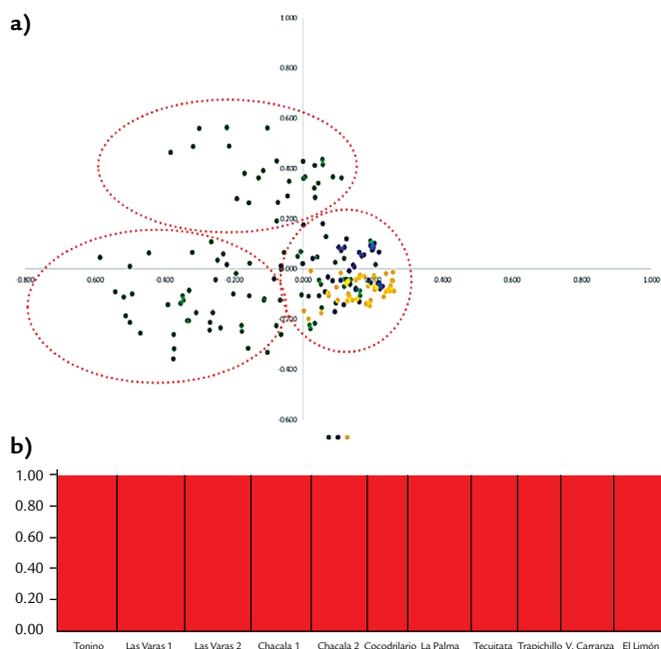
Por otro lado, el tercer grupo formado por PCA coincide con lo observado por el dendograma de distancias genéticas, en el cual se observó que la mayoría de las poblaciones de Tepic, Compostela y San Blas se encuentran agrupadas. Sin embargo, se observó una baja dispersión de todas las poblaciones analizadas en los cuatro cuadrantes. Estos resultados sugieren que las poblaciones de guanábana se agruparon de acuerdo a la zona geográfica analizada.

Por último, se realizó un análisis de estructura genética mediante un análisis bayesiano utilizando el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (Fig. 3b) con las siguientes condiciones: 250 000 cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), 50 000 réplicas y diez repeticiones para cada  $K$  (Evanno et al., 2005). Los resultados del análisis bayesiano mostraron poblaciones puras, lo que significa que todos los individuos presentan las mismas características y pertenecen a una misma población filogenética (Fig. 3b). Esto soporta lo encontrado con los demás análisis.

## DISCUSIÓN

### SSR

Los marcadores microsatélites se caracterizan por ser altamente polimórficos; el alto grado de polimorfismo es debido a una elevada tasa de mutación, que se atribuye a eventos de inserción y delección durante la replicación del ADN (Carneiro et al., 2016). En anonáceas se han utilizado los marcadores microsatelitales para analizar la diversidad genética, obteniéndose un alto grado de polimorfismo entre las poblaciones analizadas, siendo una herramienta poderosa para la caracterización genética (Pereira, 2007; Gwinner et al., 2016). En una investigación con 23 accesiones de chirimoya, provenientes de diferentes áreas geográficas (Bolivia, Colombia, Ecuador, México, Perú, Portugal y España), se reportaron 52 nuevos marcadores SSR, concluyendo que la mayoría son transferibles para otras especies de anonas (Escribano et al., 2008). Por otro lado, Anuragi et al. (2016), analizaron la diversidad genética mediante el uso de SSR y RAPDs en 20 genotipos de anonas provenientes de cinco especies de anonas (*A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. muricata*, *A. atemoya*, *A. squamosa*) de distintos lugares de India, encontrando un alto polimorfismo (93 %) entre los genotipos de las especies de anonas analizadas. Sin embargo, como puede observarse, estos resultados difieren con lo obtenido en este estudio debido a que no se observó polimorfismo (Fig. 1), esto posiblemente puede ser atribuido a la temperatura y humedad relativa que predomina en cada región respecto al país de estudio. De acuerdo con lo reportado por Escribano et al. (2007) sus investigaciones en México se llevaron a cabo en regiones de clima templado subhúmedo (Coatepec harinas y Michoacán) con temperaturas promedio de 21° C y 38 % de humedad relativa. Azcón-Bieto et al.



**Figura. 3.** a). Análisis de PCA de las zonas productoras de guanábana. Amarillo: Tepic; Azul: San Blas; Compostela: Verde. Línea Punteada Roja: Agrupamiento. b) Representación gráfica de la estructura genética de 11 poblaciones de guanábana donde los grupos genéticos ( $K$ ) están indicados por colores sobre el eje X.

(2008) reportó que la polinización se ve afectada por las características ambientales, sobre todo por la temperatura y la humedad relativa; el efecto de la temperatura puede ser indirecto, al alterar la actividad de las abejas (principales polinizadoras de los árboles frutales); las cuales permiten la libre polinización mediante el transporte del polen a una temperatura media de 20-22 °C. Para el caso de la región productora de guanábana en Nayarit, la temperatura oscila entre los 28 a 34 °C (en algunos meses la temperatura es hasta 37 °C) y una humedad relativa en la escala de 85 al 92 %; lo que dificulta la libre polinización, que para fines comerciales se realiza manualmente, por lo que se puede dar la autogamia debido a la polinización directa y con ello, la consanguinidad.

### SRAP

Los SRAP se utilizaron para detectar variaciones entre poblaciones ya que es un sistema de marcadores basado en PCR, capaz de detectar polimorfismos en secuencias de codificación, a partir de la identificación de las bandas más informativas (Luan et al., 2015).

Salazar et al. (2010), analizaron la diversidad genética en 14 poblaciones de *A. squamosa* de diferentes zonas socioeconómicas de Yucatán y Quintana Roo, reportando que los marcadores enzimáticos fueron polimórficos con tres y cuatro alelos. Además, encontraron valores de varianza del 85 % entre los genotipos dentro de las poblaciones, 12 %

dentro de una misma zona socioeconómica y 2 % entre zonas socioeconómicas, demostrando que la estructura genética no está relacionada con la distancia entre huertos en las entidades geográficas (Salazar et al., 2010). Talamantes et al. (2019) analizaron cinco poblaciones de guanábana del municipio de Compostela, Nayarit, mediante marcadores SRAP, encontrando una variación del 88 % dentro de las poblaciones. Los resultados de las investigaciones mencionadas coinciden con los obtenidos en este estudio, donde se observó un alto porcentaje de varianza dentro de las poblaciones analizadas.

Por otro lado, se encontraron valores mínimos (cero) en la prueba de exactitud para el valor de  $q$  y la prueba  $F_{ST}$  de Wright, lo que indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones y posee un tipo de reproducción endogámica. Éstos resultados son significativamente menores a los encontrados en otros huertos de *A. muricata*, ya que Brown et al. (2003), reportaron valores de 0,5038 en árboles de guanábana de Venezuela utilizando marcadores RAPDs, lo que refleja mayores distancias genéticas entre sus poblaciones.

Salazar et al. (2010) reportaron que la edad de los árboles puede ser un factor que influya en la homogeneidad genética. Asimismo, Parraguirre Lezama et al. (2002) reportan que la diferenciación genética de las poblaciones establecidas en la región puede estar asociada al tamaño de ésta.

Otro factor importante que pudiera estar involucrado en la baja diversidad genética es el polen. En *A. squamosa* la dispersión de polen es a corta distancia y los principales polinizadores son coleópteros por lo que sugiere que el flujo de polen es limitado (Endres et al., 2007; Salazar et al., 2010). En ese sentido, para poder obtener una gran cantidad de frutos, los agricultores realizan como actividad principal la dispersión del polen entre los huertos, lo que conlleva a una baja diferenciación entre poblaciones. Sin embargo, se han reportado resultados que difieren con los obtenidos en este estudio. Brisibe et al. (2014) analizaron la diversidad genética de 42 accesiones de guanábana de diferentes zonas de Nigeria mediante marcadores RAPD; los resultados de esa investigación mostraron altos niveles de diversidad genética y grados de divergencia, agrupándose las poblaciones en más de tres grupos.

Asimismo, Sánchez et al. (2018) analizaron la diversidad genética con base a la producción de 71 genotipos de guanábana durante los ciclos de producción del 2000 al 2016 en Colombia. En ese estudio encontraron que los genotipos formaron cinco grupos de acuerdo a su rendimiento. Además, demostraron que algunos genotipos tienen el potencial para generar una población con un alto rendimiento y variabilidad genética.

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación, la baja diversidad genética de guanábana puede estar asociada a factores bióticos, abióticos y/o epigenéticos. Sin

embargo, la falta de datos genómicos en plantas no-modelo ha dificultado conocer la asociación genética entre el genotipo, fenotipo y los factores previamente mencionados (Richards et al., 2017).

Otra posible explicación a los resultados encontrados puede estar asociada a que la mayoría de los árboles provienen de la propagación por semilla, lo que conlleva a un ancestro en común. Guimaraes et al. (2013) encontraron baja variabilidad genética entre accesiones provenientes del norte de Minas Gerais, Brasil. Los autores atribuyen este resultado a que los árboles de los huertos pudieron estar establecidos a partir de semillas de frutos del mercado central de la ciudad de Monte Claros, por lo que probablemente los árboles provinieran de un ancestro en común, lo que explicaría la baja diversidad genética entre las accesiones. Por lo tanto, la diversidad genética puede variar como resultado de múltiples factores como la dispersión del polen, condiciones ambientales y tipo de propagación.

## CONCLUSIONES

Existe baja diversidad genética dentro y entre las poblaciones de guanábana proveniente de las zonas de Compostela, Tepic y San Blas. Por tanto, es importante que se implemente un banco de germoplasma que permita salvaguardar el acervo genético existente.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en materias agrícolas, pecuaria, acuacultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos SADER-CONACyT número 266891 “Aprovechamiento del germoplasma, desarrollo tecnológico e innovación en cadenas de valor de Anonáceas en México” y Fondo Sectorial de Investigación para la educación SEP-CONACyT número 242718 “Caracterización morfológica, bioquímica y genética de guanábana (*Annona muricata* L.)”. Los autores agradecen a CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca otorgada a al primer autor así como el apoyo brindado al autor por correspondencia bajo la convocatoria “Apoyos para la Incorporación de Investigadores Vinculada a la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación y/o Fortalecimiento del Posgrado Nacional”.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Alghamdi, S. S., Suleiman, A. A. -F, Hussein, M. M., Muhammad, A. K., Ehab, H. E. -H., y Megahed, H. A. (2021). Molecular Diversity Assessment using sequence related amplified polymorphism (SRAP) Markers in *Vicia*

*Faba* L. *International Journal Molecular Sciences*, 13(12), 16457-16471. <http://doi.org/10.3390/ijms131216457>

Agustín, A. J., y Segura Ledesma, S. D. (2014). Conservación y uso de los recursos genéticos de anonáceas en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 118-124. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500014>

Aneja, B., Yadav, N. R., y Kumar, R. (2013). Sequence related amplified polymorphism (SRAP) analysis for genetic diversity and micronutrient content among gene pools in mungbean (*Vigna radiate* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, 399-407. <http://doi.org/10.1007/s12298-013-0177-3>

Anuragi, H., Dhaduk, H. L., Kumar, S., Dhruve, J. J., Parekh, M. J., y Sakure, A. A. (2016). Molecular diversity of *Annona* species and proximate fruit composition of selected genotypes. *3 Biotech*, 6, 204-213. <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0520-9>

Agúzón-Bieto, J., Bou, I. F., Aranda, X., y Casanovas, N. G. (2008). Fotosíntesis, factores ambientales y cambio climático. *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 247-263). McGraw-Hill Interamericana de España.

Bharad, S. G., Kulwal, P. L., y Bagal, S. A. (2009). Genetic diversity study in *Annona squamosa* by morphological, biochemical and RAPD markers. *Acta Horticulturae*, 839, 615-623. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.84>

Berumen-Varela, G., Hernández-Oñate, M. A., y Tiznado-Hernández, M. E. (2019). Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata* L.). *Scientia Horticulturae*, 245, 269-273. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.028>

Brisibe, E. A., Ogbonna, N. C., y Chukwurah, P. N. (2017). Characterization and selection of exploitable genetic diversity in soursop (*Annona muricata* Linn.) accessions based on phenotypic attributes and RAPD markers. *Agroforestry Systems*, 91(4), 781-793. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9965-4>

Brown, J., Laurentin, H., y Davila, M. (2003). Genetic relationship between nine *Annona muricata* L. accessions using RAPD markers. *Fruits*, 58, 255-259. <http://doi.org/10.1051/fruits:2003013>

Canales-Delgado, J. C., Chapa-Vargas, L., Cotera-Correa, M., y Scott-Morales, L. M. (2015). La genómica en la investigación científica y en la gestión de la vida silvestre en México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(30), 06-19. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i30.204>

Carneiro Vieira, M. L., Santini, L., Lima Diniz, A., y Munhoz, C. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312-328. <https://dx.doi.org/10.1590%2F1678-4685-GMB-2016-0027>

Endres, L. (2007). Daily and seasonal variation of water relationship in sugar apple (*Annona squamosa* L.) under different irrigation regimes at semi-arid Brazil.

- Scientia Horticulturae*, 113(2), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.007>
- Eguiarte, L. E., Souza, V., y Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular* (1ª ed, pp. 594). Secretaria de medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad CONABI, Universidad Autónoma de México.
- Escobedo-Lopez, D., Campos-Rojas, E., Rodriguez-Núñez, J. R., Alia-Tejacal, I., y Núñez-Colín, C. A. (2019). Priority areas to collect germplasm of *Annona* (Annonaceae) in Mexico based on diversity and species richness indices. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66, 401-413. <http://doi.org/10.1007/s10722-018-0718-2>
- Escribano, P., Viruel, M. A., y Hormaza, J. I. (2007). Molecular analysis of genetic diversity and geographic origin within an *ex situ* germplasm collection of cherimoya by using SSRs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(3), 357-367. <http://doi.org/10.21273/JASHS.132.3.357>
- Escribano, P., Viruel, M. A., y Hormaza, J. I. (2008). Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Molecular Ecology Resources*, 8(2), 317-321. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01941.x>
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin Suite ver 3.5, a New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Ferriol, M., Picó, B., y Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 271-282. <http://doi.org/10.1007/s00122-003-1242-z>
- Guimarães, J. F. R., Nietsche, S., Costa, M. R., Moreira, G. B. R., Pereira, M. C. T., y Vendrame, W. (2013). Genetic diversity in sugar apple (*Annona squamosa* L.) by using RAPD markers. *Revista Ceres*, 60(3), 428-431. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000300017>
- Gwinner, R., Setotaw, T. A., Rodrigues, F. A., Franca, D. V. C., da Silveira, F. A., Pio L. A. S., y Pasqual, M. (2016). Population structure of *Annona crassiflora*: an endemic plant species of the Brazilian Cerrado. *Genetic Molecular Research*, 15(4). <http://dx.doi.org/10.4238/gmr15049137>
- Hasan, A. E. Z., Bermawie, N., Julistiono, H., Riyanti, E. I., Artika, I. M., y Khana, P. (2017). Genetic Diversity Analysis of Soursop (*Annona muricata* L.) in West Java Region of Indonesia Using RAPD Markers. *Annual Research & Review in Biology*, 14(6), 1-7. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/34354>
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-Lopez, P., Sumaya-Martínez, M. T., y Bello-Lara, J. E. (2016). Caracterización de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(6), 1261-1270. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i6.175>
- Lassois, L., Denancé, C., Ravon, E., Guyader, A., Guisnel, R., Hibrand-Saint-Oyant, L., Poncet, C., Lasserre-Zuber, P., Feugey, L., y Durel C. -E. (2016). Genetic Diversity, population structure, parentage análisis, and construction of core collections in the french Apple germplas based on SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(4), 827-844. <http://doi.org/10.1007/s11105-015-0966-7>
- Li, G., y Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system base on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 455-461. <http://doi.org/10.1007/s001220100570>
- Lira-Ortiz, R., Cortés-Cruz, M. A., Amaro-González, B. A., López-Guzmán, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Balois-Morales, B., y Berumen-Varela, G. (2020). Comparación de tres métodos de extracción de ADN genómico de hojas de guanábana (*Annona muricata* L.). *Mexican Journal of Biotechnology*, 5(2), 106-119. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.2.106>
- Miller, M. P. (1997). *Tools for population genetic analysis (TFPGA) version 1.3: a Windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Department of Biological science, Northern Arizona University.
- Luan, M. -B., Zou, Z. -Z., Zhu, J. -J., Wang, X. -F., Xu, Y., Zhi-Min, S., y Chen, J. -H. Genetic diversity assessment using simple sequence repeats (SSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers in ramie. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(4), 624-630. <http://doi.org/10.1080/13102818.2015.1026843>
- Nei, M., y Feldman, M. W. (1972). Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. *Theoretical Population Biology*, 3, 460-465. [http://doi.org/10.1016/0040-5809\(72\)90017-2](http://doi.org/10.1016/0040-5809(72)90017-2)
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Nugraha, A. S., Haritakun, R., Lambert, J. M., Dillon, C. T., y Keller, P. A. (2019). Alkaloids from the root of Indonesian *Annona muricata* L. *Natural Product Research*, 35(3), 1-9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1638380>
- Parraguirre Lezama, C., Vargas Hernández, J. J., Ramírez Vallejo, P., Azpíroz Rivero, H. S., y Jasso Mata, J. (2002). Estructura de la diversidad Genética en poblaciones

- naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(3), 279-287.
- Pereira, F. M. (2007). Development of molecular markers SSR and genetic characterization of natural population of *A. crassiflora* Mart. In the state of Goías. *Revista de Biología Neotropical*, 4(2), 167-168. <https://doi.org/10.5216/rbn.v4i2.5219>
- PLA, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Raymod, M., y Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49(6), 1280-1283. <http://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1995.tb04456.x>
- Richards, C. L., Alonso, C., Becker, C., Bossdorf, O., Bucher, E., Colomé-Tatché, M., Durka, W., Engelhardt, J., Gaspar, B., Gogol-Döring, A., Grosse, I., Van Gorp, T. P., Heer, K., Kronholm, I., Lampei, C., Latzel, V., Mirouze, M., Opgenoorth, L., Paun O., Prohaska S. J., Rensing S. A., Stadler P. F., Trucchi E., Ullrich K., Koen J., y Verhoeven F. Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, 20(12), 1576-1590. <https://doi.org/10.1111/ele.12858>
- Salazar, C., Vargas-Mendoza, C. F., y Flores, J. S. (2010). Estructura y diversidad genética de *Annona squamosa* en huertos familiares Mayas de la península de Yucatán. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(3), 759-770. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2010.003.647>
- Sánchez, C. F. B., Lopes, B. E., Teodoro, P. E., Garcia, A. D. P., de Azevedo-Peixoto, L., y Silva, L. A. (2017). Genetic diversity among soursop genotypes based on fruit production. *Journal of Biosciences*, 34(1). <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-37421>
- Sanguinetti, C., y Dias-Neto, E. (1994). RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *BioTechniques*, 17(5), 915-18.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (26/10/2018). [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp)
- Suratman, S., Pitoyo, A., Mulyani, S., y Suranto, S. (2015). Assessment of genetic diversity among soursop (*Annona muricata*) population from Java, Indonesia using RAPD markers. *Biodiversitas*, 16(2), 247-253. <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d160220>
- Talamantes-Sandoval, C. A., Cortés-Cruz, M. A., Balois-Morales, R., López-Guzmán, G. G., y Palomino-Hermosillo, Y. A. (2019). Análisis molecular de la diversidad genética en guanábana (*Annona muricata* L.) mediante marcadores SRAP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 209-214. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.209>
- Vázquez, L. Y. A., Morales, G. A. E., Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendon-Aguilar, B., y Graciela-Rocha, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) (1ª ed, pp. 6-214). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395-420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x>
- Zonneveld, M. V., Scheldeman, X., Escribano, P., Viruel, M. A., Damme, P. V., García, W., Tapia, C., Romero, J., Sigueñas, M., y Hormaza, J. I. (2012). Mapping genetic diversity of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Application of spatial analysis for conservation and use plant genetic resources. *PLOS ONE*, 7(1):1-14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0029845>