

## Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae

### Microsatellites developed in guava (*Psidium guajava* L.) and their usefulness in evaluating diversity in the Myrtaceae family

*Juliette Valdés-Infante Herrero*<sup>1</sup>, *Narciso Nerdo Rodríguez Medina*<sup>2</sup>, *Martin Bautista Alor*<sup>3</sup>,  
*Matilde Margarita Ortíz García*<sup>3</sup>, *Adriana Quiroz Moreno*<sup>3</sup>,  
*Lorenzo Felipe Sánchez Teyer*<sup>4</sup>, *Angi Marie Risterucci*<sup>5</sup>, *Wolfgang Rohde*<sup>6</sup>

---

#### Resumen

La familia Myrtaceae ha evolucionado desde las formas más primitivas en los bosques húmedos y lluviosos hasta formas especializadas en regiones semiáridas, muy secas y altamente influenciadas por los cambios estacionales. Aunque los botánicos han estado describiendo estas especies desde hace 200 años, la clasificación de las mismas no está completamente esclarecida. Las Secuencias Simples Repetidas (SSR), conocidas comúnmente como microsatélites, representan una porción significativa del genoma eucariótico y pueden ser de gran utilidad para estos fines. El objetivo del presente trabajo fue utilizar cebadores SSR, diseñados previamente para guayabo, en la identificación de accesiones y en el estudio de diversidad en Myrtaceae. Para este propósito se emplearon cuatro combinaciones de cebadores SSR siguiendo los protocolos establecidos en la literatura. Se realizó el análisis de los resultados atendiendo a la potencialidad de amplificación cruzada, la detección de diferentes alelos, la utilidad para la identificación de accesiones y el estudio de la diversidad y la determinación de las relaciones existentes entre las especies y cultivares en estudio. El alto nivel de polimorfismo detectado por los microsatélites evaluados, el cual se refleja en los valores de los índices relacionados con el nivel de polimorfismo y la capacidad de discriminación calculados, indica las potencialidades de los SSR para la identificación de accesiones en otros representantes de la familia Myrtaceae. Además, representan

- 
- 1 Bióloga, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigador Agregado, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. [mejoramiento@iift.cu](mailto:mejoramiento@iift.cu)
  - 2 Biólogo, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Titular, Instituto de Investigaciones en Fruticultura. [isabel.garcia@infomed.sld.cu](mailto:isabel.garcia@infomed.sld.cu)
  - 3 Técnicos, Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán.
  - 4 Ingeniero Bioquímico, Doctor en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Investigador asociado C, Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. [santey@cicy.mx](mailto:santey@cicy.mx)
  - 5 Ingeniero Químico, Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement (CIRAD). [risterucci@cirad.fr](mailto:risterucci@cirad.fr)
  - 6 Ingeniero Químico, Prof. Doctor Max-Planck Institut für Züchtungsorschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, 50829, Köln, Germany.

una herramienta de gran utilidad para estudios de diversidad en esta familia; así como para la estimación de las relaciones de parentesco entre los genotipos analizados, análisis taxonómico y de filogenia.

**Palabras clave:** amplificación cruzada, identificación de accesiones, parentesco.

### Abstract

The Myrtaceae family has evolved from primitive forms in rainy and humid forest to specialised forms in semiarid and very dry regions, these being highly influenced by seasonal changes. Although botanists have been describing Myrtaceae family species for more than 200 years, classification is far from being completely clear. Simple sequences repeats (SSR), usually known as microsatellites, represent a significant portion of the eukaryotic genome and can be of great use for these purposes. The object of the present work was to use SSR primers (previously designed in guava) for accession identification and diversity studies on other Myrtaceae family members. Four SSR primer combinations were thus used, following the protocols established in the literature. The results were analysed paying particular attention to cross-amplification potentiality, detecting different alleles, use in accession identification and diversity studies and determining relationships between the species being studied and cultivars. The high level of polymorphism detected by the microsatellites being evaluated (reflected in the values of each index related to polymorphism and calculated discriminating capacity) indicated SSR potential for accession identification in other Myrtaceae family members. It also represents a useful tool for diversity studies in this family and estimating parentage relationships between the genotypes being investigated and taxonomic and phylogenetic analysis.

**Key words:** Cross amplification, accession identification, relatedness.

Recibido: octubre 22 de 2009

Aprobado: junio 18 de 2010

### Introducción

La familia Myrtaceae es muy antigua y se ha diversificado grandemente con el transcurso de los siglos (Pizo, 1999; Ladiges *et al.*, 2003). Ha evolucionado desde las formas más primitivas en los bosques húmedos y lluviosos hasta formas especializadas en regiones semiáridas, muy secas y altamente influenciadas por los cambios estacionales (Wilson, 1999). Aunque los botánicos han descrito estas especies desde hace 200 años, la clasificación de las mismas no está completamente esclarecida (Landrum *et al.*, 1995).

Comprende alrededor de 80 géneros y 3000 especies, las cuales prosperan en la mayor parte de las áreas tropicales y subtropicales del mundo, principalmente en las Américas, Asia y Australia (Carnaveli, 1976; Nakasone y Paull,

1998). El guayabo constituye, dentro del género *Psidium*, uno de sus representantes más importantes desde un punto de vista comercial, por el valor nutricional de su fruto y lo rentable de su cultivo (Coelho de Lima *et al.*, 2002; Vasco *et al.*, 2003; Sanabria *et al.*, 2005).

Las Secuencias Simples Repetidas (SSR), conocidas comúnmente como microsatélites, constituyen repeticiones en tandem de unidades que pueden contener de dos a cinco nucleótidos. Representan una porción significativa del genoma eucariótico (Persson, 2001). Dentro de sus ventajas más importantes se encuentran su naturaleza multialélica y codominante, abundancia relativa, fácil detección por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cobertura extensiva del genoma, entre otras (Powell *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 2004).

Risterucci *et al.* (2005) diseñaron cebadores SSR a partir de diferentes genotipos de guayabo. Estos han sido de gran utilidad para el desarrollo de estudios de diversidad y la identificación de accesiones en el cultivo (Rodríguez *et al.*, 2005; Valdés-Infante *et al.*, 2007; Valdés-Infante *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, y la referencia en la literatura de su potencialidad de transferencia a otros representantes de igual género o familia (Marques *et al.*, 2002; Zucci *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2007; Ochieng *et al.*, 2007), se planteó como objetivo del presente trabajo utilizar cebadores SSR diseñados previamente para guayabo, en la identificación de accesiones y en el estudio de diversidad de otros representantes de Myrtaceae.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

El material vegetal utilizado para la caracterización molecular (tabla 1) forma parte de la colección (confeccionada siguiendo un diseño completamente aleatorizado, que incluye dos réplicas por accesión) de la familia Myrtaceae de la Unidad Científico-Tecnológica de Base (UCTB) de Alquizar, provincia La Habana, perteneciente al Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT) de Cuba; la cual se encuentra ubicada en los 22° 47' de latitud norte y los 82° 31' de longitud oeste a 11 m sobre el nivel del mar y con una topografía llana de pendiente 0. Los suelos sobre los que se asienta corresponden al

**Tabla 1.** Especies de la familia Myrtaceae utilizadas en el estudio de diversidad por microsatélites

No.	Especie	Origen
1	<i>Psidium guajava</i> L. cv. Enana Roja Cubana	Cuba
2	<i>Psidium guajava</i> L. cv. Seychelles	Islas Seychelles
3	<i>Psidium guajava</i> L. cv. Microguayaba*	Occidente de Cuba
4	<i>Zyzygium malaccense</i> Merr. & L.M.Perry	Asia
5	<i>Psidium cattleianum</i> Sab.	Brasil
6	<i>Psidium salutare</i> (Kunth) Berg.	Occidente de Cuba
7	Híbrido <i>Psidium guajava</i> / <i>Psidium friedrichsthalium</i>	Provincia Habana, Cuba
8	<i>Psidium araca</i> Raddi	Brasil
9	<i>Psidium</i> spp.	Islas Seychelles
10	<i>Psidium friedrichsthalium</i> (Berg.) Nied.	América central
11	<i>Psidium</i> spp.	Oriente de Cuba
12	<i>Psidium molle</i> Bertol.	América central
13	<i>Psidium guineense</i> Sw.	Brasil
14	<i>Eugenia uniflora</i> L.	Brasil

\* Considerada como la subespecie *Pumila* de *P. guajava* L. (Valdés-Infante *et al.*, 2003).

tipo Ferralítico Rojo Compactado y Ferralítico Rojo Hidratado, y tienen un pH entre 5,5 y 6,5 (Rodríguez *et al.*, 1999).

### ***Aislamiento y purificación del ADN genómico***

Se extrajo el ADN genómico, procedente de 5,0 g de material foliar, a través de una modificación (Ramírez *et al.*, 2004) del protocolo del CTAB descrito por Doyle y Doyle (1990). Posteriormente, se purificaron con columnas NucleoSpin (Machery y Nagel,

2002) para ADN de alto peso molecular. La concentración y calidad del ADN precipitado fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y comparada con el marcador de concentración 1kb (GIBCO-BRL, Netherlands).

### ***Análisis con el marcador molecular SSR***

Para el análisis con el marcador molecular SSR se evaluaron cuatro combinaciones de cebadores (tabla 2).

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores, tipo de fluorocromo utilizado en el marcaje y tamaño de los fragmentos esperados

Cebador	Secuencias	Tipo de Fluorocromo	Tamaño de los fragmentos
<i>mPg99</i>	F: TCAAGGTCCAAAACATGC	FAM (azul)	70-120pb
	B: GGGATGGAGTAAAGTAGAAA		
<i>mPg137</i>	F: GGGGAATGCAGAGATTGT	NED (amarillo)	170-245pb
	B: AGATGATGGTCTCGCTTTT		
<i>mPg 30</i>	F: CTCAAAGCACTATCATGTCC	FAM (azul)	140-180pb
	B: CCTTGTGGGTCTCTTTTG		
<i>mPg 176</i>	F: TCCTCAATGATAGGTTACGG	NED (amarillo)	95-165pb
	B: ATGACTATTCTCCACCAGAT		

F: cebador directo; B: cebador reverso; pb: pares de bases

En la amplificación de la PCR se utilizó un volumen final de 20 µL que contenía: 50 ng de ADN genómico, tampón de PCR 1X, 10 mM de dNTP, 10pM de cada cebador, uno de ellos marcado con un fluorocromo (FAM o NED), de acuerdo con la combinación empleada (tabla 2), y 1U de *Taq* polimerasa. El programa incluye los siguientes pasos: 1) 94 °C, 3 min; (2) 94 °C, 45 s; (3) 58 °C, 60 s; (4) 72 °C, 60 s; (5) 94 °C, 45 s; (6) 53 °C, 60 s; (7) 72 °C, 60 s; (8) 72 °C, 10 min; (9) 10 °C (infinito) enfriamiento; con 10 repeticiones del paso 2 al 4, descendiendo la temperatura de acoplamiento en 0,5 °C en cada ciclo hasta

53 °C. Una vez concluida la PCR, se tomó 1 µL de cada muestra y se le añadió 0,4 µL de rox, 10 µL de formamida y 5 µL de aceite mineral. Esta mezcla se desnaturalizó por 5 min a 96 °C. Los fragmentos amplificados fueron separados usando electroforesis capilar en un secuenciador automático tipo ABI 310, donde fueron analizados por un período de 24 horas.

### ***Análisis de los datos***

Para el análisis de los datos se tuvo en cuenta una intensidad mínima de 100 unidades

de fluorescencia en un rango de fragmentos establecido para cada cebador (tabla 2). A causa de su naturaleza codominante, los perfiles SSR se analizaron como homocigóticos (presencia de un solo alelo) o heterocigóticos (presencia de dos o más alelos). A partir de los resultados obtenidos se realizó la clasificación de los alelos detectados atendiendo a los principios sugeridos por Perera *et al.* (2001) y Maguire *et al.* (2002): un alelo común fue definido como un alelo que está presente en al menos una accesión en una frecuencia mayor del 1%; un alelo raro como un alelo que nunca está presente en una frecuencia mayor del 1%; un alelo ampliamente distribuido como un alelo que está presente en más del 40% de las accesiones; un alelo esporádico como un alelo que está presente entre el 6% y el 36% de las accesiones, y un alelo localizado como un alelo que está presente en una sola accesión.

Por otra parte, para determinar los niveles de polimorfismo y la capacidad de discriminación, se estimaron los siguientes indicadores para cada unidad de ensayo ( $U$ : variable morfológica o el producto de la amplificación de la PCR obtenida con una pareja de cebadores), según lo sugerido por Belaj *et al.* (2003):

1. Número de bandas polimórficas (o estados): ( $N_p$ ).
2. Número promedio de bandas polimórficas por unidad de ensayo (o estados): ( $N_p/U$ ).
3. Número de patrones de bandas (o estados): ( $T_p$ ).
4. Número de patrones de bandas (o estados) únicos: ( $T_{up}$ ).
5. Número promedio de patrones de banda (o estados) por unidad de ensayo: ( $I$ ).
6. Número promedio de patrones de bandas (o estados) únicos por unidad de ensayo: ( $I_u$ ).
7. Probabilidad de confusión ( $C_j$ ) de la  $j^{\text{mo}}$  unidad de ensayo (Tessier *et al.*,

1999):  $C_j = \sum_{i=1}^I P_i \frac{(Np_i - 1)}{N - 1}$  donde  $P_i$  es la frecuencia del  $i^{\text{mo}}$  patrón (o estado);  $N$ , tamaño de la muestra;  $I$ , número total de patrones (o estados) generados por la  $j^{\text{mo}}$  unidad de ensayo.

8. Poder de discriminación ( $D_j$ ) de la  $j^{\text{mo}}$  unidad de ensayo (Tessier *et al.*, 1999):  $D_j = 1 - C_j$
9. Límite de  $D_j$  cuando  $N$  tiende a infinito ( $D_L$ ):  $D_L = \lim(D_j) = 1 - \sum_{i=1}^I P_i^2$
10. Número promedio de patrones (o estados) efectivos por unidad de ensayo ( $P$ ):  $P = \frac{1}{1 - D_L}$

A partir de estos mismos datos se generó una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0) de los alelos detectados. Con los resultados de las mejores combinaciones de cebadores respecto a los índices evaluados se desarrolló un análisis de agrupamiento, en el cual se tuvo en cuenta el valor cofenético más alto para la selección del coeficiente y del algoritmo de agrupamiento por emplear. Para el cálculo de la matriz de disimilitud se utilizó el coeficiente de Jacard (1908) entre cada par de accesiones. A su vez, para la construcción del dendrograma se seleccionó el método de las Medias Aritméticas por Grupo no Ponderadas (UPGMA, Unweighted Pair-group Method Arithmetic Averages). Para el criterio de corte se consideró un valor superior al 50% de similitud entre posibles grupos. Todos los datos fueron estandarizados previamente, y se empleó el paquete estadístico NTSYS-pc (versión 2.1; Rohlf, 2001) para su realización.

## Resultados y discusión

Las cuatro combinaciones de cebadores utilizadas para el análisis de los datos revelaron de 8 a 19 alelos por locus para un total de 52, con un promedio de 13 alelos por microsatélite. Autores como Dos Santos *et al.* (2007) han obtenido un número similar de alelos totales utilizando 10 cebadores SSR procedentes de *Eucalyptus spp* en 119 accesiones de *Feijoa sellowiana*,

ambos pertenecientes a la familia Myrtaceae. El número promedio de alelos observado supera al de 10,4 encontrado por Zucchi *et al.* (2003) en la transferencia de 10 cebadores SSR de *Eucalyptus spp* en 116 genotipos de *Eugenia dysenterica*, también pertenecientes a la familia del guayabo. De forma general, los valores detectados en el presente estudio son superiores a los referidos por Barros *et al.* (2002) y Okun *et al.* (2008) y por Stover *et al.* (2008) en la caracterización de accesiones de *Eucalyptus spp* y de *Psidium guajava* L., respectivamente. A su vez, son inferiores a los encontrados por Crawford *et al.* (2008) durante el desarrollo de microsatélites en *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae) y por Kirst *et al.* (2005) en el análisis de parentesco entre genotipos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden).

La amplificación cruzada con otras especies de *Myrtaceae* reveló patrones SSR confiables, aunque para el caso de *Eugenia uniflora*, *Psidium spp.*, procedente de la región Montesano del oriente cubano, *Psidium araca* y *P. salutare*, sólo se observó producto de PCR para una de las combinaciones evaluadas. Se registraron de uno a dos alelos por locus para *Zyzygium malaccense*, *Psidium friedrichsthalianum*, *Psidium araca*, *Psidium spp.*, introducido de Islas Seychelles,

*Psidium salutare*, *Psidium spp.*, procedente de la región Montesano del oriente cubano y *Eugenia uniflora*. Por otra parte, *Psidium cattleianum*, *Psidium molle*, *Psidium guineense*, y el posible híbrido de *Psidium guajava* con *Psidium friedrichsthalianum*, mostraron desde tres hasta seis alelos por locus. Risterucci *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares para el caso de *Psidium cattleianum*, lo que coincide con lo referido en la literatura relacionado con el estatus poliploide de esta especie y de *Psidium guineense* (Nakasone y Paull, 1998). No obstante, se hace necesario corroborar estos resultados por hibridación con sondas de estos microsatélites. Steane *et al.* (2005) detectaron un 98% de transferibilidad de secuencias de SSR cloroplástico de *Eucalyptus globulus* en cuatro representantes de este género y en otros de la familia Myrtaceae. En contraste, sólo el 26% y el 2% de las combinaciones analizadas mostraron producto de PCR en la amplificación cruzada de cebadores de *Eucalyptus spp.* con *Feijoa sellowiana* (dos Santos *et al.*, 2007) y con *Eugenia dysenterica* (Zucchi *et al.*, 2003), respectivamente.

En la tabla 3 se muestra el número de alelos y su clasificación atendiendo a su frecuencia y distribución.

**Tabla 3.** Clasificación de los alelos atendiendo a su frecuencia y distribución

Cebadores	No. A	Alelos comunes			Alelos raros		
		ACAD	ACE	Total	ARE	ARL	Total
mPgCIR99	8	2	0	2	0	6	6
mPgCIR137	15	1	4	5	0	10	10
mPgCIR30	10	2	2	4	0	6	6
mPgCIR176	19	0	4	4	0	15	15
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>37</b>	<b>37</b>

No. A: número de alelos; ACAD: alelos comunes ampliamente distribuidos; ACE: alelos comunes esporádicos; ARE: alelos raros esporádicos; ARL: alelos raros localizados.

Se detectó un total de 15 alelos clasificados como comunes, de los cuales 5 son ampliamente distribuidos y 10 esporádicos. Además, se clasificaron 37 alelos como raros localizados. La utilización de cebadores diseñados para *Eucalyptus spp* en el estudio de accesiones de *Feijoa sellowiana* también permitió la identificación de

alelos de baja frecuencia, los cuales se distribuyeron en genotipos de orígenes diferentes (Dos Santos *et al.*, 2007).

La distribución de los diferentes tipos de alelos detectados para cada una de las especies evaluadas se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Alelos detectados para cada una de las especies de Myrtaceae evaluadas

Especies	ACAD	ACE	ARL	Total
<i>Psidium guajava</i> L. cv. Enana Roja Cubana	2	4	1	6
<i>Psidium guajava</i> L. cv. Seychelles	3	2	3	8
<i>Psidium guajava</i> L. cv. Microguayaba	3	0	1	4
<i>Zyzygium malaccense</i> Merr. & Perr.	2	0	1	3
<i>Psidium cattleianum</i> Sab.	0	2	6	8
<i>Psidium salutare</i> (Kunth) Berg.	0	0	2	2
Híbrido <i>Psidium guajava</i> / <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	5	2	1	8
<i>Psidium araca</i> Raddi	0	0	1	1
<i>Psidium</i> spp.	1	3	0	4
<i>Psidium friedrichsthalianum</i> (Berg.) Niedenzu	2	1	1	4
<i>Psidium</i> spp.	0	0	2	2
<i>Psidium molle</i> Bertol	3	1	10	14
<i>Psidium guineense</i> Sw. c	1	4	4	9
<i>Eugenia uniflora</i> L.	0	0	1	1

ACAD: alelos comunes ampliamente distribuidos; ACE: alelos comunes esporádicos; ARL: alelos raros localizados.

La combinación de alelo raro localizado se considera como una de las más difíciles de encontrar en cualquier estrategia de muestreo de diversidad (Perera *et al.*, 2001). Todos los genotipos analizados mostraron este tipo de alelo, excepto *Psidium spp.* (introducido de Islas seychelles). La presencia de estos alelos únicos realza el valor de estas especies como una fuente peculiar de variación genética en el germoplasma analizado, sugiriendo que son materiales importantes dentro de la colección para propósitos de conservación por portar información distintiva.

En la tabla 5 se muestran los resultados relacionados con el nivel de polimorfismo y el poder de discriminación para cada cebador evaluado y para el marcador SSR. Los niveles de polimorfismo generados detectaron un número de patrones de bandas totales que varió de cinco para *mPg99* hasta 11 para *mPg137* y

*mPg176*. Los únicos estuvieron entre tres para *mPg99* y 10 para *mPg176*, siendo esta última combinación y la *mPg137* las que más patrones de este tipo detectaron. Para el caso de SSR, de los 33 totales detectados, 25 son únicos, lo que pudiera estar indicando la capacidad discriminativa de este marcador molecular en otros representantes de Myrtaceae, referida también para el guayabo por Valdés-Infante *et al.* (2008). El número promedio de patrones de bandas totales fue de 8,25 y el de los únicos fue de 6,25 para el marcador (tabla 5).

El parámetro  $C_j$  (Probabilidad de confusión) representa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar muestren patrones de bandas idénticos, por tanto  $D_j$  (Poder de discriminación) se refiere a la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar tengan patrones de bandas diferentes, lo que indica que pueden ser distinguidos uno del otro.

Estos índices son utilizados para evaluar la eficiencia de un marcador genético determinado en la identificación de genotipos y constituyen una extensión del Contenido de Información

Polimórfica (PIC) calculado a partir de las frecuencias de los diferentes patrones generados (Tessier *et al.*, 1999).

**Tabla 5.** Nivel de polimorfismo y poder de discriminación del marcador molecular SSR en representantes de Myrtaceae

Índices y sus abreviaturas		Cebadores				SSR
		mPg137	mPg99	mPg30	mPg176	
Número de unidades de ensayo	$U$	1	1	1	1	4
Número de bandas polimórficas	$n_p$	15	8	10	19	52
Número de bandas monomórficas	$n_{np}$	0	0	0	0	0
Número total de bandas	$n$	15	8	10	19	52
Número promedio de bandas polimórficas por unidad de ensayo	$n_p/U$	15	8	10	19	13
Número total de patrones de bandas	$T_p$	11	5	6	11	33
Número de patrones de bandas únicos	$T_{up}$	8	3	4	10	25
Número promedio de patrones de banda por unidad de ensayo	$I$	11	5	6	11	8,25
Número promedio de patrones de bandas únicos por unidad de ensayo	$I_u$	8	3	4	10	6,25
Probabilidad de confusión promedio	$C_j$	0,03	0,30	0,32	0,07	0,18
Poder de discriminación promedio	$D_j$	0,97	0,70	0,68	0,93	0,82
Límite del Poder de discriminación promedio	$D_L$	0,90	0,65	0,63	0,88	0,76
Número promedio de patrones efectivos por unidad de ensayo	$P$	9,8	2,9	2,72	7,5	4,21

Se observó un alto Poder de discriminación ( $D_j$ ) para las combinaciones *mPg137* y *mPg176* como consecuencia de los bajos valores de Probabilidad de confusión ( $C_j$ ) detectados, los cuales variaron de 0,68 para *mPg30* hasta 0,97 para *mPg137*, y un valor total del marcador de 0,82 (tabla 5). Este valor supera al referido por Valdés-Infante *et al.* (2010) en la comparación entre caracteres morfoagronómicos, AFLP y SSR en la caracterización de accesiones de guayabo (*Psidium guajava* L.). A su vez, es mayor que el PIC detectado para los diferentes cebadores de microsatélites empleados en

la caracterización de accesiones de *Metrosideros polymorpha* (Crawford *et al.*, 2008).

Los valores de  $D_L$  estimados estuvieron cercanos a los valores de Poder de discriminación ( $D_j$ ) calculados (tabla 5), lo que sugiere que los resultados que se deriven del análisis con el número de genotipos evaluados pueden ser extrapolados a un tamaño mayor de muestras.

El número promedio de patrones efectivos ( $P$ ) indica el tamaño de una población ideal en la cual, dada la frecuencia de los patrones obtenidos con un sistema de marcadores, se

pueden distinguir todos los individuos (Belaj *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto, pueden discriminarse como máximo 10 accesiones para el caso de *mPg137* y como mínimo tres para *mPg99*; mientras que sólo cuatro accesiones pueden ser identificadas con el marcador SSR total (tabla 5). Este último valor supera al referido por Valdés-Infante *et al.* (2010) en la caracterización de accesiones de guayabo por SSR.

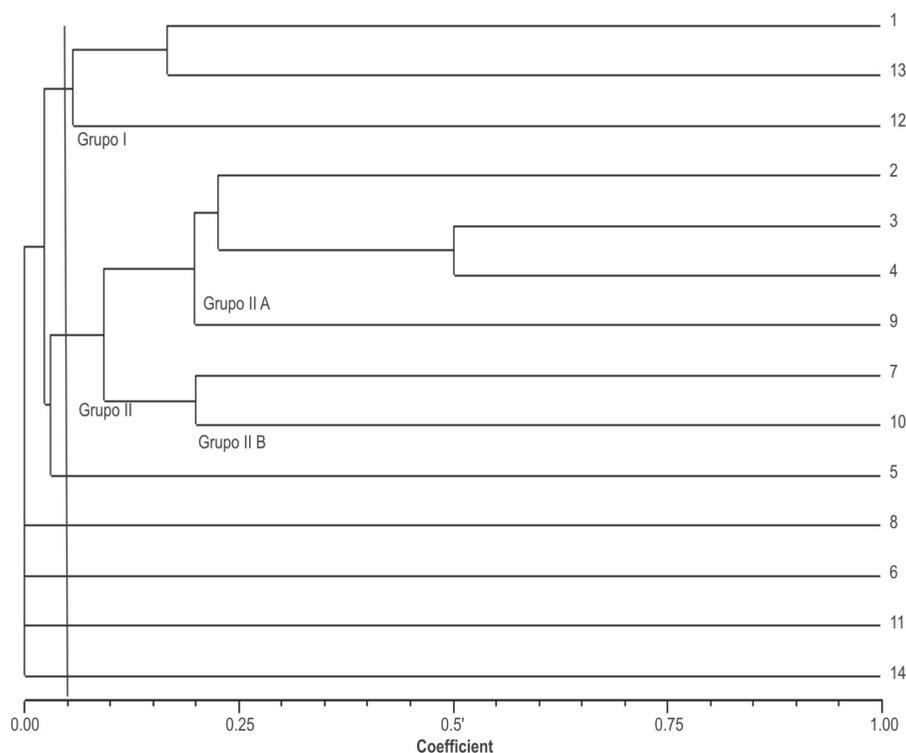
El alto nivel de polimorfismo detectado por microsátélites, el cual está reflejado en los valores de cada uno de los índices comentados anteriormente, sobre todo para el caso de las combinaciones de cebadores *mPg137* y *mPg176*, enfatiza la capacidad discriminadora de este marcador molecular. Esto sugiere la potencialidad de los SSR para estudios de identificación y de diversidad en otros representantes de *Myrtaceae*, lo cual se corresponde con lo referido en la literatura para *Psidium guajava* L. (Valdés-Infante *et al.*, 2010); *Metrosideros boninensis* (Kaneko *et al.*, 2007); *Cocos nucifera* L. (Perera *et al.*, 1998); *Vitis vinifera* L. (Regner *et al.*, 2000); *Mangifera spp.* (Eiadthong *et al.*, 2000); *Anacardium occidentale* L. (Archak *et al.*, 2003); *Olea europaea* L. (Belaj *et al.*, 2003); *Bromus tectorum* L. (Ramakrishnan *et al.*, 2004) y *Persea americana* Mill. (Rodríguez *et al.*, 2009).

Por otra parte, la figura 1 muestra las relaciones genéticas entre las especies de *Myrtaceae* estudiadas teniendo en cuenta los resultados relevantes obtenidos para las parejas de cebadores *mPg137* y *mPg176*. En la misma se puede apreciar la formación de dos grupos y dos subgrupos bien definidos, así como la separación de las cinco accesiones externas *Psidium cattleianum*; *Psidium araca*; *Psidium salutare*; *Psidium spp.* (procedente de la región Montesano del oriente cubano) y *Eugenia uniflora*. Los valores de similitud entre grupos fueron del 2% y entre subgrupos del 11%, corroborando su existencia. Valores entre el 35% y el 100% han sido referidos por Dos Santos *et al.* (2007) en los grupos formados a partir del dendrograma generado por cebadores SSR de *Eucalyptus spp.* en accesiones de *Feijoa sellowiana*, estudio en el

cual no fue posible diferenciar cuatro de los genotipos analizados, a diferencia de lo observado en el presente trabajo.

Resulta interesante destacar la asociación de la accesión 'Enana Roja Cubana', de *Psidium guajava* L., con *Psidium guineense* y *Psidium molle* (figura 1). Esta constituye el cultivar más importante en explotación comercial actualmente en Cuba por sus características distintivas como porte bajo, buena productora y resistente. Existen referencias en la literatura acerca de la incompatibilidad que se puede presentar en cruzamientos interespecíficos en el género *Psidium* (Morton, 2000). No obstante, se ha planteado que es satisfactoria la hibridación entre *P. guajava* y *P. guineense* (Landrun *et al.*, 1995), y que los híbridos muestran las mismas características por las que se destaca la 'Enana Roja Cubana' del resto de las accesiones presentes en el país. Se hace necesario la utilización de otras combinaciones de cebadores SSR para corroborar o no la hipótesis de que la 'Enana Roja Cubana' puede ser un híbrido entre estas dos especies. Por otra parte, se ha observado que también es factible el cruzamiento entre *P. guajava* y *P. molle*, aunque puede haber cierto grado de incompatibilidad en dependencia de cuál especie es utilizada como progenitor femenino y cuál como masculino (Subramanyam e Iyer, 1993). Por tanto, no resulta sorprendente su ubicación con la 'Enana Roja Cubana' y *P. guineense*, si se tiene en cuenta, además, que este último y *P. molle* son sinónimos y pertenecen a una única especie (Valdés-Infante *et al.*, 2005).

De igual forma, se pudo corroborar el parentesco entre el posible híbrido natural de *P. guajava* con *P. friedrichsthalianum* y sus dos parentales, teniendo en cuenta la localización de este híbrido en un grupo que incluye ambas especies (figura 1, Grupo II). El mismo se ubicó más cercano a *P. friedrichsthalianum*, por lo que se recomienda evaluarlo frente a la infestación con memátodos del género *Meloydogine*, dada la tolerancia a esta plaga referida para *P. friedrichsthalianum* en la literatura por diversos autores (González y Sourd, 1982; Pérez, 2000; Rossi *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Resultado del análisis de agrupamiento de las especies de *Myrtaceae* evaluadas, realizado mediante el coeficiente de Jacard, utilizando como método de agrupamiento el UPGMA, sobre la base de los 34 marcadores SSR generados con las combinaciones de cebadores *mPg137* y *mPg176*.

A su vez, las dos especies procedentes de Islas Seychelles (*Psidium guajava* L. var. Seychelles y *Psidium spp.*) se encuentran ubicadas en el mismo grupo, lo cual es de esperar dado su origen geográfico común (figura 1, Grupo II A).

La accesión Microguayaba, catalogada como una posible subespecie de *P. guajava* por sus características morfológicas distintivas (Valdés-Infante *et al.*, 2003, Valdés-Infante, 2005), se encontró asociada a una especie del género *Zyzygium* (figura 1), con la cual muestra un valor de similitud del 50%. Aún cuando desde un punto de vista morfológico son bien diferentes, se hace necesario ampliar el número de combinaciones de cebadores para evaluar, a fin de lograr una correcta clasificación de este genotipo y determinar si la asociación con este representante es casual o tiene una implicación taxonómica.

Respecto a las accesiones externas, *P. catleianum* sobresale por su naturaleza poliploide (Nakasone y Paull, 1998), lo que se corresponde con su ubicación más distante del resto de las especies. Por otra parte, *P. araca*, *Psidium spp.* (introducido de la región Montesano del oriente cubano) y *P. salutare* sólo mostraron patrones SSR para una de las cuatro combinaciones evaluadas (tabla I), y la presencia de alelos raros específicos (tabla III), al igual que ocurrió para el representante del género *Eugenia*. Estos elementos justifican su localización en el dendrograma (figura 1).

Las combinaciones de cebadores evaluadas constituyeron una herramienta de gran utilidad para estudios de diversidad en otros representantes de Myrtaceae; así como para la estimación de las relaciones de parentesco entre los genotipos analizados, lo que confirma lo obtenido para otros cultivos como *Cucumis melo* L. (Staub *et al.*, 2000), *Prunus persica* (L.). Batsch

(Kimura *et al.*, 2002), y *Musa balbisiana* L. (Ge *et al.*, 2005).

## Conclusiones

Los marcadores SSR evaluados tienen potencialidad de amplificación cruzada en representantes de los géneros *Psidium*, *Zyzygium* y *Eugenia* pertenecientes a la familia Myrtaceae.

Las parejas de cebadores empleadas permitieron identificar una gran diversidad de alelos raros localizados, los cuales juegan un papel importante en las estrategias futuras de conservación en la colección de Myrtaceae.

La utilización de diversos índices para evaluar el nivel de polimorfismo y la capacidad de discriminación indicó la potencialidad de los microsatélites para estudios de identificación de accesiones en otros representantes de Myrtaceae.

Los cebadores SSR desarrollados para guayabo son potencialmente útiles para realizar estudios de diversidad, determinar relaciones de parentesco, análisis taxonómico y filogenético en la familia Myrtaceae.

## Referencias bibliográficas

- Archak, S., A. B. Gaikmad, D. Gautam, E. V. Rao, K. R. Swamy, J. L. Karihaloo. 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46 (3): 362-369.
- Barros, R., J. I. Muros, I. Eleotéreo, E. Fernández. 2002. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* spp. genotypes using RAPD and SSR markers. *Scientia Forestalis* 62: 24-31.
- Belaj, A., Z. Zatovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo, I. Trujillo. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 736-744.
- Carnaveli, A. 1976. La guava. *Fruticoltora* 38 (12): 29-33.
- Coêhlo de Lima, M.A., Simão de Assis, J., Gonzaga, L. 2002. Caracterização dos frutos de goiabeira e seleção de cultivares na região do submédio São Francisco. *Rev Bras Frutic* 24 (1), 273-276.
- Crawford, N. G., C. Hagen, H. F. Sahl, E. A. Stacy, T. C. Glenn. 2008. Fifteen polymorphic microsatellite DNA loci from Hawaii's *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae: Myrtales), a model species for ecology and evolution. *Molecular Ecology Resources* (8): 308-310.
- Dos Santos, K. L., L. J. Welter, A. de Mesquita, M. P. Guerra, J. P. H. J. Ducroquet, R. Nodari. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization *Genet Mol Biol* 30 (1): 30-40.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 (1): 13-15.
- Eiadthong, W., K. Yomemori, S. Kanzaki, A. Sugiura, N. Utsanomiga, S. Subhadrabandhu. 2000. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis for studying genetic relationship among *Mangifera* spp in Thailand. *J Amer Soc Hort Sci* 125 (2): 160-164.
- Ge, X. J., M. H. Liu, W. K. Wang, B. A. Schaal, T. Y. Chiang. 2005. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. *Molecular Ecology* 14 (4): 933-943.
- González, G., D. Sourd. 1982. Ensayo de tres especies de *Psidium* y su tolerancia a los nemátodos. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y otros frutales* 5 (2): 13-25.
- Jacard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44: 223-270.
- Kaneko, S., Y. Isagi, F. Nobushima. 2007. Development of microsatellite markers for *Metrosideros boninensis* (Myrtaceae), an endangered endemic plant species from the Bonin Islands, Japan. *Conservation Genetics* 8 (3): 753-755.
- Kimura T., T. Yamamoto, K. Mochida, T. Imai, N. Matsuta, Y. Ban, T. Hayashi. 2002. Development and mapping of SSR markers in peach and pear. *Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference*. 10 p.
- Kirst, M., C. M. Cordeiro, G. D. S. P. Rezende, D. Gratapaglia. 2005. Power of Microsatellite Markers for Fingerprinting and Parentage Analysis in *Eucalyptus grandis* Breeding Populations. *Journal of Heredity* 96 (2): 161-166.

- Ladiges, Y. P., F. Udovicic, N. Gareth. 2003. Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography* 30 (7): 989-998.
- Landrum, L., W. Clark, W. Sharp, J. Bredecke. 1995. Hybridization between *Psidium guajava* and *P. guineense* (Myrtaceae). *Economic Botany* 49 (2): 153-161.
- Machery and Nagel. 2002. NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1 Protocol. Germany. p. 3-13.
- Maguire, T. L., R. Peakall, P. Saenger. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet.* 104: 388-398.
- Marques, C. M., R. P. V. Brondani, D. Grattapaglia, R. Sederoff. 2002. Conservation and synteny of SSR loci and GTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 105 (2-3): 474-478.
- Morton, J. F. 2000. Guava. In: *Fruits of warm climates*. Miami. p. 356-363. <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/morton/guava.html>.
- Nakasone, Y. H., R. E. Paull. 1998. *Tropical Fruits. Crop Production Science in Horticulture*. ISBN 0-85199-254-4. UK. 468 p.
- Ochieng, J. W., D. A. Steane, P. Y. Ladiges, P. R. Baverstock, R. J. Henry, M. Shepherd. 2007. Microsatellites retain phylogenetic signals across genera in *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Genetics & Molecular Biology* 30 (4): 1125-1134.
- Okun, D. O., E. U. Kenya, P. O. Oballa, D. W. Odee, G. M. Muluvi. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. *African Journal of Biotechnology* 7 (13): 2119-2123.
- Perera, L., J. R. Russell, J. Provan, W. Powell. 2001. Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica* 122: 381-389.
- Perera, L., J. R. Russell, J. Provan, J. W. McNicol, W. Powell. 1998. Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 545-550.
- Pérez, J. M. 2000. Conferencia sobre fitonematología en el cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.). Curso internacional sobre el cultivo de la guayaba. Ed. Instituto de investigaciones de Cítricos y Otros Frutales. 6 p.
- Persson, H. 2001. Estimating Genetic Variability in Horticultural Crop Species at different Stages of Domestication. Doctoral Thesis. ISSN 1401-6249. ISBN 91-576-5838-2. 30 p.
- Pizo, M. A. 1999. Seed dispersal of Myrtaceae species in the Brazilian Atlantic forest. *British Ecological Society. SEPG* 1625. 5 p.
- Powell, W., C. Gordon, C. Machray, J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1 (7): 215-222.
- Ramakrishnan, A. P., S. E. Meyer, J. Waters, M. R. Stevens, C. E. Coleman, D. J. Fairbanks. 2004. Correlation between molecular markers and adaptively significant genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae), an inbreeding annual grass. *American Journal of Botany* 91: 797-803.
- Ramírez, I. M., N. N. Rodríguez, J. Valdés-Infante, M. Capote, D. Becker, W. Rohde. 2004. Isolation of genomic DNAs from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for DNA marker application. *Cultivos Tropicales* 25: 33-38.
- Regner, F., A. Stadlbauer, C. Eisenheld. 2000. Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties. *Acta Hort (ISHS)* 546: 112-118.
- Risterucci, A. M., M. F. Duval, W. Rohde, N. Billotte. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Mol Ecol Notes* 5: 824-826.
- Rodríguez, N. N., G. González, A. Simón, R. Jiménez, O. Mas y M. Morenza. 1999. Recursos genéticos del aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. I. Prospección, colecta, establecimiento de la colección, selección y caracterización de cultivares. *CITRIFRUT* 17 (1-2-3): 27-32.
- Rodríguez, N. N., J. L. Fuentes, O. Coto, V. R. Fuentes, I. M. Ramírez, D. Becker *et al.* 2009. Comparison of morphological traits, isozymes and DNA markers for estimating the discriminating capacity and informativeness in Cuban avocado (*Persea americana* Mill.) accessions. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 39 (3): 40-50.
- Rodríguez, N. N., J. Valdés-Infante, D. Becker, B. Velázquez, G. González, D. Sourd *et al.* 2005. Characterization of guava accessions by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. In: Pathak, R. K., Singh, G., Kishun, R., Chandra, E. (eds.). *Proceedings of the First International Guava Symposium*, Lucknow, India, December 5-8, 2005. Louvain: ISHS

- [Belgique], p. 201-215. International Guava Symposium 1, 2005-12-05/2005-12-08, Lucknow, Inde.
- Rohlf, F. J. 2001. NTSYS-PC, numerical taxonomy and multivariate análisis system. Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York. <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsypc.html>. 30 p.
- Rossi, C. E., L. C. C. B. Ferraz, P. T. Montaldi. 2002. Resistencia de Frutíferas de Clima Subtropical e Temperado a *Meloidogyne incognita* raza 2 e *M.javanica*. Arq Ints Biol São Paulo 69 (2): 43-49.
- Sanabria H., M. García, H. A. Díaz, J. Muñoz. 2005. Caracterización morfológica en árboles nativos de guayaba del valle del Cauca. Acta Agronómica 54 (4): 1-8.
- Staub, J., P. Danin, G. Fazio, T. Horejsi, N. Reis, N. Katzir. 2000. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica 115 (3): 225-241.
- Steane, D., A. R. C. Jones, R. E. Vaillancourt. 2005. A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). Molecular Ecology Notes 5 (3): 538-541.
- Stover, E., T. Gottwald, D. Hall, M. Aradhya, F. Zee, J. Crane. 2008. Guava SSR Analysis: Diversity Assessment and Similarity to Accessions Associated with Reducing Citrus Greening in Vietnam. Hort Science 43: 1119-1129.
- Subramanyan, M. D., C. P. A. Iyer. 1993. Improvement of Guava. In: Advances in Horticulture. Vol. 1-Fruits Crops Part 1. Malhotra Publishing House. New Delhi. p. 337-347.
- Tessier, C., J. David, P. This, J. M. Boursiquot, A. Charrier. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied Genetic 98: 171-177.
- Valdés-Infante, J. 2005. Caracterización morfoagronómica y molecular del banco de germoplasma de guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Máster en Biología Vegetal. Ciudad de La Habana, Cuba. 86 p.
- Valdés-Infante, J., N. N. Rodríguez, B. Velázquez, D. Rivero, F. Martínez, A. M. Risterucci *et al.* 2010. Comparison of the Polymorphism Level, Discriminating Capacity and Informativeness of Morph-agronomic Traits and Molecular Markers in Guava (*Psidium guajava*). Ed. Proceedings of the Second International Guava Symposium, Mérida-Aguas Calientes, November 10-19, 2008. ISHS. Acta Horticulturae 849. p. 121-132.
- Valdés-Infante, J., N. N. Rodríguez, D. Becker, B. Velásquez, D. Sourd, G. Espinosa and W. Rohde. 2007. Microsatellites characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. Cultivos Tropicales 28 (3): 5-11.
- Valdés-Infante, J., D. Becker, N. Rodríguez, B. Velásquez, G. González, D. Sourd *et al.* 2003. Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. J Genet Breed 57: 349-358.
- Vasco, N. L., J. S. Padilla, J. Toro. 2003. Composición nutricional de la guayaba y sus semillas. Primer Simposio Internacional de la guayaba. p. 116-123.
- Wilson, P. 1999. Evolution of the Myrtle family in Australia. [Http://www.Evolution/of/the/Myrtle/Family/in/Australia.htm](http://www.Evolution/of/the/Myrtle/Family/in/Australia.htm) . 7 p.
- Zucchi, M. I., R. P. V. Brondani, J. B. Pinheiro, L. J. Chaves, A. S. G. Coelho, R. Vencovsky. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC. in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. Genet Mol Biol 26: 449-457.