



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes



División de Estudios de Posgrado e Investigación
Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria

Comparación genética de individuos y poblaciones de guayaba en los principales estados productores de México

Tesis que presenta:

Pablo Emilio Solano Nevárez

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria



El Llano Aguascalientes, México, febrero de 2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DICTAMEN DE TESIS APROBADA**

El Llano, Ags., a **05/febrero/2019**

El Comité de Tesis del Candidato a grado **C. PABLO EMILIO SOLANO NEVÁREZ**, aprobado por el Consejo de Posgrado de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes; integrado por los **C. Dr. Luis Lorenzo Valera Montero, Dra. Silvia Flores Benítez, Dr. Héctor Silos Espino**, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo final de la tesis titulada: **"Comparación genética de individuos y poblaciones de guayaba en los principales estados productores de México"**, que presenta como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria, según lo establecen los lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el SNIT, así mismo, de acuerdo a las Bases para la Elaboración de Tesis de Posgrado, dictaminaron su **APROBACIÓN** para que pueda ser presentada en el Examen de Grado correspondiente.

ATENTAMENTE

"Terra Rica, Sapientia Nostra, Homo Superior Est"

Dr. Luis Lorenzo Valera Montero
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Héctor Silos Espino
ASESOR

Dra. Silvia Flores Benítez
ASESOR



AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes por brindarme su conocimiento, tiempo e instalaciones durante mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo de manera económica para lograr desarrollar mi proyecto.

A los maestros de la DEPI quienes fungieron como maestros, asesores y amigos que me impulsaron a culminar mis estudios de maestría.

A Laura Lorena Alba Nevárez y Jose Guillermo Batista Ortiz quienes me apoyaron de manera incondicional y enseñarme que la vida es un constante tiempo de aprendizaje.

A Gabriela Ruíz Colín quien fue más que una compañera y amiga que me acompañó durante mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

A mi padre Alejandro Arturo Solano Mendivil que se esfuerza cada día por mantener a su familia, tiene interés y preocupación cada vez que estoy lejos de él y me da su felicidad para que salga adelante.

A mi madre Lucia del Carmen Nevárez Garibay por todo el amor que me ha dedicado cada día desde que nací, quien es la persona más trabajadora y paciente que conozco y busca la unión entre sus seres queridos.

A mis hermanos Alejandro Arturo, Carlos David y Lucia Paulina quienes he compartido tiempo, grandes platicas, aventuras y sobre todo amistad que solo un hermano puede dar.

RESUMEN

Este trabajo de investigación buscó la caracterización genética de individuos y poblaciones de guayabo (*Psidium guajava* L.) mediante marcadores genéticos denominados microsatélites para la identificación de su procedencia de las distintas regiones en las que se produce en México: Calvillo, Aguascalientes; Jalpa, Zacatecas, y algunas zonas del estado de Michoacán. Es necesaria la diferenciación de sabor, calidad y consistencia de las frutas provenientes de dichas regiones para ofrecer un valor agregado al producto por su denominación de origen. Además, al identificar los genotipos ligados a las características físicas deseables para la exportación de la fruta se hace posible la producción de mejores variedades. Para ello, se recolectaron 160 muestras de guayabo de las tres regiones. Como resultado, sí se logró la detección de polimorfismos; sin embargo, se observó una muy baja variabilidad entre individuos, lo que hace necesario de un gran número de microsatélites para una buena distinción entre las especies. Se considera que la técnica utilizada en este estudio puede ser usada en el mejoramiento genético de la guayaba, el estudio de su origen en México y la definición de su autenticidad.

ABSTRACT

This research aimed the genetic characterization of guava tree individuals and populations through microsatellites as molecular markers to identify its origin from the different productive regions of guava in Mexico: Calvillo, Aguascalientes; Jalpa, Zacatecas, and several zones from the state of Michoacán. It is made necessary to differentiate flavor, quality and consistency of the fruit from those regions to offer an added value to the product for its regional denomination. Furthermore, by identifying the genotypes linked to the desirable physical characteristics in foreign markets, makes it possible the production of improved varieties. To do so, 160 samples were taken from guava trees from the three regions with the purpose of being genetically tested. As a result, the polymorphism detection has been achieved, nevertheless a very low variability between individuals was observed, making it necessary to have a great amount of microarrays for the good distinction between species. This technique can be considered to be used for the genetic improvement of the guava, and for the study of the origin of the guava in Mexico and its authenticity.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DICTAMEN DE TESIS APROBADA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
III. HIPÓTESIS	5
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1 Características físicas del guayabo	6
4.2 Condiciones de cultivo	7
4.3 Importancia de la guayaba en México	7
4.4 Marcadores morfológicos	8

4.5 Marcadores moleculares	8
4.5.1 Los microsatélites o SSR	10
4.6 Marcadores moleculares en guayaba y antecedentes	11
4.7 Limitantes de la obtención de ácidos nucleicos en guayaba	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Lugar de estudio y colectas	14
5.2 Caracterización morfológica	14
5.3 Extracción de ADN y verificación de calidad	16
5.4 Amplificación por PCR	16
5.4.1 Selección de oligonucleótidos	16
5.4.2 PCR	17
5.4.3 Análisis de datos	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.1 Análisis morfológico	19
6.2 Extracción de ADN y pruebas de amplificación con PCR	23
6.3. AMOVA de microsatélites	27
VII. CONCLUSIONES	33
VIII. LITERATURA CITADA	34
APÉNDICE	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características morfológicas evaluadas de las muestras recolectadas.	15
2	Características de los microsatélites a evaluar en la identificación de guayabo.	17
3	AMOVA de características morfológicas.	21
4	Comparativo de métodos de extracción por CTAB probados para guayaba.	24
5	Alelos observados de los microsatélites amplificados y sus respectivas frecuencias.	28
6	AMOVA de marcadores genéticos.	29
7	Matriz no sesgada de distancias genéticas calculadas por el método de Nei para las tres poblaciones estudiadas de guayaba.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología de hojas y frutos de guayaba.	19
2	Ejemplar de guayaba localizado en Zitácuaro, Michoacán.	20
3	Comparativo de varianza obtenido del AMOVA de morfología.	21
4	Dendrograma morfológico de similitud con todos los individuos muestreados.	22
5	Gel de prueba de la calidad de ADN extraído de guayaba mediante cuatro métodos distintos.	25
6	Prueba de viabilidad del ADN mediante PCR de un fragmento del gen de actina.	26
7	Prueba de gradientes para microsatélites de guayaba.	27
8	Comparativo de varianza obtenido del AMOVA de marcadores genéticos.	29
9	Dendrograma molecular de similitud con todos los individuos muestreados.	30

SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

msnm	Metros sobre el nivel del mar
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
SSR	Secuencia simple repetida (Microsatélites)
SSM	Slipped-strand mispairing
TBE	Tris-Borato-EDTA
PVP	Polivinil Pirrolidona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
AMOVA	Análisis de Variancia molecular
df	Grados de libertad
SC	Suma de cuadrados
CM	Media de cuadrados
Var. Est.	Estimación de la varianza
Kb	Kilo bases
μL	Micro litros
M	Molar
RPM	Revoluciones por minuto
mM	Mili molar
TE	Tris-EDTA
ITS	Secuencias espaciadoras de transcritos internas
IGS	Secuencias espaciadoras intergénicas

I. INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un frutal nativo tropical y subtropical de gran importancia económica comercial en 60 países entre los que se encuentran Brasil, Cuba, Costa Rica, la India, Puerto Rico, Venezuela y México debido al uso alimenticio del fruto en fresco y materia prima en la industria de jugos, néctares, helados, jaleas y dulces [1].

La guayaba en México tiene tres principales productores, el estado de Michoacán es el principal productor con un total de 147,286 toneladas producidas, seguidas de Aguascalientes con 94,845 toneladas y Zacatecas con 46,708 toneladas; con un total de 294 mil toneladas totales en el país. La superficie total sembrada en México en el año 2016 fue de 22 mil hectáreas con un rendimiento de 14.4 toneladas por hectárea. En el tema de la exportación solo el 4 % de la guayaba producida es exportada con un valor de 18,804,938, donde Estados Unidos y Canadá son los principales compradores de guayaba con un 99.3 % del volumen total exportado [2].

Los estados de Aguascalientes y Zacatecas se encuentra la región “Calvillo - Cañones” la cual comprende el municipio de Calvillo de Aguascalientes y Tabasco, Huanusco, Jalpa, Apozol y Juchipila del estado de Zacatecas se cultiva el 67 % del total del cultivo de guayaba [3]. Tan solo en Aguascalientes existen 3000 productores de guayaba, una actividad que genera cerca de 1.4 millones de jornales en la principal zona productora de guayaba en Aguascalientes [4].

Desde la importancia y crecimiento del cultivo de la fruta los agricultores han tenido un gran intercambio de ejemplares en la búsqueda de una mejor guayaba en México y por lo tanto ha generado gran variabilidad en la fruta incluso entre plantas del mismo huerto. Dentro de esta variabilidad se pueden encontrar diferentes características de sabor, calidad, consistencia, color, tamaño, forma, cantidad de semillas y cantidad de pulpa. Debido a la existencia de esta variabilidad se busca ligar las características morfológicas de la fruta con la genética del guayabo proveniente a pesar del posible paso de individuos entre regiones productoras y no resulte del carácter ambiental.

En el caso de la guayaba, conocer los genotipos ligados a las características físicas deseables para la exportación de la fruta, permitirá a los agricultores seleccionar los ejemplares de árboles de guayaba que concuerden con dicho ideotipo, incluso antes de plantarlos, lo que permitiría mejores variedades con mejores rendimientos y calidad de la fruta al productor influyendo en su ingreso económico y mejor fruta para el consumidor. En conjunto estos genotipos se podría dar una denominación de origen de la guayaba de manera que logra la clasificación de las diferentes guayabas existentes en las regiones, representando las mejores características morfológicas de cada región.

Las características morfológicas deseables de la fruta pueden ligarse con marcadores moleculares. Estos son segmentos de ADN representativos a nivel genómico los cuales son utilizados para distinguir entre individuos de una misma especie y ligar segmentos de ADN con características morfológicas deseables. Entre los marcadores más comunes destacan los RFLP, RAPD, AFLP y microsatélites [5], [6].

Se considera que estudios de microsatélites pueden contribuir a entender la diversidad genética de la guayaba en la región, a la conservación de germoplasma sobresaliente, permitir la selección de genotipos deseables y el cruzamiento de genotipos de guayaba de interés. Debido a la extensión del estudio y al uso de una técnica poco utilizado en México sería el primero en identificar germoplasma sobresaliente sobre el país.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar genéticamente individuos y poblaciones de guayabo mediante microsatélites para la identificación de procedencia de las regiones Aguascalientes, Zacatecas, y Michoacán.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar y comparar morfológica y molecularmente individuos de guayabo en las regiones de Aguascalientes, Zacatecas y Michoacán.
- Analizar polimorfismos dentro de las poblaciones por región y entre regiones.

III. HIPÓTESIS

Las guayabas cultivadas en los principales estados productores de México provienen de distintas regiones y, por lo tanto, presentan gran variabilidad entre y dentro de poblaciones.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Características generales del guayabo

La guayaba es una especie perteneciente a la familia *Myrtaceae*. Tiene un número de cromosomas básico o $n=11$, sin embargo, tiene variación citológica alta en las que se registran formas diploides, triploides, tetraploides y aneuploides, las variedades comerciales se reportan como diploides o $2n = 22$ y algunos triploides sugeridos como autotriploides de guayaba sin semilla [7]. El árbol de guayaba puede llegar a medir de 5 a 10 metros de altura, sus hojas se dan en forma decusadas simples o pares alternos, sus formas son oblanceoladas, oblongas o elípticas, color verde brillante a parduscas, además tienen vellosidades finas y suaves por ambos lados. El tronco es torcido y ramificado, tiene una corteza externa en forma de escamas lisas color pardo rojiza y escamas grisáceas, una corteza interna fibrosa, amarga y color crema rosada o pardo rosada y tiene ramas gruesas y retorcidas [7]. Con respecto al fruto pueden ser globosas a ovoides, carnosas, de color rosa a amarillo crema, su sabor puede ser de dulce a muy ácidas, cáliz persistente en el ápice y con un tamaño que puede llegar a medir hasta 80 cm de diámetro [7].

La especie *P. guajava* ha sido ampliamente reconocida por diversos autores como una fuente rica de metabolitos secundarios. Las hojas contienen gran cantidad de metabolitos secundarios, como antioxidantes, polisacáridos, polifenoles y compuestos volátiles los cuales se les ha detectado como mecanismos de defensa de la planta ante agentes externos y contra el estrés oxidativos de la planta [8 – 10].

4.2 Condiciones de cultivo y reproducción

El crecimiento del árbol de guayaba se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm), con temperaturas de 16 ° y 34 °C, con una humedad relativa de 36 a 96 % y con una precipitación anual entre 1000 y 1800 mm de lluvia, además es resistente a la salinidad soportando un pH de 4.5 a 8.2 con un óptimo de 6.0 a 7.0, periodos de sequía de 6 meses y tiene un crecimiento en suelos arenosos y arcillosos con buena fertilidad y profundidad de suelo [11].

En cuanto a su forma de reproducción, la multiplicación de la guayaba se da de manera sexual y asexual. El método mediante semilla es poco aprovechado por los productores debido que es un proceso lento, que genera variabilidad e implica periodos largos de germinación[12] lo cual resulta poco atractivo para fines comerciales. La reproducción asexual por su parte, se realiza mediante estacas, acodos, injertos o mediante técnicas de reproducción *in vitro*, y permite obtener individuos idénticos, libres de patógenos y además, resistentes a nematodos como en el caso de injertos seleccionados [12, 13]. La multiplicación *in vitro* permite obtener una multiplicación rápida de la guayaba en forma de clones y es un método que actualmente se está explorando [14].

4.3 Importancia económica de la guayaba en México

El guayabo es un cultivo de gran importancia en México, ya que prospera en casi toda la república, principalmente en la región “Calvillo-Cañones” perteneciente a los estados de Aguascalientes y Zacatecas. En el 2016 se registró una producción de 140

mil toneladas entre ambos estados conjuntamente con el estado de Michoacán. Actualmente este último estado es el mayor productor de guayaba concentrando la producción en los municipios de Jungapeo, con 44 mil 550 toneladas; Benito Juárez, 33 mil toneladas, y Zitácuaro, 28 mil 55 toneladas con un total de 147 mil 286 toneladas. Este fruto se produce en huertas comerciales, huertos familiares y de traspatio; sus principales variedades son conocidas como criolla, china y media china [15, 16].

4.4 Marcadores morfológicos

Entre los aspectos morfológicos se buscan aquellas características fácilmente identificables y tienen suficiente estabilidad bajo diferentes condiciones ambientales sin afectar su expresión, de esta manera es posible identificar entre individuos de la misma especie [17]. En el caso de la guayaba, existen descriptores morfológicos descritos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) que ayudan a identificar las diferentes variaciones del descriptor morfológico en hojas, tronco, flores, fruto y semilla, además dirige la manera de realizar las evaluaciones de las plantas [18].

4.5 Marcadores moleculares

Un marcador molecular está definido como un segmento de ADN con características únicas o particulares a nivel genómico. Un marcador ideal tiene entre sus características deseables ser polimórfico, independiente, con resultados confiables, fáciles de interpretar, rápidos y de bajo costo, poder ligar características fenotípicas con *loci* dentro de un cromosoma o marcaje de genes, construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de mapeo comparativo [5, 7]. Entre los

marcadores mas comunes destacan los RFLP, RAPD, AFLP, microsatélites, entre otros; los cuales han sido utilizados tanto en animales como en plantas para distinguir individuos, para encontrar genes y determinar el genoma deseable para el cruzamiento de cultivos de forma más específica comparadas con otras técnicas como los estudios taxonómicos y fenotípicos [6, 19, 20].

El primer marcador descubierto fue el RFLP o fragmentos de restricción de longitud polimórfica son un tipo de marcador que permite diferenciar dos organismos por análisis derivada de la escisión del ADN por enzimas endonucleasas de restricción haciendo que la longitud de los fragmentos difiera entre organismos según el sitio reconocido por la enzima gracias al cambio, inserción o eliminación de una sola base. Una vez corrido el gel de electroforesis se realiza una hibridación mediante la técnica Southern blot. Comparado con los microsatélites, este marcador molecular resulta altamente costoso y laborioso, además que necesita de radioactividad, lo cual es costoso de realizar y por último es necesario alto contenido de ADN genómico inicial y de buena calidad [6, 20].

Otro tipo de marcador molecular lo constituyen los RAPD o amplificación aleatoria de ADN polimórfico, los cuales son segmentos amplificados por un primer arbitrario o sin especificidad con un tamaño de 10 pares de bases con una secuencia aleatoria que detecta secuencia de nucleótidos en ADN polimórfico. Este marcador es ampliamente usado, debido a que es una técnica fácil y rápida de realizar. Entre sus principales desventajas se encuentra la baja reproducibilidad y al ser un marcador dominante es imposible distinguir entre homocigotos de heterocigotos [6, 20].

Los AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) por su parte, son otro tipo de marcador molecular dominante considerado como un intermedio entre

RFLP y PCR donde se hace una amplificación selectiva de fragmentos de ADN. En esta técnica, el ADN genómico es digerido inicialmente por endonucleasas; luego son ligados a adaptadores o secuencias de reconocimiento, de manera que se obtienen diferencias de tamaño entre los fragmentos amplificados. Es necesario que el ADN extraído sea purificado y de alto peso molecular. Se trata de una técnica difícil y de alto costo por el uso de enzimas de restricción y la necesidad de tinción, radioactividad o fluorescencia del gel de poliacrilamida [6, 20].

4.5.1 Los microsatélites o SSR

Los microsatélites también conocidos como secuencias simples repetidas o SSR se conocen por ser una secuencia donde una o más bases son repetidas en tándem con un tamaño de 1 a 6 pares de bases ubicados a lo largo del genoma [21]. Las secuencias repetidas son conocidas como repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos según el número de nucleótidos que lo conforman, un ejemplo de microsatélites es el dinucleótido repetido es la repetición $(CA)_n$, se tiene la preferencia a microsatélites que amplifiquen trinucleótidos y tetranucleótidos sobre los dinucleótidos por la formación de bandas tartamudas de esta última, las “bandas tartamudas” tratan de productos de PCR que son uno o dos nucleótidos más cortas o largas comparadas con el producto completo, sin embargo las repeticiones de dinucleótidos ocurren de manera frecuente con respecto a los trinucleótidos y tetranucleótidos [20].

Las regiones repetidas en el genoma son de alta probabilidad de mutación por el deslizamiento de cadena y apareamiento erróneo entre repeticiones (SSM, ***slipped strand mispairing***) resultando en la ganancia o pérdida de las unidades repetidas producidas durante la síntesis de ADN [20]. Se estima que la frecuencia de mutación

se encuentra en 10^{-2} y 10^{-4} por generación [19]. Son marcadores moleculares con alto rendimiento de salida de datos para caracterización y diversidad genética de las especies, especialmente en plantas de manera que facilitan el desarrollo de cultivos [19] y son usados particularmente para los análisis poblacionales de manera rápida y simple [5].

4.6 Marcadores moleculares en guayaba y antecedentes

El estudio de la diversidad genética de la guayaba ha sido tema de interés a nivel nacional e internacional. Se han realizado diversos estudios con marcadores moleculares con propósitos de establecer huellas de ADN de individuos, evaluación de la diversidad genética, construir mapas de ligamiento e identificar genes con valor económico. Para ello se han utilizado marcadores tales como AFLP, RAPD, RFLP, microsatélites y otros. De igual forma se ha incursionado en otras técnicas más recientes para la identificación de genotipos como el uso de la región 18S del ARN ribosomal de ITS y regiones IGS de ADN cloroplástico [7, 22–26].

En México se han realizado diversos estudios sobre la diversidad de guayaba utilizando tanto marcadores morfológicos como moleculares. Entre ellos destaca la caracterización morfológica de genotipos de la región Calvillo – Cañones [3], la caracterización morfológica y molecular mediante RAPD en Calvillo, Aguascalientes [22, 23, 25] y el estudio molecular mediante RAPD en el estado de Nayarit [27].

En el caso particular de los microsatélites, se ha desarrollado una biblioteca de primers con secuencias repetidas de $(GA)_n$ y $(GT)_n$ por diferentes autores, que ha servido en estudios genéticos y de selección. Risterucci y colaboradores fueron los primeros en aislar microsatélites de guayaba, además de probar su uso en especies

cercanas como *P. acutangulum*, *P. cattleianum* var. *lucidum* y *P. friedrichsthalianum* [28].

La biblioteca mencionada en el párrafo anterior fue utilizada por otros autores en un estudio de guayabas de diferentes partes del mundo tales como Cuba y Hawái encontrándose patrones de confiabilidad de los SSR dentro de la especie como de otros representantes de la familia. Entre los usos de la biblioteca se encuentra la identificación de genotipos, análisis de pedigrí, estudios de diversidad de germoplasma y de mapeo genético. Estos microsatélites han demostrado ser altamente confiables y reproducibles, además de ser altamente recomendables para su uso en mapas de ligamiento genético en conjunto con AFLP [7]. Además de lograr la distinción de individuos, estos trabajos coinciden que existe alta cantidad de homocigocidad lo que indica que la diversidad de la guayaba es reducida, esto posiblemente este dado por la capacidad de autopolinización. Sería necesario un trabajo de polinización cruzada para aumentar la diversidad genética [26, 29].

Otros autores reportan que los microsatélites han servido además para la identificación de plantas del género *Psidium*, transferir microsatélites de guayaba a otros del mismo género o en estudios taxonómicos, biología molecular, evolución genómica y el entendimiento de especies silvestres [26, 30].

Las ventajas que presenta este marcador es su codominancia regido por la dominancia de los alelos por herencia Mendeliana, alta distribución y abundancia en el genoma de eucariotas con preferencia a regiones de baja transcripción y que, como se describió anteriormente, tienden a altas tasas de polimorfismos por lo que se logra una alta discriminación de los individuos analizados. De ahí que la técnica de microsatélites sea hoy popular en programas de cruzamiento genético en plantas [6,

19, 20]. En el caso de la guayaba, este marcador además de permitir evaluar las huellas genéticas y determinar la diversidad entre y dentro de poblaciones, permitirá la conservación de colecciones del germoplasma, y la selección de plantas para programas de cruzamiento [24, 26, 29, 31].

4.7 Limitantes de la obtención de ácidos nucleicos en guayaba

Varios trabajos describen que el uso de la técnica de extracción basada en CTAB [32] es efectiva para la extracción de ADN de plantas. Sin embargo, las hojas de guayaba al igual a las de otras especies tales como mango (*Mangifera indica* L.) [33], *Passiflora foetida* [34] y manglares [35], contienen altos niveles de polisacáridos, polifenoles, proteínas, taninos y otros metabolitos secundarios. La presencia de estos componentes como impurezas en ADN extraído son los principales factores que generan la inhibición de técnicas de amplificación. Estos componentes se encuentran normalmente en el citoplasma y entran en contacto con otros durante la disrupción celular [33–35].

Lo anterior ha sido un problema común al que se han enfrentado otros autores que coinciden que aún con variantes en este método, el ADN obtenido de muestras de guayaba contiene residuos que inhiben la amplificación por PCR y por lo tanto no generan los resultados deseados. Para deshacerse de estos residuos, las muestras han tenido que pasarse por columnas NucleoSpin® que auxilian en la limpieza de los ácidos nucleicos, concluyendo que interfieren las altas cantidades de polisacáridos presentes en los tejidos [36].

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de estudio y colectas

Este estudio incluyó ejemplares de guayabo provenientes de huertos de guayaba de los estados de Aguascalientes, Michoacán y Zacatecas. La toma de muestras se llevó a cabo en los huertos productores de guayaba de las regiones de Calvillo – Cañones (Aguascalientes y Zacatecas), y en los municipios de Uruapan, Benito Juárez y Zitácuaro en Michoacán. Para la selección de árboles de guayaba para muestreo se realizó de manera aleatoria con un total de 50 árboles de las regiones de Aguascalientes, Zacatecas y 60 de las regiones de Michoacán, se localizó geográficamente cada uno de los árboles muestreados (latitud y longitud geográfica). Todas las muestras recolectadas se conservaron a -20 °C, un duplicado se almacenó en etanol 96 % [37].

El análisis de muestras se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes ubicado en el km 18 de la carretera Aguascalientes - San Luis Potosí.

5.2 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se tomaron en cuenta propiedades de la hoja y fruto propuestas por la UPOV [18] resumidas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características morfológicas evaluadas de las muestras recolectadas.

Características	Clasificación fenotipo
Proporción longitud/anchura de la hoja completamente desarrollada	Alto, mediano o bajo
Forma de la hoja completamente desarrollada	Redonda, ovalada, obovada, lanceolada, oblanceolada u oblonga
Color de la hoja completamente desarrollada	Verde amarillo, verde gris, verde o verde oscuro
Curvatura transversal de la hoja completamente desarrollada	Débil, medio o fuerte
Presencia de torcimiento de la hoja completamente desarrollada	Presencia o ausencia
Curvatura de la nervadura central de la hoja completamente desarrollada	Presencia o ausencia
Forma de la base de la hoja completamente desarrollada	Redondeada, obtusa o cordada
Forma de la punta de la hoja completamente desarrollada	Atenuada, apiculada, aguda, obtusa o redondeada
Proporción longitud/anchura del fruto	Alto, mediano o bajo
Forma del fruto en el extremo del tallo	Ampliamente redondeado, redondeado, truncado, puntiagudo o con cuello
Color de la piel del fruto	Amarillo claro verdoso, amarillo claro, amarillo oscuro, anaranjado, anaranjado verdoso, verde oscuro o rojo
Sensación de la piel del fruto	Liso, áspero o rugoso
Diámetro de la cavidad del cáliz en relación con la fruta	Pequeño, mediano o grande
Color de la pulpa del fruto	Blanco, crema, rosa cremoso, rosa, rosa fuerte, naranja rosa o naranja
Proporción núcleo/pulpa	Muy pequeño, pequeño, mediano, grande o muy grande

Características tomadas de la UPOV [18]

5.3 Extracción de ADN y verificación de calidad

La extracción de ADN genómico a partir de hojas almacenadas y conservadas en alcohol fueron secadas sobre papel absorbente antes de procesarlas. Se partió de 0.2 a 0.3 gramos de hojas de cada muestra. Las cuales fueron cortadas en pequeños pedazos y molidas utilizando mortero y nitrógeno líquido. Posteriormente, la extracción se realizó con el método de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) con cuatro diferentes protocolos (Cuadro 4) para revisar su eficiencia en la extracción. Para determinar la integridad del ADN se realizaron geles de agarosa a 0.7 % en buffer TBE 1x comparado con una “escalera” de 1 Kb, la tinción se realizó con bromuro de etidio y la observación bajo luz UV se llevó a cabo en un transiluminador Benchtop UV. La calidad del ADN extraído se verificó mediante amplificaciones por PCR utilizando primers para un fragmento del gen constitutivo de actina.

5.4 Amplificación por PCR

5.4.1 Selección de primers

Se seleccionaron cuatro pares de primers de la biblioteca de guayaba descritos en el Cuadro 2, los cuales fueron utilizados en otros trabajos de caracterización genética de guayaba por su alto número de alelos polimórficos. Para probar la mejor eficiencia de temperatura para se estableció un gradiente de temperatura para apareamiento de los primers en el rango de 53 a 56 °C, el cual fue definido por Tm Calculator de Thermo Scientific

Cuadro 2. Características de los microsatélites a evaluar en la identificación de guayabo.

Primers	Secuencia del primer directo	Secuencia del primer reversa	Secuencia repetida	No. de alelos	Tamaño del fragmento amplificado
mPgCIR05	GCCTTTGAA CCACATC	TCAATACGATA CAGCGAACT	(GA) ₃₁	5	244
mPgCIR10	GTTGGCTCT TATTTTGGT	GCCCCATATC TAGGAAG	(CT) ₁₂	5	261
mPgCIR16	AATACCAGC AACACCAA	CATCCGTCTC TAAACCTC	(TC) ₂₅	7	268
mPgCIR19	AAAATCCTG AAGACGAAC	TATCAGAGGC TTGCATTA	(CT) ₁₆	5	274

5.4.2 PCR

La amplificación de microsatélites se ejecutó en base al protocolo de GoTaq® Green Master Mix (Promega), donde se añadieron 4 µl GoTaq® Green Master Mix 2x, 0.5 µl de cada primer con concentración de 10 µM (concentración final de 500 nM) y 1 µl de ADN con un volumen final de 10 µL. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C por 4 minutos, treinta y cinco ciclos con una desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, apareamiento de 55 °C por 60 segundos y elongación de 72 °C por 60 segundos; finalizando con una elongación de 72 °C por 8 minutos [28, 29]. La temperatura de apareamiento se determinó para cada par de primer mediante un gradiente de temperaturas. Los productos de la PCR se corrieron en geles de poliacrilamida (PAGE) 6 % con buffer TBE 1x a 120V.

5.4.3 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó mediante el registro de la presencia o ausencia de bandas en los geles [28, 29]. Los datos obtenidos de la electroforesis se recolectaron en una hoja de Excel seguido de la elaboración de un análisis AMOVA con ayuda del paquete estadístico GENAEx6.502 [38] para Excel 2013 y la realización de un árbol filogenético por el algoritmo UPGMA e índice de similitud de Bray-Curtis con ayuda del paquete Past3 [39].

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis morfológico

Durante las colectas se capturaron imágenes del sitio de ubicación de los árboles donde se tomaron las muestras. En el Cuadro 1 y Figura 1 se muestran las características encontradas en hojas y frutos. También se tomó la geolocalización del árbol por medio de la foto con el Photo Info Check® para Iphone® (Figura 2).

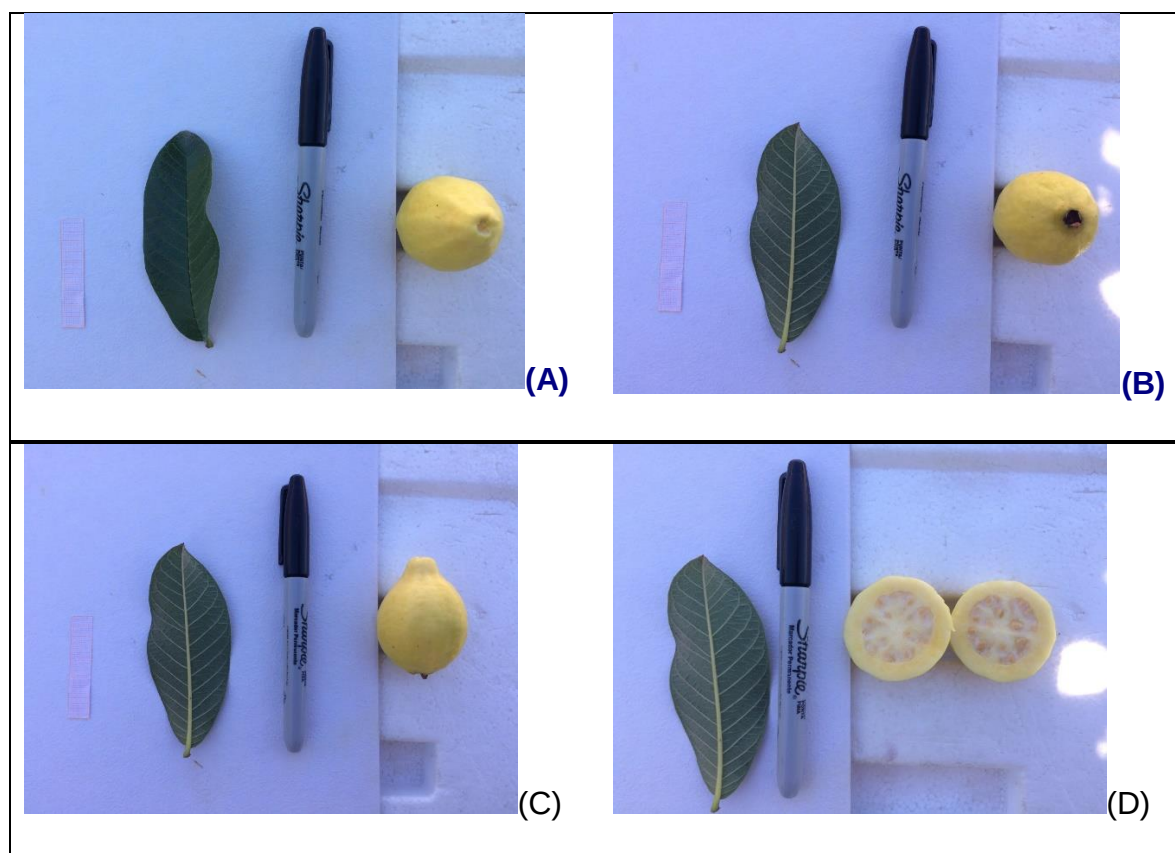


Figura 1. Morfología de hojas y frutos de guayaba. (A) parte adaxial de la hoja y la fruta en el extremo del tallo, (B) parte abaxial de la hoja y el cáliz del fruto, (C) forma del fruto de forma lateral y (D) fruto cortado a la mitad para observar las características internas. En todos los casos se usó un marcador y papel milimétrico como referencia.



Figura 2. Ejemplar de guayaba localizado en Zitácuaro, Michoacán
Geolocalización: 19°23'07.8"N, 100°23'51.6"W.

Una vez tomadas las fotos se realizó un condensado de la localización del árbol y sus características morfológicas como se muestra en los Cuadros A1, A2 y A3 del Apéndice A. De esta manera los datos fueron fácilmente rastreables e identificables para cada análisis previsto para este trabajo.

En cada sitio de colecta se registraron datos morfológicos de los frutos y hojas, los cuales fueron analizados mediante AMOVA. Dentro de los resultados, se obtuvo que la variación entre las poblaciones es de un 6 %; con respecto a la variación dentro de poblaciones es del 94 % (Cuadro 3 y Figura 3). El dendrograma morfológico (Figura 4) da una similitud desde un 65 % hasta un 100 % y se puede observar la inexistencia de grupos definidos. Estos resultados son similares a trabajos hechos en Calvillo,

Aguascalientes donde obtuvieron un rango de similitud del 87 a 100 % [23, 40]; sin embargo, existen dos grupos grandes a nivel de 78 % de similitud. Se puede destacar que el resultado de las regiones con mayor variabilidad fueron Aguascalientes y Zacatecas con un rango del 65 a 100 %. Este resultado indica que no existe una variación significativa entre las poblaciones de guayaba lo cual coincide con los resultados de Shaili en India [41]. Además, en los trabajos de Kherwar sobre *P. guajava* destaca la distinción entre especies silvestres, comerciales y nuevas colecciones generadas, sin embargo no diferenció entre pulpas del fruto dentro de las especies comerciales [42].

Cuadro 3. AMOVA de características morfológicas.

Fuente	gl	SC	CM	Var. Est.	%
Entre poblaciones	2	16.317	8.159	0.119	6 %
Dentro de poblaciones	157	285.877	1.821	1.821	94 %
Total	159	302.194		1.940	100 %

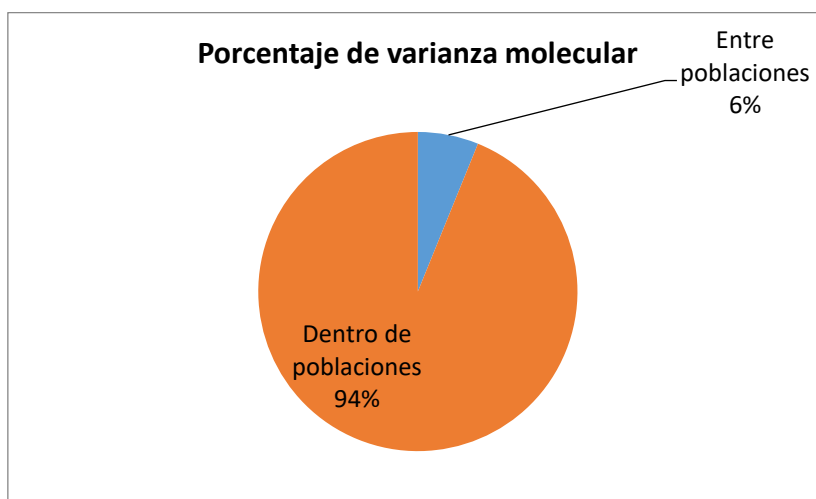


Figura 3. Comparativo de varianza obtenido del AMOVA de morfología.

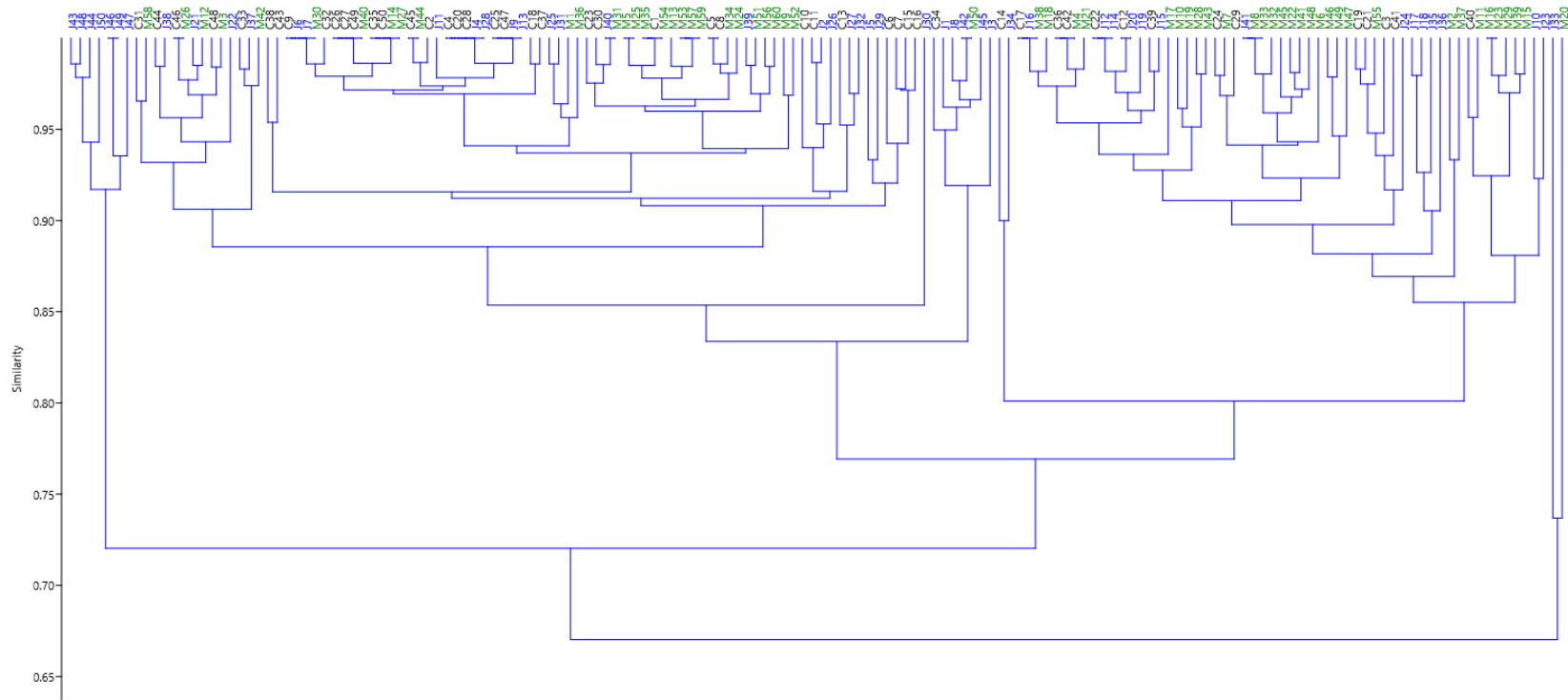


Figura 4. Dendrograma morfológico de similitud con todos los individuos muestreados.

6.2 Extracción de ADN y pruebas de amplificación con PCR

De los cuatro métodos probados se eligió aquel que tuviera una mejor repetitividad tanto en la extracción como en la amplificación del fragmento de interés. Con todos los métodos se logró extraer buena cantidad de ADN, exceptuando con el método de Sahu [35] pues apenas se pudo observar tenues bandas en el gel. El método de Uddin [33] con y sin RNasa fue el que presentó mayor repetitividad, ya que se logró extraer eficientemente el ADN, comparado con el resto de los métodos que fallaron en algunas extracciones (Figura 5).

Cuadro 4. Comparativo de métodos de extracción por CTAB probados para guayaba.*

Método	Uddin y colaboradores [33]	Sahu y colaboradores [35]	Lade y colaboradores [34]	Muñoz [40]
Planta usada	<i>Mangifera indica</i>	<i>Manglares y plantas halofitas</i>	<i>Passiflora foetida</i>	<i>Psidium guajava</i>
CTAB	2 %	2 %	2 %	3 %
PVP	3 %	250 mg al moler	1 %	2 %
B - Mercaptoetanol	0.2 % y 0.15 %	0.2 % y 1 %	-	2 %
Temperatura de incubación	65 °C	60 °C	65 a 70 °C	-
Tiempo de incubación	1 hora	40 minutos	1 hora	-
Tiempo de precipitación	1 hora	1 hora	30 minutos	10 minutos
Agentes de precipitación	Acetato de sodio con etanol 100 % y etanol 70 %	Isopropanol y etanol 70 %	Acetato de sodio con isopropanol y etanol 70 %	Isopropanol y etanol 70 %
Eliminación de proteínas	-	-	Proteinasa K**	Fenol***
Número de extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico	3 o hasta que el sobrenadante se observe transparente	2 veces	1 vez	2 veces

*Todas las moliendas se hicieron con nitrógeno líquido

**Se omitió el paso de Proteinasa K

***Puede o no usarse

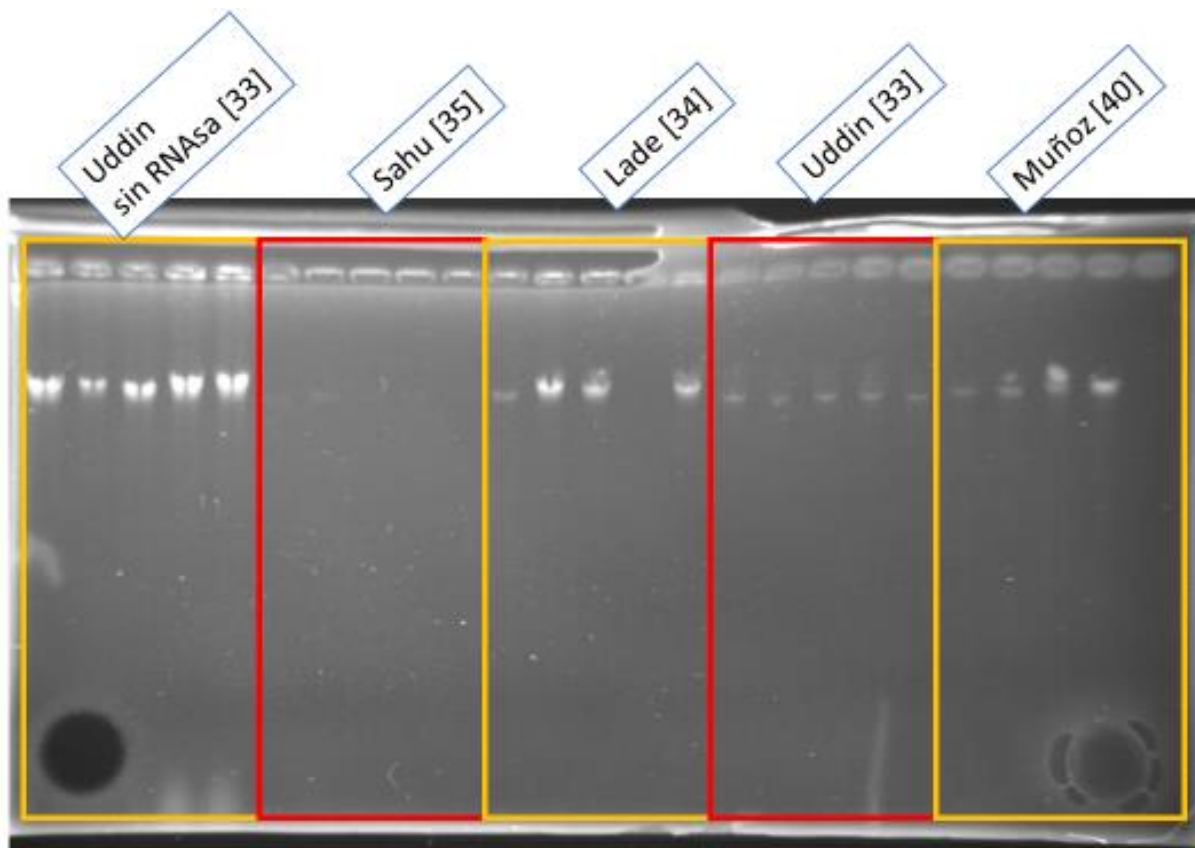


Figura 5. Gel de prueba de la calidad de ADN extraído de guayaba mediante cuatro métodos distintos.

En la amplificación de las muestras se observa que los métodos de Sahu [35], Lade [34] y Uddin [33] con y sin RNasa permitieron la amplificación, sin embargo, se obtiene mejor resolución de la amplificación en el método de Uddin [33] con RNasa. El resultado se puede comparar con el del control positivo (ADN extraído de Calabacilla loca *Cucurbita foetidissima*) (Figura 6). Esto confirma que el método antes mencionado es efectivo, ya que logra reducir los contaminantes durante la extracción de ADN.

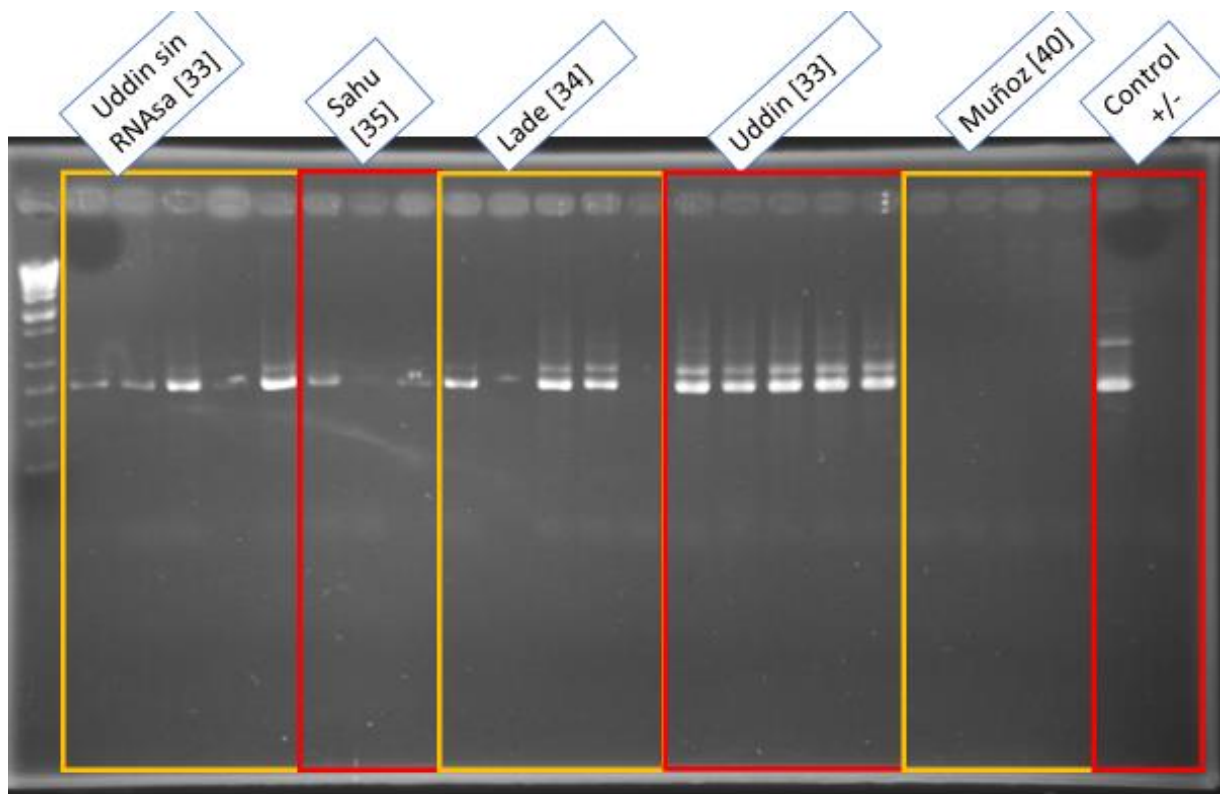


Figura 6. Prueba de viabilidad del ADN mediante PCR de un fragmento del gen de actina.

Una vez probada la calidad del ADN para amplificación, este fue usado para estandarizar las condiciones de PCR de los primers para microsatélites (Figura 7). En esta imagen se puede observar una buena amplificación de los microsatélites mPgCIR10, mPgCIR16 y mPgCIR19 en cualquiera de las temperaturas (53 - 56 °C). A partir de esto, se eligió la temperatura de 55 °C siguiendo el programa de Risterucci [28]. Sin embargo, con el microsatélite mPgCIR05 se obtuvieron resultados poco visibles, a pesar de utilizar diferentes temperaturas de alineamiento, por lo que se decidió descartarlo.

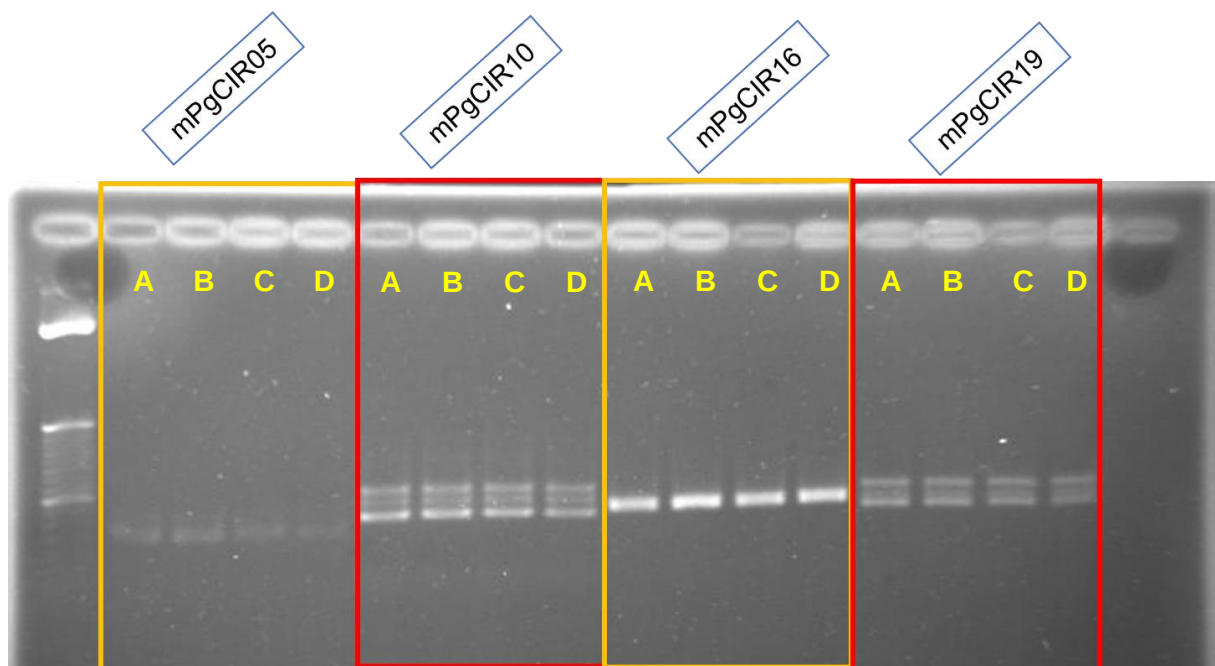


Figura 7. Prueba de gradientes para microsatélites de guayaba. A. 53 °C; B. 54 °C; C. 55 °C; D. 56 °C.

6.3 AMOVA de microsatélites

Una vez realizadas las amplificaciones de las muestras de ADN con los primers mPgCIR10, mPgCIR16 y mPgCIR19 (Apéndice D y Apéndice E) se obtuvieron datos para la revisión de la frecuencia de los alelos, siendo el alelo 11 el más común y el alelo 4 el más raro en aparición (Cuadro 5).

Cuadro 5. Alelos observados de los microsatélites amplificados y sus respectivas frecuencias.

Locus	Presencia de alelo	Ausencia de alelo	Frecuencia de la presencia de alelo	Frecuencia de la ausencia de alelo
Locus 1	0.775	0.225	0.525658351	0.474341649
Locus 2	0.19375	0.80625	0.10208575	0.89791425
Locus 3	0.80625	0.19375	0.559829578	0.440170422
Locus 4	0.1875	0.8125	0.098612181	0.901387819
Locus 5	0.96875	0.03125	0.823223305	0.176776695
Locus 6	0.95625	0.04375	0.790834993	0.209165007
Locus 7	0.98125	0.01875	0.863069361	0.136930639
Locus 8	0.19375	0.80625	0.10208575	0.89791425
Locus 9	0.975	0.025	0.841886117	0.158113883
Locus 10	0.975	0.025	0.841886117	0.158113883
Locus 11	0.99375	0.00625	0.920943058	0.079056942

En el dendrograma molecular (Figura 9) una gran parte de los individuos comparte un 75 % de similitud. Aproximadamente tres cuartas partes de la población son similares entre sí en un 100 %. Sólo un par de individuos presentaron una similitud de sólo el 30 % con el resto de la población. Todo lo anterior se refleja en la distancia genética de las poblaciones no mayor al 0.017 (Cuadro 7). El AMOVA de microsatélites muestra que la variación dentro de poblaciones es del 100 % (Cuadro 6), lo cual concuerda con la poca distancia observada en las comparaciones pareadas entre poblaciones de la matriz de distancia (Cuadro 7) y cercanamente coincide con el AMOVA morfológico que presentó un 94 % de variación dentro de poblaciones. La presencia de un 6 % de variación entre poblaciones considerando los caracteres morfológicos puede deberse a la influencia del clima y suelo pues en la región Calvillo-Cañones se tiene un suelo arcilloso a diferencia de los terrenos de Michoacán y los

árboles de Calvillo se encuentran a una altura promedio de 1700 msnm, comparado con Michoacán que algunos árboles se localizan a 800 msnm (Cuadro 6 y Figura 8). Estos resultados coinciden con trabajos anteriores de caracterización mediante RAPD donde distinguieron 26 genotipos de la zona productora de Calvillo los cuales tienen un rango de 30 a 100 % y de 25 a 100 % [23, 40].

Cuadro 6. AMOVA de marcadores genéticos.

Fuente	gl	SC	CM	Var. Est.	%
Entre poblaciones	2	1.208	0.604	0.000	0 %
Dentro de poblaciones	157	149.323	0.951	0.951	100 %
Total	159	150.531		0.951	100 %

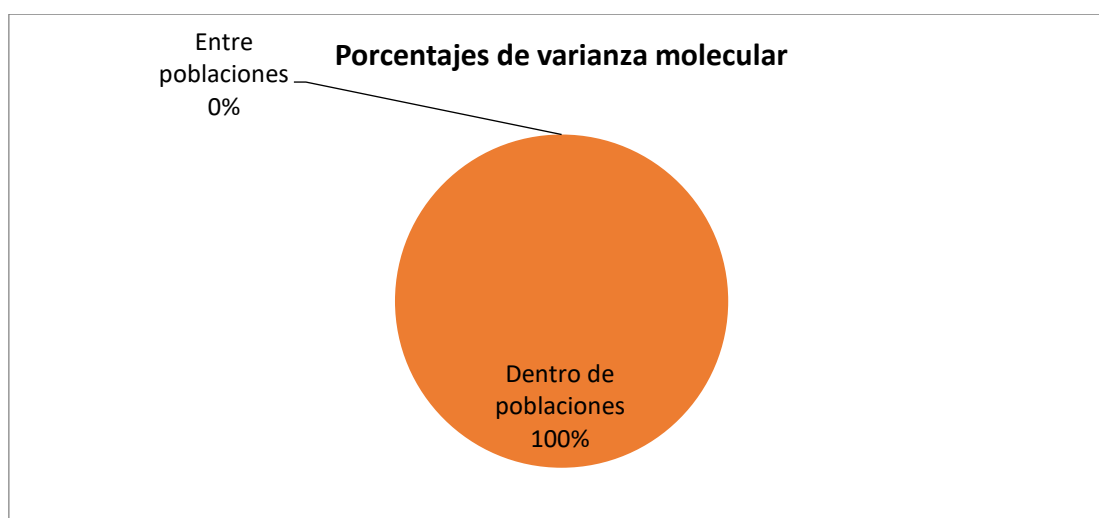


Figura 8. Comparativo de varianza obtenido del AMOVA de marcadores genéticos.

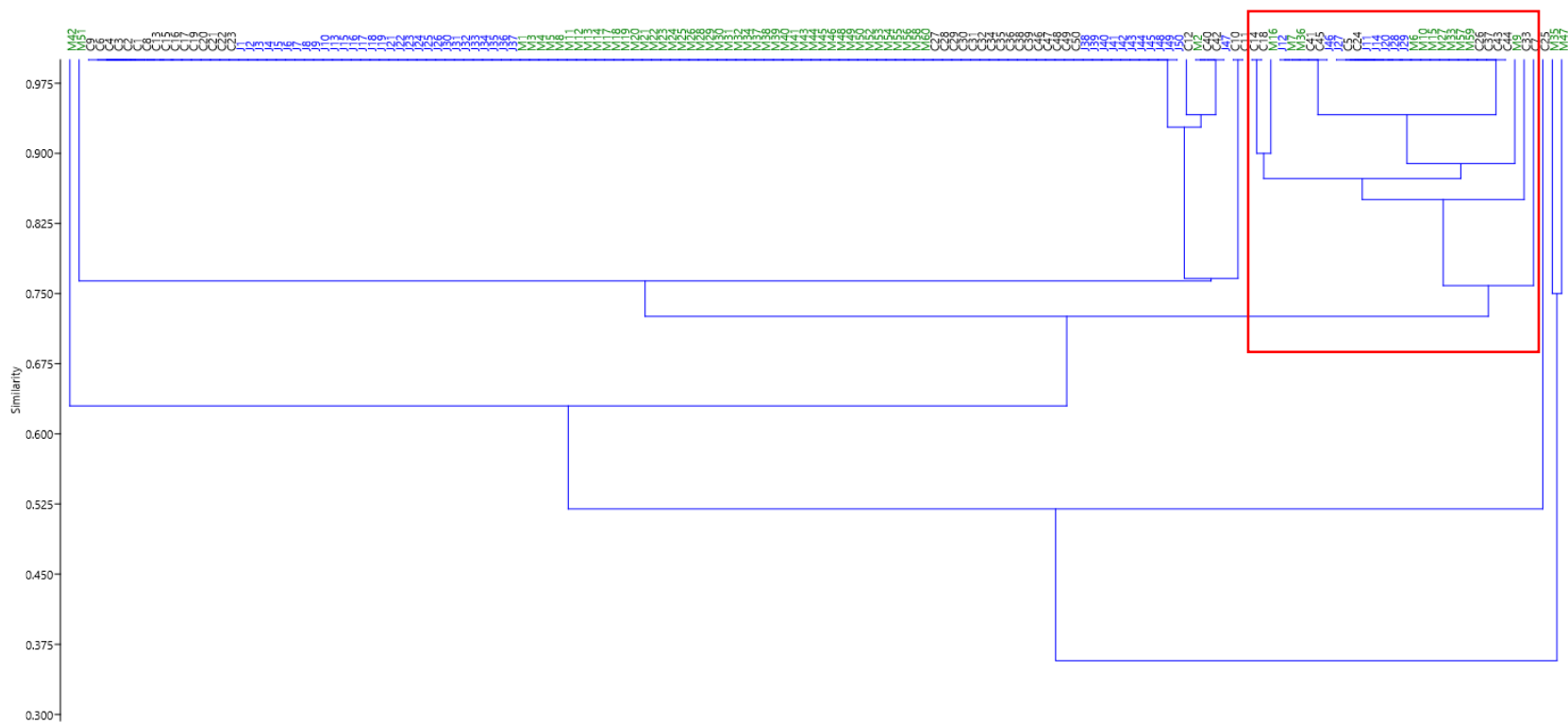


Figura 9. Dendrograma molecular de similitud con todos los individuos muestreados.

En la matriz de distancias genéticas (Cuadro 7) se puede observar que la población de mayor distancia genética se encontró entre las regiones de Aguascalientes y Michoacán con 0.017 y las poblaciones con menor distancia genética son las de Zacatecas y Michoacán con 0.001, a pesar de que geográficamente, se encuentran lejanas entre sí. En un punto medio se encuentran las poblaciones de Aguascalientes y Zacatecas que son vecinas y tienen una distancia genética de 0.008.

Cuadro 7. Matriz no sesgada de distancias genéticas calculadas por el método de Nei para las tres poblaciones estudiadas de guayaba.

Aguascalientes	Zacatecas	Michoacán	
0.000			Aguascalientes
0.008	0.000		Zacatecas
0.017	0.001	0.000	Michoacán

La poca variabilidad genética entre individuos encontrada en este estudio es posiblemente debida a los altos niveles de homocigocidad. Este resultado podría ser diferente si como en el estudio de Valdés Infante, se logró diferenciar entre dos cultivos en Cuba con AFLP; lo que hace a este último método un auxiliar a ser usado de forma complementaria ante la alta similitud entre los individuos [29]. Asumiendo la baja diversidad observada en este estudio, se hipotetiza que pueden aparecer enfermedades y reducción del rendimiento del fruto en el futuro; por lo que se propone una mejora del germoplasma a través de la polinización cruzada controlada o por introducción de individuos de otros países, para aumentar la diversidad genética [26].

A la vez, la poca diferenciación molecular de los individuos puede deberse a la selección de nuestros primers de microsatélites, ya que aunque se tratan de primers

comprobados con alta detección de heterocigocidad en varias referencias, existen pocos estudios de microsatélites en México. Diferentes trabajos en otros países han logrado una distinción completa entre individuos a través de los microsatélites seleccionados, demostrando que es posible separar, inclusive, a individuos dentro de poblaciones [26, 29, 41, 42].

VI. CONCLUSIONES

En esta investigación, realizada en árboles de guayaba provenientes de tres regiones de México se logró la caracterización genética y la detección de polimorfismos a través de características morfológicas y microsatélites. Los resultados coinciden en que los individuos tienen niveles de variación muy reducidos e incluso nulos, los cuales hacen difícil la detección de familias entre los estados productores. Por lo tanto, es necesario realizar una investigación más profunda para lograr una distinción apropiada.

Debido a que la variación entre poblaciones fue considerablemente baja, tanto en el análisis morfológico, como en el molecular, se concluye que el flujo genético entre los huertos de los diferentes estados ocurrió hace apenas unas pocas décadas, sobre todo por la muy baja variación entre poblaciones. Esto es evidencia de que se trata de una población similar de guayabas entre los principales estados productores.

Debido a la poca distancia genética entre individuos que se encontró durante la investigación, se propone la necesidad de trabajos de mejoramiento genético, ya que los individuos presentaron alta similitud. Esto propicia que se presenten enfermedades, plagas, e incluso la baja sobrevivencia de la población, por ello es necesario el aumento del reservorio de germoplasma de especies nativas de guayaba o provenientes de otros sitios.

VII. LITERATURA CITADA

1. Pérez-Pelea, L., A. Sigarrosa-González, E. Bandera-Fernández, N. N. Rodríguez-Medina, M. T. Cornide y J. E. Sánchez-García. (2016). Caracterización de la diversidad genética en tres poblaciones de guayabo (*Psidium guajava* L.). Cultivos Tropicales, 37:115–126.
2. SIAP, Servicio de información agroalimentaria y pesquera. (2017). Atlas Agroalimentario 2017. México. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/descargar/2017/Atlas-Agroalimentario-2017
3. Mercado-Silva, E., S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez. (2002). Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 25:393–399.
4. Gallegos-Morales, G., M. Cepeda-Siller, F. D. Hernández-Castillo, A. M. Acosta-Z., R. Velásquez-Valle, E. González-Gaona y J. M. Sánchez-Yáñez. (2009). Microorganismos benéficos asociados a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, Aguascalientes, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 27:106–112.
5. Singh, G. (2014). Molecular characterization in fruit crops—A review. International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.742.2522&rep=rep1&type=pdf>
6. Kumar, P., V. K. Gupta, A. K. Misra, D. R. Modi y B. K. Pandey. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics 2:141-162.
7. Fernández, E. B. y L. Pérez-Pelea. (2016). Revisión bibliográfica. Mejoramiento genético de guayabo (*Psidium guajava* L.). Cultivos Tropicales, 36:96–110.
8. Kim, S.Y., E.A. Kim, Y.-S. Kim, S.K. Yu, C. Choi, J.S. Lee, Y.T. Kim, Jae-Woon Nah y You-Jin Jeon. (2016). Protective effects of polysaccharides from *Psidium*

- guajava* leaves against oxidative stresses. International Journal of Biological Macromolecules, 91:804–811.
9. Kim, S.H., S.K. Cho, S.H. Hyun, H.E. Park, Y.S. Kim y H.K. Choi. (2011). Metabolic profiling and predicting the free radical scavenging activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaves according to harvest time by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75:1090–1097.
 10. Rouseff, R. L., E. O. Onagbola, J. M. Smoot y L. L. Stelinski. (2008). Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves: possible defense mechanism. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56:8905–8910.
 11. Duque-Aristizábal, A. y Ó. A. Guzmán-Piedrahíta. (2013). Comportamiento de materiales de guayabo (*Psidium guajava* Linneo) al parasitismo del nematodo formador de agallas [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood y *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood]. Luna Azul, 37:130–154.
 12. Bogantes-Arias, A. y E. Mora-Newcomer. (2009). Evaluación de cuatro patrones para injertos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Agronomía Mesoamericana, 21:103-111.
 13. Rai, M. K., V. S. Jaiswal y U. Jaiswal. (2009). Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 17:29-38.
 14. Kadam, S., R. M. Patel y P. Singh. (2016). Effect of different factors on *in vitro* growth and shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda. Journal of Applied and Natural Science, 8:1999-2006.
 15. SNICS, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2017). Guayaba (*Psidium guajava* L.)* Generalidades de la red guayaba. <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/guayaba-psidium-guajava-l>.
 16. SAGARPA, Delegación Michoacán. (2018). Producción de guayaba en Michoacán. <https://www.gob.mx/sagarpa/michoacan/articulos/produccion-de-guayaba-en-michoacan?idiom=es>.

17. Gómez, R. (2001). Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR). Plant Molecular Biology Reporter, 19:201–202.
18. UPOV, Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales. (1987). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. Guava (*Psidium guajava* L.). Geneva, Switzerland 27.
19. Miah, G., M. R., M. Ismail, A. Puteh, H. Rahim, K. Islam y M. Latif. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. International Journal of Molecular Sciences, 14:22499–22528.
20. Semagn, K., \A. Bjørnstad y M. N. Ndjiondjop. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology, 5: 2540-2568.
21. Haq, S., R. Jain, M. Sharma, S. Kachhwaha y S. L. Kothari. (2014). Identification and characterization of microsatellites in expressed sequence tags and their cross transferability in different plants. International Journal of Genomics, 2014:1–12.
22. Martínez-De Lara, J., M. C. Barrientos-Lara, A. C. Reyes-De-Anda, S. Hernández-Delgado, J. S. Padilla-Ramírez y N. Mayek-Pérez. (2004). Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes. Revista Fitotecnia Mexicana, 27:243–249.
23. Valera-Montero, L. L., A. Hernández-Dávila, H. S.-Espino y S. F.-Benítez. (2017). Variación genética en guayaba mediante RAPDs y descriptores morfológicos en Calvillo, Aguascalientes. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 8:65-75.
24. Mercy-Kidaha, L., A. Emitati-Alakonya y A. Benard-Nyende. (2015). Molecular characterization of guava landraces in Kenya (Western and South Coast). Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 4:81-86.
25. Valera-Montero, L. L., P. J. Muñoz-Rodríguez, H. Silos-Espino y S. Flores-Benítez. (2017). Genetic diversity of guava (*Psidium guajava* L.) from Central

- Mexico revealed by morphological and RAPD markers. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 85:176–183.
26. Sittther, V., D. Zhang, D. L. Harris, A. K. Yadav, F. T. Zee, L. W. Meinhardt y S. A. Dhekney. (2014). Genetic characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in the United States using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61:829–839.
 27. Pérez, D. T. y J. P. L. Solano. (2007). Variabilidad genética en cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30:391-401.
 28. Risterucci, A. M., M. F. Duval, W. Rohde y N. Billotte. (2005). Isolation and characterization of microsatellite *loci* from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, 5:745–748.
 29. Valdés-Infante, J., N. N. Rodriguez, D. Becker, B. Velázquez, D. Sourd, G. Espinosa y W. Rohde. (2007). Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28:5–11.
 30. Tuler, A. C., T. T. Carrijo, L. R. Nôia, A. Ferreira, A. L. Peixoto y M. F. da Silva Ferreira. (2015). SSR markers: A tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). *Molecular Biology Reports*, 42:1501–1513.
 31. Nogueira, A. M., M. F. S. Ferreira, J. H. S. Guilhen y A. Ferreira. (2014). Multivariate analysis in a genetic divergence study of *Psidium guajava*. *Genetics and Molecular Research*, 13:10657–10668.
 32. Doyle, J. J. y J. L. Doyle. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
 33. Uddin, M., W. Sun, X. He, J. T. da Silva y Q. Cheng. (2014). An improved method to extract DNA from mango *Mangifera indica*. *Biologia*, 69:133-138.
 34. Lade, B., A. Patil y H. Paikrao. (2014). Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. *SpringerPlus*, 3:457.
<http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-3-457>.

35. Sahu, S. K., M. Thangaraj y K. Kathiresan. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012:1–6.
36. Ramírez, Isis M., N. N. Rodríguez, J. Valdés-Infante, M. Capote, D. Becker y W. Rohde. (2004). Isolation of genomic DNAs from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for PCR-based DNA marker application. *Cultivos Tropicales*, 25:33–39.
37. Bressan, E. A., M. L. Rossi, L. T. Gerald, y A. Figueira. (2014). Extraction of high-quality DNA from ethanol-preserved tropical plant tissues. *BMC Research Notes*, 7:268. <https://bmcrsnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-268>.
38. Peakall, R. y P. Smouse. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.
39. Hammer, Ř., D. A. T. Harper, y P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis–palaeontol. *Electron* 4:9.
40. Muñoz-Rodríguez, P. J. (2012). Caracterización Genótipica de accesiones de Guayaba (*Psidium guajava*) mediante RAPD. Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Tesis de Maestría.
41. Shaili, K., A. Nagaraja, S. Rakesh, S. Manish, B. Shiva, M. A. Charu y G. A. Kumar. (2016). Analysis of molecular variance (AMOVA) and principle coordinate analysis (PCOA) of guava germplasm. *International Journal of Agriculture Sciences*, 8:3288-3290.
42. Kherwar, D., K. Usha, S. V. Amitha-Mithra y B. Singh. (2018). Microsatellite (SSR) marker assisted assessment of population structure and genetic diversity for morpho-physiological traits in guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. <http://link.springer.com/10.1007/s13562-017-0438-2>

APÉNDICE A. Datos de árboles muestreados

Cuadro A1. Localización de los árboles muestreados.

Árbol #	Nombre alternativo	Latitud 1	Longitud 1	Latitud 2	Longitud 2	Elevación	Estado	Región	Sub-región
Árbol 1	C1	21.886137	-102.666472	21°53'10.1"N	102°39'59.3"W	1749 m	Aguascalientes	Calvillo	Entrada Calvillo
Árbol 2	C2	21.889317	-102.66307	21°53'21.5"N	102°39'47.1"W	1793 m	Aguascalientes	Calvillo	Entrada Calvillo
Árbol 3	C3	21.861225	-102.661767	21°51'40.4"N	102°39'42.4"W	1694 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 4	C4	21.8614	-102.66033	21°51'41.0"N	102°39'37.2"W	1712 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 5	C5	21.861337	-102.660447	21°51'40.8"N	102°39'37.6"W	1712 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 6	C6	21.861745	-102.66002	21°51'42.3"N	102°39'36.1"W	1712 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 7	C7	21.861845	-102.660438	21°51'42.6"N	102°39'37.6"W	1712 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 8	C8	21.861717	-102.658142	21°51'42.2"N	102°39'29.3"W	1714 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 9	C9	21.862013	-102.656097	21°51'43.3"N	102°39'22.0"W	1782 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 10	C10	21.8633	-102.653345	21°51'47.9"N	102°39'12.0"W	1782 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 11	C11	21.867605	-102.646995	21°52'03.4"N	102°38'49.2"W	1782 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 12	C12	21.864333	-102.651887	21°51'51.6"N	102°39'06.8"W	1782 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 13	C13	21.85858	-102.657555	21°51'30.9"N	102°39'27.2"W	1714 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 14	C14	21.852883	-102.651955	21°51'10.4"N	102°39'07.0"W	1736 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 15	C15	21.850653	-102.648597	21°51'02.4"N	102°38'55.0"W	1758 m	Aguascalientes	Calvillo	Presa Malpaso
Árbol 16	C16	21.883663	-102.705108	21°53'01.2"N	102°42'18.4"W	1680 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 17	C17	21.970175	-102.681687	21°58'12.6"N	102°40'54.1"W	1791 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 18	C18	21.971705	-102.680245	21°58'18.1"N	102°40'48.9"W	1796 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto

Árbol 19	C19	21.97477	-102.678795	21°58'29.2"N	102°40'43.7"W	1787 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 20	C20	21.981737	-102.677467	21°58'54.3"N	102°40'38.9"W	1787 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 21	C21	21.983755	-102.67752	21°59'01.5"N	102°40'39.1"W	1813 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 22	C22	21.984492	-102.677467	21°59'04.2"N	102°40'38.9"W	1813 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 23	C23	21.986455	-102.676697	21°59'11.2"N	102°40'36.1"W	1813 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 24	C24	21.989462	-102.674797	21°59'22.1"N	102°40'29.3"W	1852 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 25	C25	21.995353	-102.675003	21°59'43.3"N	102°40'30.0"W	1852 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 26	J1	21.657717	-102.951513	21°39'27.8"N	102°57'05.5"W	1441 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 27	J2	21.669788	-102.922517	21°40'11.2"N	102°55'21.1"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 28	J3	21.6694	-102.923517	21°40'09.8"N	102°55'24.7"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 29	J4	21.669712	-102.925758	21°40'11.0"N	102°55'32.7"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 30	J5	21.669912	-102.926605	21°40'11.7"N	102°55'35.8"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 31	J6	21.670928	-102.928362	21°40'15.3"N	102°55'42.1"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 32	J7	21.672345	-102.930108	21°40'20.4"N	102°55'48.4"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 33	J8	21.673095	-102.931345	21°40'23.1"N	102°55'52.8"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa

Árbol 34	J9	21.67327	-102.931403	21°40'23.8"N	102°55'53.1"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 35	J10	21.674345	-102.934137	21°40'27.6"N	102°56'02.9"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 36	J11	21.674788	-102.936233	21°40'29.2"N	102°56'10.4"W	1524 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 37	J12	21.668188	-102.942422	21°40'05.5"N	102°56'32.7"W	1439 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 38	J13	21.660137	-102.921622	21°39'36.5"N	102°55'17.8"W	1579 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 39	J14	21.662863	-102.915688	21°39'46.3"N	102°54'56.5"W	1548 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 40	J15	21.668205	-102.90898	21°40'05.5"N	102°54'32.3"W	1532 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 41	J16	21.694337	-102.868483	21°41'39.6"N	102°52'06.5"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 42	J17	21.693292	-102.867683	21°41'35.9"N	102°52'03.7"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 43	J18	21.691703	-102.866195	21°41'30.1"N	102°51'58.3"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 44	J19	21.691662	-102.866272	21°41'30.0"N	102°51'58.6"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 45	J20	21.689755	-102.8646	21°41'23.1"N	102°51'52.6"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 46	J21	21.689595	-102.864395	21°41'22.5"N	102°51'51.8"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 47	J22	21.68992	-102.864687	21°41'23.7"N	102°51'52.9"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 48	J23	21.68975	-102.864455	21°41'23.1"N	102°51'52.0"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa

Árbol 49	J24	21.687487	-102.863303	21°41'15.0"N	102°51'47.9"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 50	J25	21.68738	-102.863137	21°41'14.6"N	102°51'47.3"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 51	J26	21.685537	-102.86228	21°41'07.9"N	102°51'44.2"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 52	J27	21.68555	-102.862328	21°41'08.0"N	102°51'44.4"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 53	J28	21.685362	-102.86187	21°41'07.3"N	102°51'42.7"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 54	J29	21.685475	-102.860283	21°41'07.7"N	102°51'37.0"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 55	J30	21.685587	-102.860467	21°41'08.1"N	102°51'37.7"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 56	J31	21.685275	-102.858878	21°41'07.0"N	102°51'32.0"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 57	J32	21.685263	-102.858878	21°41'07.0"N	102°51'32.0"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 58	J33	21.685705	-102.862878	21°41'08.5"N	102°51'46.4"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 59	J34	21.685675	-102.862853	21°41'08.4"N	102°51'46.3"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 60	J35	21.683478	-102.863792	21°41'00.5"N	102°51'49.7"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 61	J36	21.68317	-102.862953	21°40'59.4"N	102°51'46.6"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 62	J37	21.68358	-102.862253	21°41'00.9"N	102°51'44.1"W	1571 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 63	M1	19.396462	-100.3907	19°23'47.3"N	100°23'26.5"W	1706 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez

Árbol 64	M2	19.391363	-100.395203	19°23'28.9"N	100°23'42.7"W	1730 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 65	M3	19.391558	-100.395758	19°23'29.6"N	100°23'44.7"W	1730 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 66	M4	19.385313	-100.397903	19°23'07.1"N	100°23'52.5"W	1702 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 67	M5	19.385497	-100.397675	19°23'07.8"N	100°23'51.6"W	1702 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 68	M6	19.375837	-100.39425	19°22'33.0"N	100°23'39.3"W	1690 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 69	M7	19.376172	-100.39405	19°22'34.2"N	100°23'38.6"W	1690 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 70	M8	19.37063	-100.39518	19°22'14.3"N	100°23'42.7"W	1718 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 71	M9	19.370787	-100.394875	19°22'14.8"N	100°23'41.6"W	1718 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 72	M10	19.365367	-100.397163	19°21'55.3"N	100°23'49.8"W	1713 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 73	M11	19.335167	-100.407988	19°20'06.6"N	100°24'28.8"W	1475 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 74	M12	19.33475	-100.407913	19°20'05.1"N	100°24'28.5"W	1475 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 75	M13	19.328438	-100.418883	19°19'42.4"N	100°25'08.0"W	1420 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 76	M14	19.328163	-100.418472	19°19'41.4"N	100°25'06.5"W	1420 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 77	M15	19.329292	-100.418792	19°19'45.5"N	100°25'07.7"W	1420 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 78	M16	19.329378	-100.419075	19°19'45.8"N	100°25'08.7"W	1420 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez

Árbol 79	M17	19.325747	-100.423967	19°19'32.7"N	100°25'26.3"W	1354 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 80	M18	19.325603	-100.423408	19°19'32.2"N	100°25'24.3"W	1354 m	Michoacán	Zitácuaro	Heroica Zitácuaro - Bénito Juárez
Árbol 81	M19	19.29762	-100.432678	19°17'51.4"N	100°25'57.6"W	1319 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 82	M20	19.297317	-100.433967	19°17'50.3"N	100°26'02.3"W	1319 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 83	M21	19.288808	-100.43138	19°17'19.7"N	100°25'53.0"W	1337 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 84	M22	19.289938	-100.430855	19°17'23.8"N	100°25'51.1"W	1337 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 85	M23	19.258458	-100.444412	19°15'30.5"N	100°26'39.9"W	1278 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 86	M24	19.258178	-100.444625	19°15'29.4"N	100°26'40.7"W	1278 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 87	M25	19.257888	-100.444558	19°15'28.4"N	100°26'40.4"W	1278 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 88	M26	19.258822	-100.441497	19°15'31.8"N	100°26'29.4"W	1307 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 89	M27	19.258822	-100.441497	19°15'31.8"N	100°26'29.4"W	1308 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 90	M28	19.258822	-100.441497	19°15'31.8"N	100°26'29.4"W	1309 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 91	M29	19.258822	-100.441497	19°15'31.8"N	100°26'29.4"W	1310 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 92	M30	19.258822	-100.441497	19°15'31.8"N	100°26'29.4"W	1311 m	Michoacán	Zitácuaro	Bénito Juárez - Tuzantla
Árbol 93	M31	19.306697	-101.883812	19°18'24.1"N	101°53'01.7"W	1005 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 94	M32	19.307117	-101.883283	19°18'25.6"N	101°52'59.8"W	1011 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 95	M33	19.304908	-101.889237	19°18'17.7"N	101°53'21.3"W	979 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan

Árbol 96	M34	19.305033	-101.889228	19°18'18.1"N	101°53'21.2"W	979 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 97	M35	19.304853	-101.889983	19°18'17.5"N	101°53'23.9"W	979 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 98	M36	19.305455	-101.891833	19°18'19.6"N	101°53'30.6"W	979 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 99	M37	19.305563	-101.892145	19°18'20.0"N	101°53'31.7"W	981 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 100	M38	19.308445	-101.895937	19°18'30.4"N	101°53'45.4"W	970 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 101	M39	19.307695	-101.897172	19°18'27.7"N	101°53'49.8"W	970 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 102	M40	19.308887	-101.899688	19°18'32.0"N	101°53'58.9"W	974 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 103	M41	19.308497	-101.899833	19°18'30.6"N	101°53'59.4"W	974 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 104	M42	19.309958	-101.901078	19°18'35.9"N	101°54'03.9"W	974 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 105	M43	19.309855	-101.901153	19°18'35.5"N	101°54'04.2"W	974 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 106	M44	19.314112	-101.903678	19°18'50.8"N	101°54'13.2"W	1036 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 107	M45	19.313283	-101.903412	19°18'47.8"N	101°54'12.3"W	1036 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 108	M46	19.318597	-101.904878	19°19'07.0"N	101°54'17.6"W	1036 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 109	M47	19.317912	-101.904938	19°19'04.5"N	101°54'17.8"W	1036 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 110	M48	19.32232	-101.909287	19°19'20.4"N	101°54'33.4"W	1028 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 111	M49	19.323845	-101.910142	19°19'25.8"N	101°54'36.5"W	1035 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 112	M50	19.330228	-101.91735	19°19'48.8"N	101°55'02.5"W	1108 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 113	M51	19.330772	-101.91693	19°19'50.8"N	101°55'01.0"W	1094 m	Michoacán	Uruapan	Camino Taretan
Árbol 114	M52	19.280328	-101.867758	19°16'49.2"N	101°52'03.9"W	873 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 115	M53	19.277662	-101.863395	19°16'39.6"N	101°51'48.2"W	873 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 116	M54	19.27802	-101.863	19°16'40.9"N	101°51'46.8"W	873 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 117	M55	19.27462	-101.856963	19°16'28.6"N	101°51'25.1"W	829 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 118	M56	19.274845	-101.857042	19°16'29.4"N	101°51'25.4"W	829 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 119	M57	19.26982	-101.853203	19°16'11.4"N	101°51'11.5"W	825 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 120	M58	19.268787	-101.852913	19°16'07.6"N	101°51'10.5"W	825 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 121	M59	19.267128	-101.852325	19°16'01.7"N	101°51'08.4"W	825 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 122	M60	19.267242	-101.852295	19°16'02.1"N	101°51'08.3"W	825 m	Michoacán	Uruapan	El Hoyo del Aire
Árbol 123	C26	21.866187	-102.697813	21°51'58.3"N	102°41'52.1"W	1686 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto

Árbol 124	C27	21.867042	-102.69777	21°52'01.4"N	102°41'52.0"W	1689 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 125	C28	21.867355	-102.697845	21°52'02.5"N	102°41'52.2"W	1692 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 126	C29	21.869178	-102.697512	21°52'09.0"N	102°41'51.0"W	1716 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 127	C30	21.869488	-102.697617	21°52'10.2"N	102°41'51.4"W	1719 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 128	C31	21.870913	-102.697242	21°52'15.3"N	102°41'50.1"W	1752 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 129	C32	21.870942	-102.697242	21°52'15.4"N	102°41'50.1"W	1752 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 130	C33	21.873058	-102.703238	21°52'23.0"N	102°42'11.7"W	1664 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 131	C34	21.918255	-102.693445	21°55'05.7"N	102°41'36.4"W	1737 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 132	C35	21.917928	-102.692755	21°55'04.5"N	102°41'33.9"W	1737 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 133	C36	21.917662	-102.691697	21°55'03.6"N	102°41'30.1"W	1737 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 134	C37	21.920253	-102.693992	21°55'12.9"N	102°41'38.4"W	1733 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 135	C38	21.920003	-102.694205	21°55'12.0"N	102°41'39.1"W	1731 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 136	C39	21.915245	-102.694192	21°54'54.9"N	102°41'39.1"W	1737 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 137	C40	21.92757	-102.693345	21°55'39.3"N	102°41'36.0"W	1805 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 138	C41	21.92752	-102.693383	21°55'39.1"N	102°41'36.2"W	1805 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto

Árbol 139	C42	21.926972	-102.691413	21°55'37.1"N	102°41'29.1"W	1805 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 140	C43	21.927042	-102.691537	21°55'37.4"N	102°41'29.5"W	1805 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 141	C44	21.926987	-102.691353	21°55'37.2"N	102°41'28.9"W	1805 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 142	C45	21.926958	-102.691383	21°55'37.1"N	102°41'29.0"W	1805 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera La Panadera - Palo Alto
Árbol 143	C46	21.767622	-102.800117	21°46'03.4"N	102°48'00.4"W	1600 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 144	C47	21.767628	-102.799163	21°46'03.5"N	102°47'57.0"W	1600 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 145	C48	21.76735	-102.798226	21°46'02.5"N	102°47'53.6"W	1600 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 146	C49	21.768342	-102.800605	21°46'06.0"N	102°48'02.2"W	1600 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 147	C50	21.768095	-102.800278	21°46'05.1"N	102°48'01.0"W	1600 m	Aguascalientes	Calvillo	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 148	J38	21.752267	-102.822783	21°45'08.2"N	102°49'22.0"W	1557 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 149	J39	21.7562083	-102.823692	21°45'22.4"N	102°49'25.3"W	1555 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 150	J40	21.756667	-102.82412	21°45'24.0"N	102°49'26.8"W	1555 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 151	J41	21.738655	-102.836158	21°44'19.2"N	102°50'10.2"W	1562 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 152	J42	21.738688	-102.836533	21°44'19.3"N	102°50'11.5"W	1562 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 153	J43	21.740917	-102.838653	21°44'27.3"N	102°50'19.2"W	1562 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa

Árbol 154	J44	21.741672	-102.838067	21°44'30.0"N	102°50'17.0"W	1544 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 155	J45	21.736838	-102.850662	21°44'12.6"N	102°51'02.4"W	1551 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 156	J46	21.737238	-102.85122	21°44'14.1"N	102°51'04.4"W	1535 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 157	J47	21.7384783	-102.851883	21°44'18.5"N	102°51'06.8"W	1536 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 158	J48	21.7384867	-102.851883	21°44'18.6"N	102°51'06.8"W	1536 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 159	J49	21.7387	-102.851487	21°44'19.3"N	102°51'05.4"W	1536 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa
Árbol 160	J50	21.738895	-102.85112	21°44'20.0"N	102°51'04.0"W	1536 m	Zacatecas	Jalpa	Carretera Calvillo - Jalpa

Cuadro A2. Características de hoja de los árboles muestreados.

Árbol #	Nombre alterno	Proporción largo/ancho	Forma	Curvatura transversal	Presencia de torcimiento	Curvatura de la nervadura	Forma de la base	Forma de la punta	Color
Árbol 1	C1	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 2	C2	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde Obscuro
Árbol 3	C3	Alto	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 4	C4	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 5	C5	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 6	C6	Alto	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde Amarillo
Árbol 7	C7	Alto	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 8	C8	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 9	C9	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 10	C10	Medio	Oblonga	Fuerte	Ausente	Presente	Redondeada	Apiculada	Verde
Árbol 11	C11	Medio	Oblonga	Fuerte	Ausente	Presente	Obtusa	Redondeada	Verde
Árbol 12	C12	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 13	C13	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Obtusa	Apiculada	Verde Amarillo
Árbol 14	C14	Bajo	Obovalada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 15	C15	Alto	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 16	C16	Alto	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 17	C17	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 18	C18	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 19	C19	Alto	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 20	C20	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde

Árbol 21	C21	Alto	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 22	C22	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 23	C23	Medio	Trulada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 24	C24	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 25	C25	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 26	J1	Medio	Trulada	Medio	Presente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 27	J2	Medio	Oblonga	Fuerte	Ausente	Presente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 28	J3	Alto	Oblonga	Fuerte	Presente	Presente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 29	J4	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 30	J5	Alto	Trulada	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 31	J6	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 32	J7	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 33	J8	Medio	Oblonga	Medio	Presente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 34	J9	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 35	J10	Medio	Trulada	Fuerte	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 36	J11	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Obtusa	Redondeada	Verde
Árbol 37	J12	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 38	J13	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 39	J14	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 40	J15	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 41	J16	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 42	J17	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Obtusa	Verde Amarillo
Árbol 43	J18	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde Amarillo
Árbol 44	J19	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 45	J20	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Obtusa	Verde

Árbol 46	J21	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde Oscuro
Árbol 47	J22	Medio	Ovalada	Fuerte	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde Oscuro
Árbol 48	J23	Medio	Ovalada	Fuerte	Ausente	Ausente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 49	J24	Alto	Oblonga	Fuerte	Ausente	Ausente	Obtusa	Redondeada	Verde
Árbol 50	J25	Bajo	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde Oscuro
Árbol 51	J26	Medio	Oblonga	Fuerte	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde Amarillo
Árbol 52	J27	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Obtusa	Redondeada	Verde Amarillo
Árbol 53	J28	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 54	J29	Alto	Oblonga	Fuerte	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 55	J30	Medio	Obovalada	Fuerte	Ausente	Presente	Redondeada	Aguda	Verde Amarillo
Árbol 56	J31	Bajo	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 57	J32	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde Amarillo
Árbol 58	J33	Medio	Ovalada	Fuerte	Ausente	Ausente	Redondeada	Atenuada	Verde Amarillo
Árbol 59	J34	Bajo	Ovalada	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde Amarillo
Árbol 60	J35	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde Amarillo
Árbol 61	J36	Medio	Oblonga	Fuerte	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde Amarillo
Árbol 62	J37	Bajo	Ovalada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 63	M1	Bajo	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde Oscuro

Árbol 64	M2	Bajo	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 65	M3	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 66	M4	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 67	M5	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Oscuro
Árbol 68	M6	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 69	M7	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Obtusa	Oscuro
Árbol 70	M8	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 71	M9	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Aguda	Oscuro
Árbol 72	M10	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Apiculada	Verde
Árbol 73	M11	Medio	Ovalada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Oscuro
Árbol 74	M12	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 75	M13	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Aguda	Verde
Árbol 76	M14	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 77	M15	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 78	M16	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Oscuro
Árbol 79	M17	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 80	M18	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Aguda	Oscuro
Árbol 81	M19	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 82	M20	Bajo	Ovalada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Apiculada	Verde
Árbol 83	M21	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 84	M22	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 85	M23	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde

Árbol 86	M24	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 87	M25	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 88	M26	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 89	M27	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 90	M28	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Apiculada	Verde
Árbol 91	M29	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 92	M30	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 93	M31	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 94	M32	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 95	M33	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 96	M34	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Oscuro
Árbol 97	M35	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 98	M36	Bajo	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 99	M37	Bajo	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Obtusa	Obtusa	Oscuro
Árbol 100	M38	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 101	M39	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 102	M40	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 103	M41	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 104	M42	Bajo	Ovalada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 105	M43	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Atenuada	Verde
Árbol 106	M44	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 107	M45	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Aguda	Oscuro
									Verde

Árbol 108	M46	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Apiculada	Verde Oscuro
Árbol 109	M47	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Apiculada	Verde
Árbol 110	M48	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 111	M49	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Apiculada	Verde
Árbol 112	M50	Medio	Oblonga	Medio	Presente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 113	M51	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Aguda	Verde Oscuro
Árbol 114	M52	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Aguda	Verde
Árbol 115	M53	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 116	M54	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 117	M55	Alto	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 118	M56	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Apiculada	Verde Oscuro
Árbol 119	M57	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 120	M58	Medio	Ovalada	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Aguda	Verde
Árbol 121	M59	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 122	M60	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Apiculada	Verde
Árbol 123	C26	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 124	C27	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 125	C28	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 126	C29	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Obtusa	Obtusa	Verde
Árbol 127	C30	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 128	C31	Medio	Ovalada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 129	C32	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 130	C33	Bajo	Obovalada	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde

Árbol 131	C34	Medio	Oblonga	Débil	Presente	Presente	Redondeada	Aguda	Verde
Árbol 132	C35	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 133	C36	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 134	C37	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 135	C38	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Atenuada	Verde
Árbol 136	C39	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Ausente	Redondeada	Redondeada	Oscuro
Árbol 137	C40	Medio	Ovalada	Débil	Ausente	Ausente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 138	C41	Alto	Oblonga	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 139	C42	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 140	C43	Medio	Oblolanceolada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Atenuada	Oscuro
Árbol 141	C44	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 142	C45	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Redondeada	Oscuro
Árbol 143	C46	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 144	C47	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Redondeada	Verde
Árbol 145	C48	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Redondeada	Obtusa	Verde
Árbol 146	C49	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Oscuro
Árbol 147	C50	Medio	Oblonga	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde
Árbol 148	J38	Medio	Ovalada	Medio	Ausente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 149	J39	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Redondeada	Aguda	Oscuro

Árbol 150	J40	Medio	Oblonga	Débil	Ausente	Presente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 151	J41	Medio	Oblolanceolada	Débil	Ausente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 152	J42	Medio	Oblonga	Medio	Presente	Presente	Cordada	Aguda	Verde
Árbol 153	J43	Medio	Oblonga	Débil	Presente	Ausente	Cordada	Obtusa	Verde Oscuro
Árbol 154	J44	Medio	Oblonga	Débil	Presente	Ausente	Cordada	Aguda	Verde Oscuro
Árbol 155	J45	Medio	Oblonga	Medio	Presente	Presente	Cordada	Redondeada	Verde Oscuro
Árbol 156	J46	Bajo	Oblolanceolada	Débil	Presente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 157	J47	Bajo	Oblolanceolada	Débil	Presente	Ausente	Cordada	Apiculada	Verde Oscuro
Árbol 158	J48	Medio	Oblonga	Débil	Presente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde Oscuro
Árbol 159	J49	Bajo	Oblolanceolada	Débil	Presente	Ausente	Cordada	Redondeada	Verde
Árbol 160	J50	Medio	Oblonga	Medio	Presente	Ausente	Cordada	Aguda	Verde

Cuadro A3. Características del fruto de los árboles muestreados.

Árbol #	Nombre alterno	Proporción largo/ancho	Forma del fruto en el cuello	Diámetro del cáliz	Proporción núcleo/pulpa	Color de piel	Tipo de piel	Color de pulpa
Árbol 63	M1	Medio	Punteado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Crema
Árbol 64	M2	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Blanco
Árbol 65	M3	Medio	Punteado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Blanco
Árbol 66	M4	Medio	Punteado	Medio	Medio	Amarillo oscuro	Bordes	Crema
Árbol 67	M5	Medio	Truncado	Medio	Medio	Amarillo oscuro	Liso	Crema
Árbol 68	M6	Medio	Redondeado	Medio	Delgado	Amarillo oscuro	Rugoso	Blanco
Árbol 69	M7	Alto	Truncado	Chico	Medio	Amarillo oscuro	Bordes	Crema
Árbol 70	M8	Medio	Truncado	Chico	Medio	Amarillo oscuro	Rugoso	Blanco
Árbol 71	M9	Medio	Truncado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Crema
Árbol 72	M10	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Bordes	Crema
Árbol 73	M11	Medio	Redondeado	Chico	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Blanco
Árbol 74	M12	Medio	Punteado	Chico	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Blanco
Árbol 75	M13	Medio	Truncado	Chico	Medio	Amarillo oscuro	Rugoso	Rosa claro
Árbol 77	M15	Medio	Truncado	Chico	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Rosa claro
Árbol 78	M16	Alto	Cuello	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Crema
Árbol 79	M17	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Blanco
Árbol 81	M19	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 83	M21	Alto	Truncado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 88	M26	Medio	Truncado	Medio	Medio	Amarillo oscuro	Liso	Blanco
Árbol 89	M27	Medio	Truncado	Medio	Medio	Amarillo oscuro	Liso	Blanco
Árbol 90	M28	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Blanco
Árbol 91	M29	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Blanco
Árbol 92	M30	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Blanco
Árbol 96	M34	Alto	Truncado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema

Árbol 97	M35	Medio	Truncado	Medio	Delgado	Amarillo claro	Liso	Blanco
Árbol 98	M36	Medio	Ampliamente redondeado	Grande	Medio	Amarillo Claro	Liso	Crema
Árbol 101	M39	Medio	Truncado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Crema
Árbol 102	M40	Alto	Cuello	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Crema
Árbol 103	M41	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Blanco
Árbol 111	M49	Medio	Truncado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Crema
Árbol 112	M50	Alto	Truncado	Chico	Grande	Amarillo claro	Bordes	Crema
Árbol 115	M53	Alto	Cuello	Medio	Grande	Amarillo claro - verde	Bordes	Blanco
Árbol 116	M54	Medio	Cuello	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Crema
Árbol 119	M57	Chico	Ampliamente redondeado	Medio	Delgado	Amarillo claro - verde	Liso	Blanco
Árbol 123	C26	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 125	C28	Medio	Redondeado	Chico	Medio	Amarillo oscuro	Rugoso	Crema
Árbol 126	C29	Medio	Punteado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Rugoso	Crema
Árbol 128	C31	Alto	Cuello	Chico	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 132	C35	Alto	Punteado	Medio	Grande	Amarillo claro	Rugoso	Blanco
Árbol 133	C36	Alto	Punteado	Chico	Medio	Amarillo claro	Rugoso	Crema
Árbol 135	C38	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 138	C41	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Crema
Árbol 140	C43	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Crema
Árbol 142	C45	Medio	Redondeado	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Crema
Árbol 143	C46	Medio	Cuello	Medio	Chico	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 144	C47	Medio	Truncado	Chico	Medio	Amarillo claro	Bordes	Crema
Árbol 146	C49	Medio	Punteado	Chico	Medio	Amarillo claro	Liso	Crema
Árbol 150	J40	Medio	Cuello	Medio	Medio	Amarillo claro - verde	Liso	Crema

APÉNDICE B. Protocolos de extracción de ADN probados en guayaba

B1. Método de Uddin y colaboradores [33]

1. Moler entre 0.2 y 0.3 g de hojas congeladas en un mortero y pistilo preenfriados con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino.
2. Transferir a un tubo de 2 mL con 800 µl de solución 1 y 0.2 % de β - mercaptoetanol
3. Se agita en vortex y se centrifuga a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante.
4. Repetir el procedimiento con 700 µl de solución 1
5. Agregar 700 µl de solución 2 a 65 °C y 0.15 % de β - mercaptoetanol a la pastilla resultante, mezclar cuidadosamente.
6. Incubar a 65 °C por 1 hora sin dejar de agitar
7. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y se agrega un volumen equivalente de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
8. Mezclar durante 5 minutos en vortex y se centrifuga a 12,500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente
9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso de limpieza se repite 3 veces o hasta que el sobrenadante sea transparente.
10. Transferir fase acuosa a un tubo nuevo con 2 volúmenes de etanol al 100 % y 1/10 de acetato de sodio, mezclar cuidadosamente y mantener a -20 °C durante 1 hora.
11. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos y descartar el sobrenadante.

12. Lavar 2 veces la pastilla con etanol 70 % y secar a temperatura ambiente.
13. Resuspender en 200 μ l de 0.1 X TE, agregar 5 μ l de RNAsa e incubar a 37 °C por 30 minutos, agregar un volumen igual de cloroformo, mezclar y centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos.
14. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo con 2 volúmenes de etanol al 100 %, mezclar suavemente y mantener a -20 °C por 1 hora.
15. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos, descartar el sobrenadante y dejar secar.
16. Disolver en 20 o 40 μ l de agua destilada estéril.

Soluciones Necesarias [33]

Solución 1: 0.4 M de glucosa, 20 mM de EDTA, 3 % de PVP40, 0.2 % de β - mercaptoetanol.

Solución 2: 2 % CTAB, 100 mM de Tris, 20 mM de EDTA, 1.4 M de NaCl, 0.15 % β - mercaptoetanol.

Acetato de Sodio 3 M

B2. Método de Lade y colaboradores [34]

1. Pesar 0.5 g de muestra de hoja
2. Moler la muestra con 1 mL de buffer CTAB
3. Transferir a tubo Ependorff de 2 mL y agregar RNAsa A 20 mg/mL mezclar bien e incubar a 37 °C por 15 minutos
4. Agregar 10 µl de proteinasa K e incubar en un baño de agua entre 65 y 70 °C por 1 hora sin dejar de agitar
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 1 volumen equivalente de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar a 12,000 g por 15 minutos
6. Tomar el sobrenadante cuidadosamente y transferirlo a un tubo Ependorff de 2 mL. Descartar la pastilla.
7. Agregar la mitad de volumen de cloruro de sodio 5 M, agitar y mantener en un baño de hielo por 15 minutos
8. Agregar 1/10 volúmenes de acetato de sodio al sobrenadante y 2/3 de alcohol isopropílico frio. Mezclar por inversión suavemente.
9. Mantener a -20 °C por 30 minutos y centrifugar a 11,000 g por 5 minutos, descartar el sobrenadante
10. Dejar secar la pastilla por 5 a 10 minutos.
11. Lavar el pastilla con 500 µl de etanol al 70 %, centrifugar a 11,000 g por 5 minutos.
12. Descartar el etanol a 70 % y dejar secar durante 15 minutos sobre una sanita en posición invertida
13. Disolver en 100 µL de TE y guardar a -20 °C

Soluciones Necesarias [34]

Buffer CTAB: 2 % CTAB, Tris - HCl 1 M, EDTA 0.5 M, NaCl 5 M, PVP40 1 % se ajusta a pH 5 y se afora a 100 mL con agua

Acetato de sodio 3.5 M a 5.3 pH

B3. Método de Sahu y colaboradores [35]

1. Precalentar el buffer de suspensión a pH 8 que contiene 50 mM de EDTA, 120 mL de Tris - HCl, 1 M de NaCl, 0.5 M de sacarosa, 2 % de Triton X100, y 0.2 % de β - mercaptoetanol en un baño a 60 °C.
2. Moler 1 g de hojas previamente congeladas a -80 °C en mortero y pistilo fríos con 250 mg de PVP.
3. Transferir el contenido a un tubo Ependorff de 2 mL y agregar 2 volúmenes de buffer de suspensión.
4. Mezclar por inversión e incubar a 60 °C por 40 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Tirar la fase acuosa
6. Agregar 1.5 mL de buffer de extracción que contiene 20 μ M de EDTA, 100 μ M de Tris - HCl, 1.5 M de cloruro de sodio, 2 % de CTAB, 1 % de β - Mercaptoetanol, e incubar a 60 °C por 30 minutos.
7. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y agregar 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión de 15 a 20 veces y centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos.
9. Agregar 2 volúmenes de isopropanol frio y mantener a -20 °C por 1 hora.
10. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos y descartar el sobrenadante.
11. Agregar etanol al 70 % y resuspender la pastilla.
12. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos.
13. Descartar el sobrenadante y dejar secar la pastilla.

14. Agregar 100 µl de buffer TE, Agregar 3 µl de RNAsa y mantener a 37 °C por 30 minutos.
15. Continuar con una extracción de cloroformo:alcohol isoamílico y una precipitación con etanol y acetato de sodio 3 M.
16. Limpiar con etanol 70 % y dejar secar.
17. Agregar 50 µl de TE o agua destilada para resuspender.

B4. Método de Muñoz [40]

1. Moler con nitrógeno líquido 1 g de hojas previamente congeladas a -80 °C en mortero y pistilo fríos hasta polvo fino.
2. Transferir el contenido a un tubo Eppendorf de 2 mL y agregar 750 µL de buffer de extracción que contiene 50 µM de EDTA, 100 µM de Tris - HCl, 2 % de cloruro de sodio, 2 % de CTAB, 2 % de β - Mercaptoetanol, previamente calentado a 60 °C.
3. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclar en vortex por 15 minutos y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos, recuperar sobrenadante en un tubo nuevo. Repetir dos veces este paso.
4. Agregar 2 volúmenes de isopropanol frío y mantener a -20 °C por 10 minutos.
5. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos y descartar el sobrenadante.
6. Agregar etanol al 70 % y resuspender la pastilla, centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos, descartar el sobrenadante y dejar secar la pastilla. Repetir este paso en caso de contaminación.
7. Agregar 50 µl de TE o agua destilada para resuspender.

APÉNDICE C. Dendrogramas de caracterización de árboles de guayaba

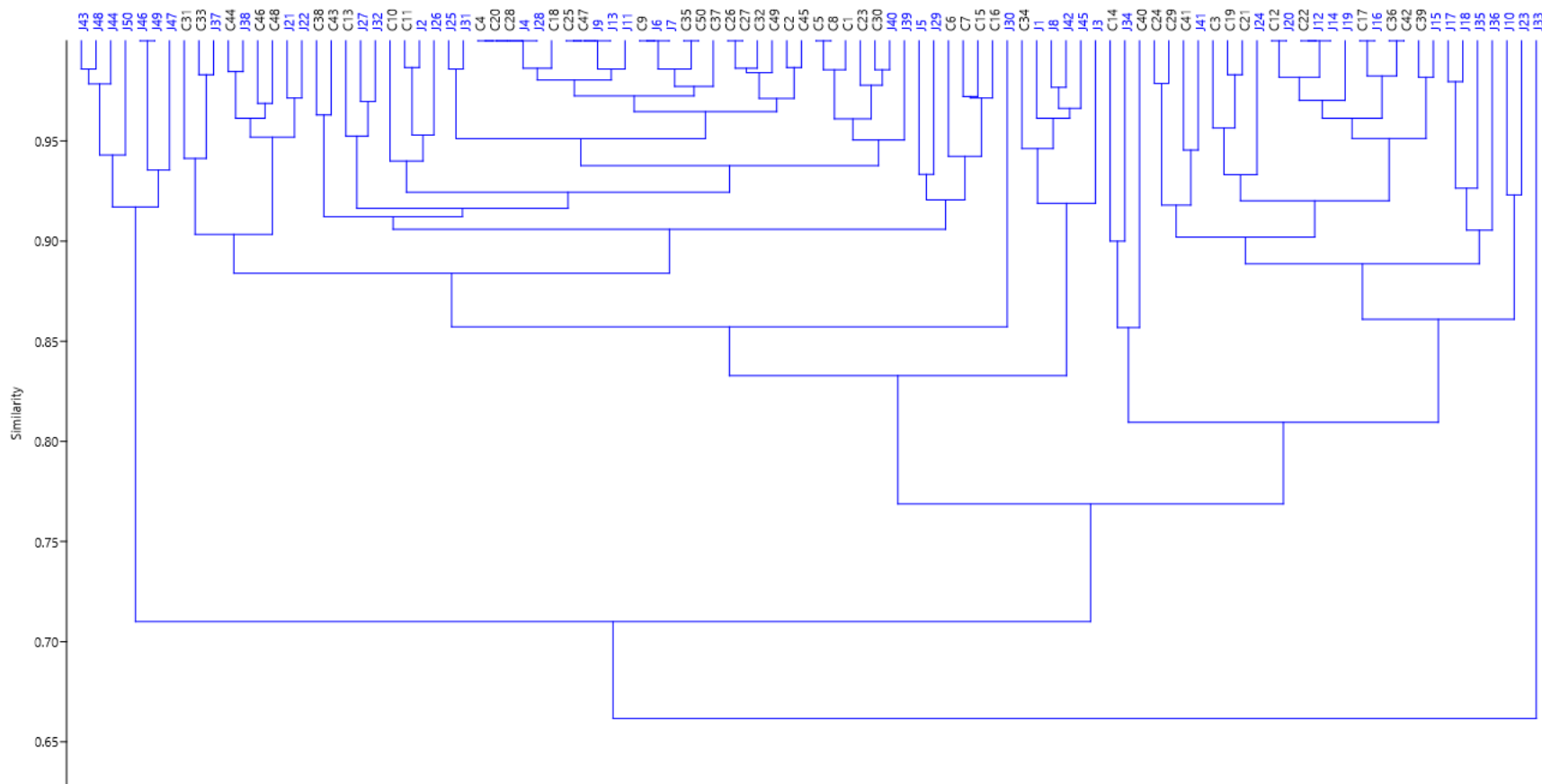


Figura C1. Dendrograma morfológico de los árboles muestreados de Aguascalientes (C) y Zacatecas (J).

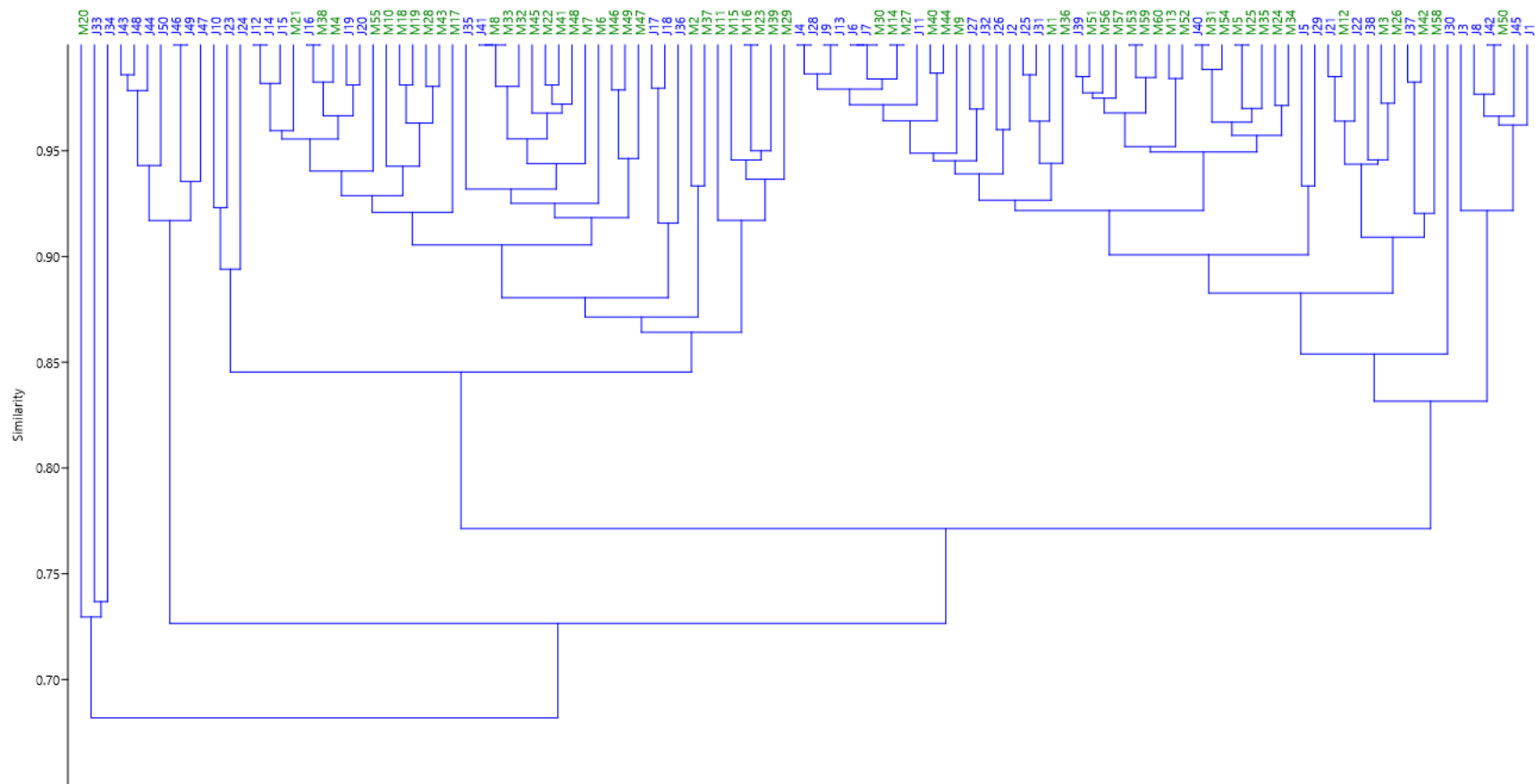


Figura C2. Dendrograma morfológico de los árboles muestreados de Zacatecas (J) y Michoacán (M).

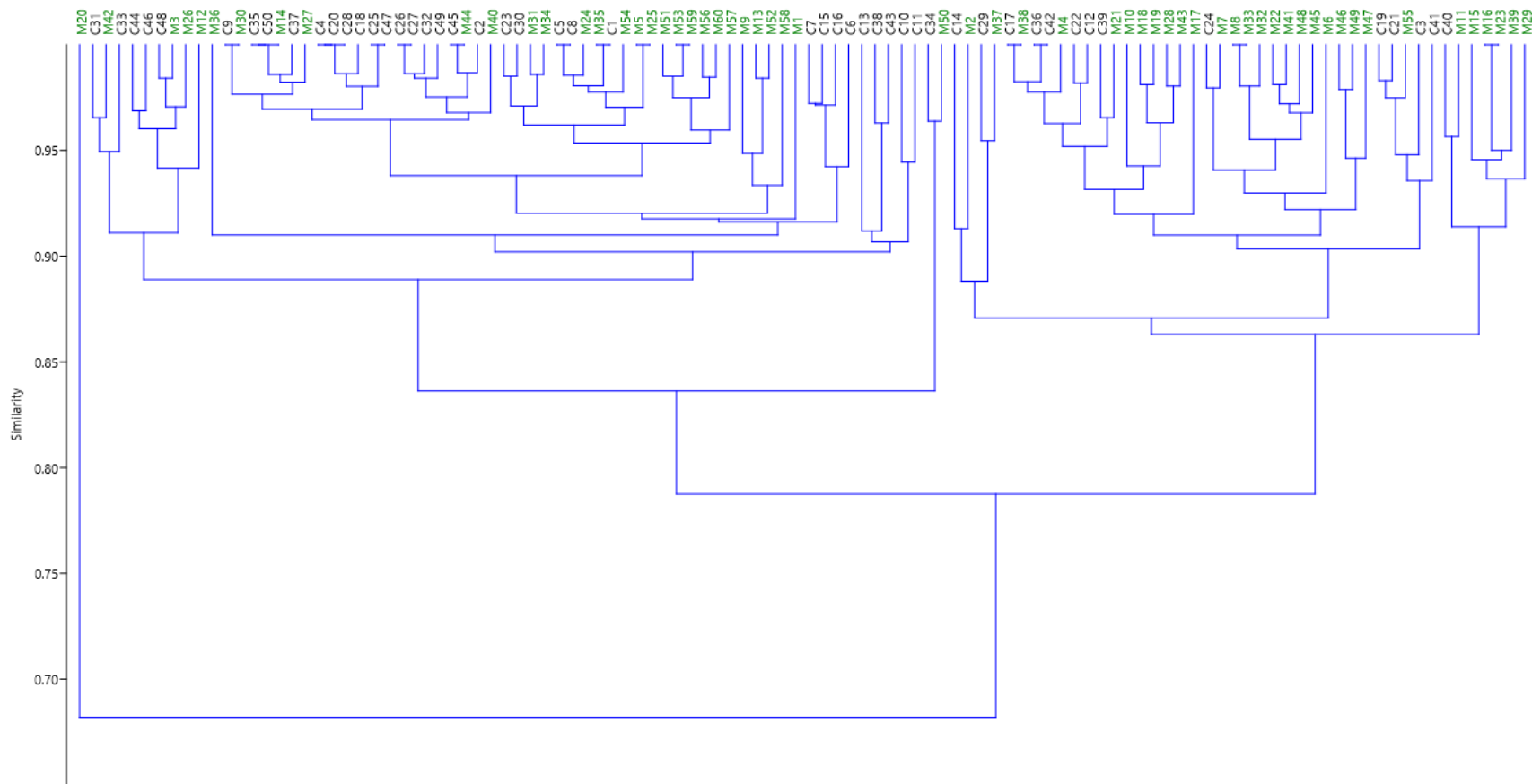


Figura C3. Dendrograma morfológico de los árboles muestreados de Aguascalientes (C) y Michoacán (M).

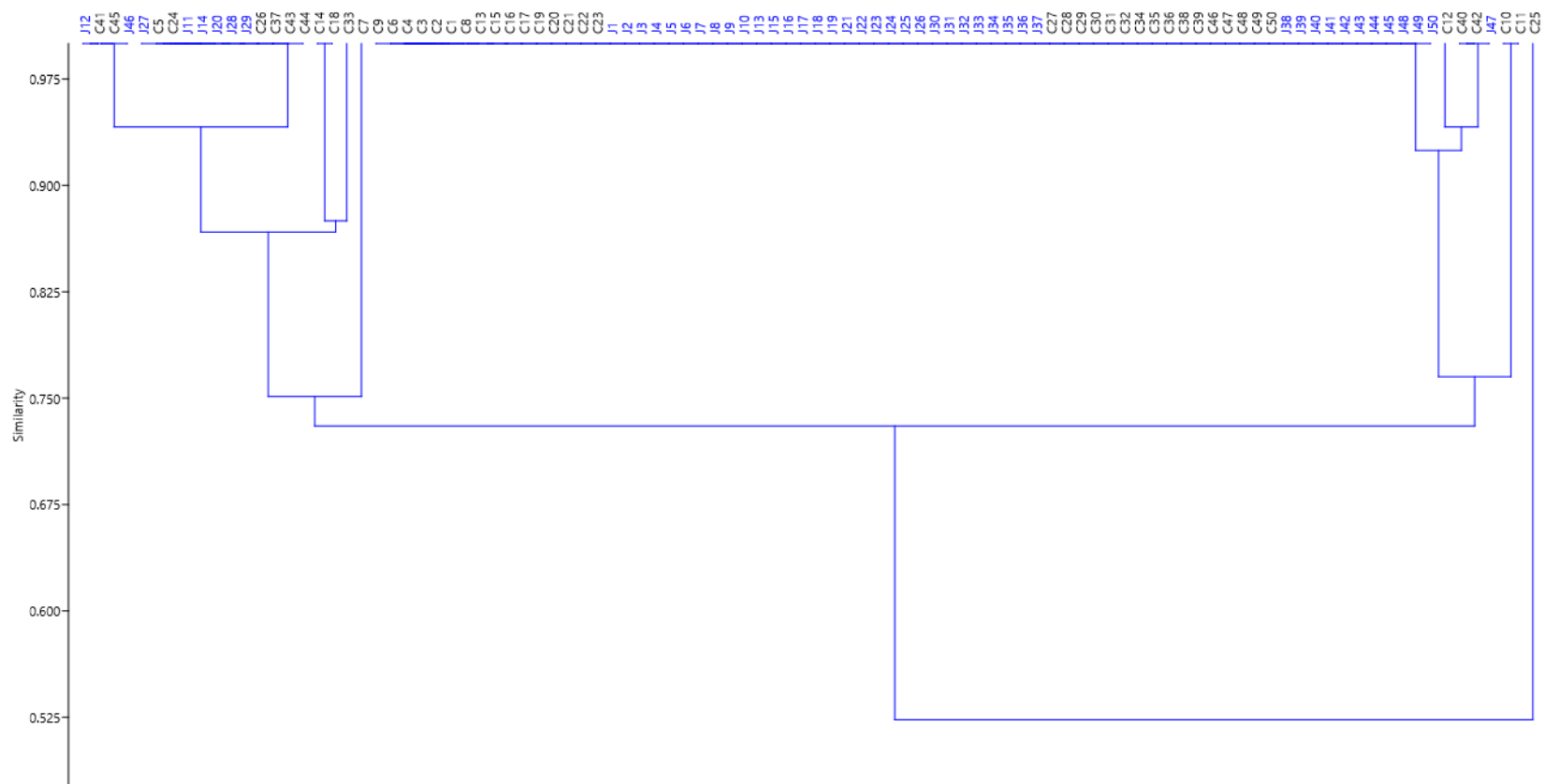


Figura C4. Dendrograma molecular de los árboles muestreados de Aguascalientes (C) y Zacatecas (J).

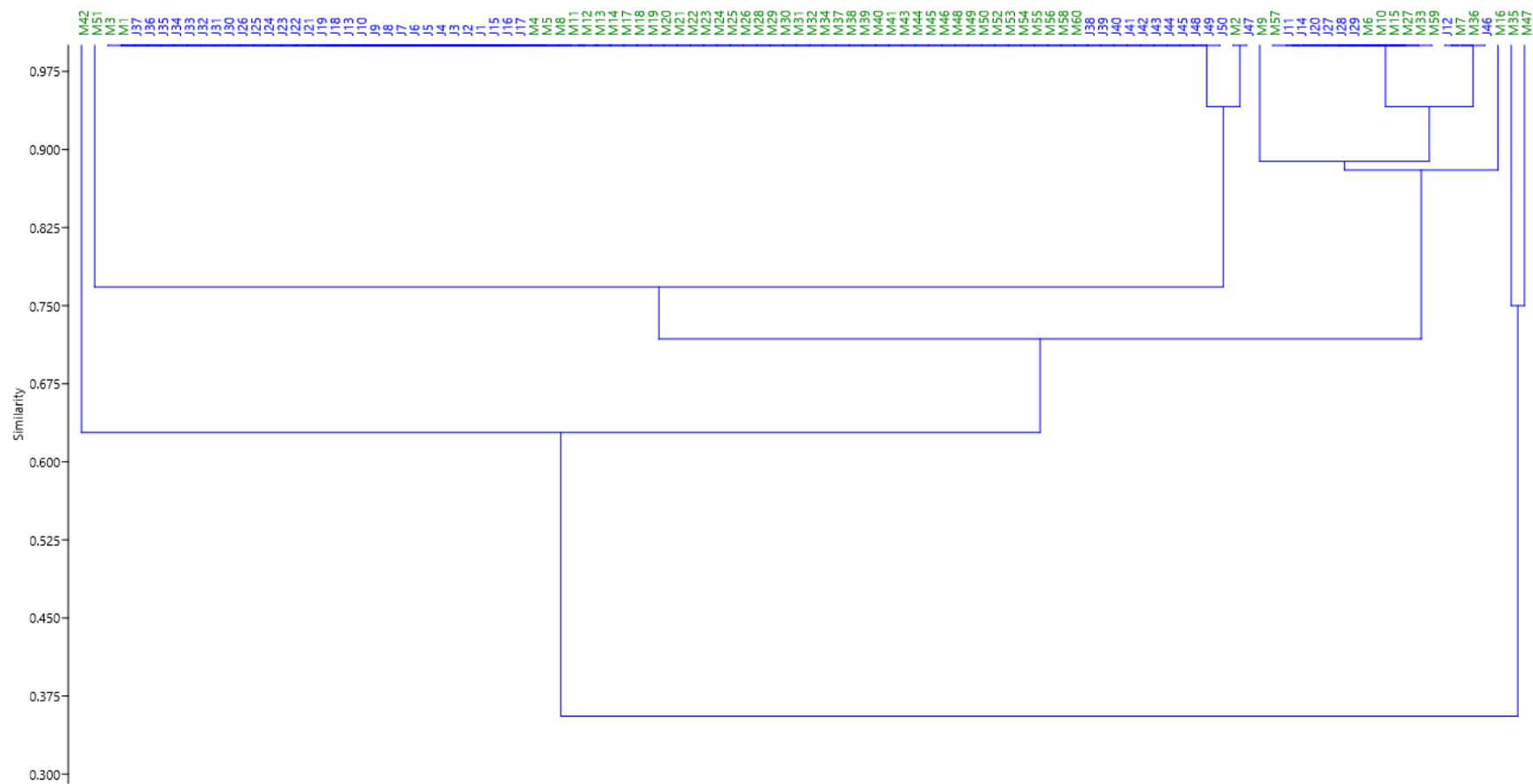


Figura C5. Dendrograma molecular de los árboles muestreados de Zacatecas (J) y Michoacán (M).

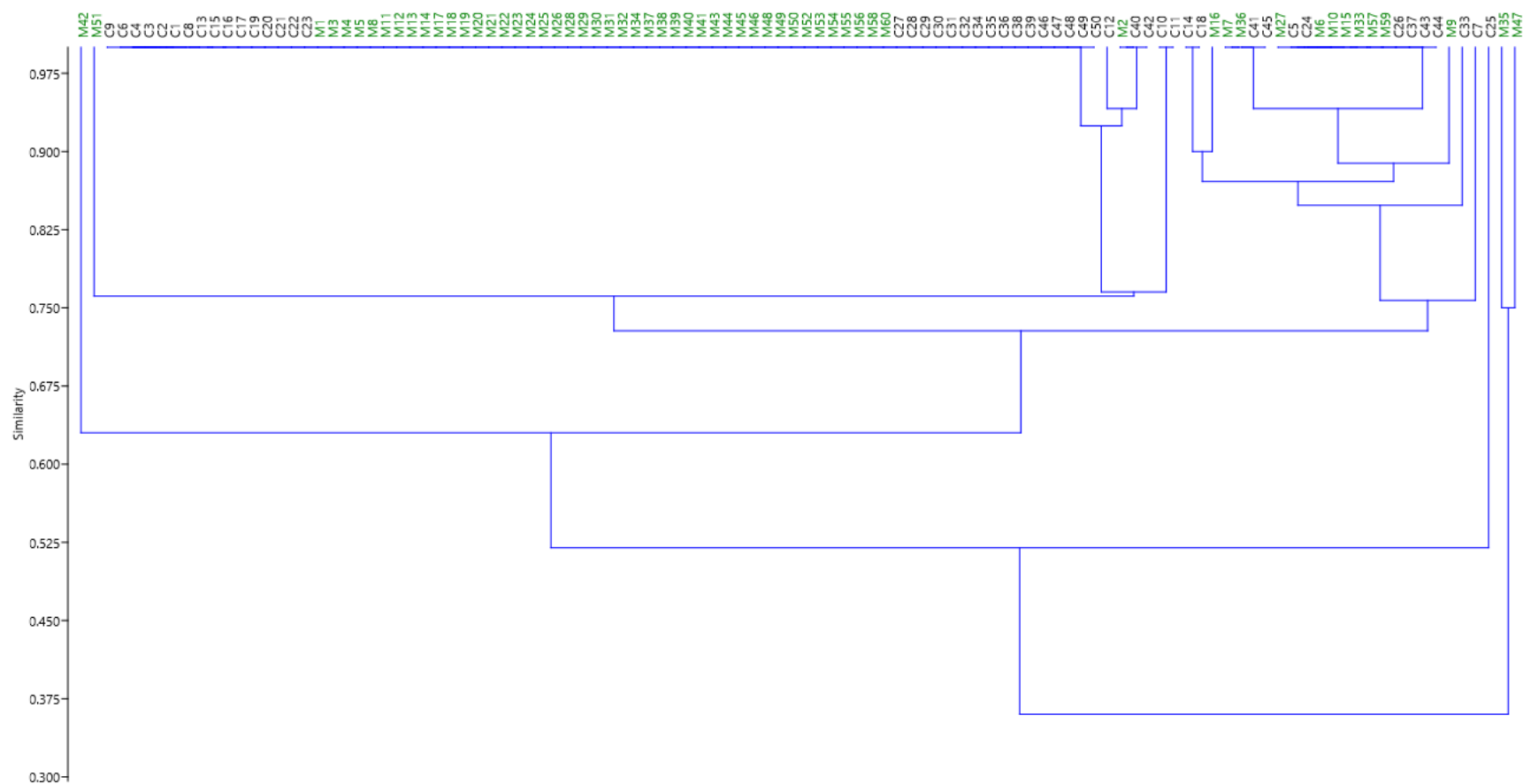


Figura C6. Dendrograma molecular de los árboles muestreados de Aguascalientes (C) y Michoacán (M).

APÉNDICE D. Fotos de geles de microsatélites amplificados

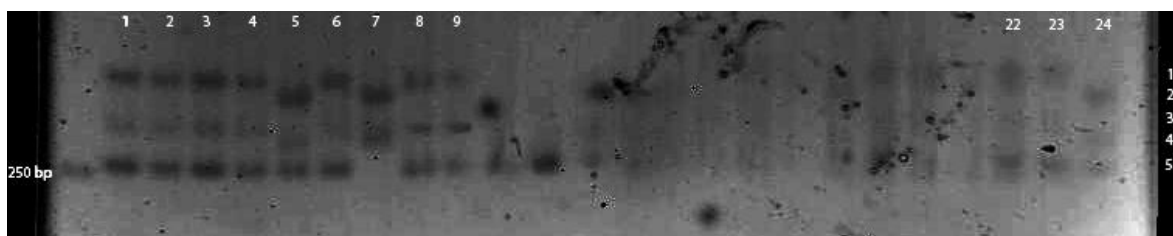


Figura D1. Microsatélites mPgCIR19 con muestras del 1 a 24.

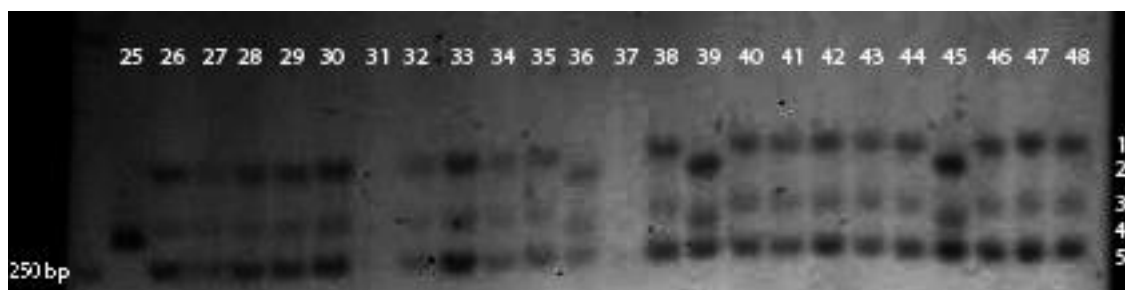


Figura D2. Microsatélites mPgCIR19 con muestras del 25 a 48.

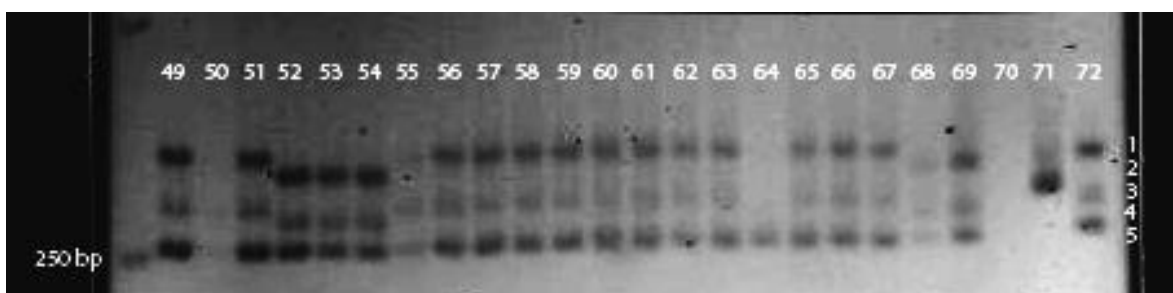


Figura D3. Microsatélites mPgCIR19 con muestras del 49 a 72.



Figura D4. Microsatélites mPgCIR19 muestras del 73 a 94.



Figura D5. Microsatélites mPgCIR19 con muestras del 95 a 118.



Figura D6. Microsatélites mPgCIR19 con muestras del 119 a 143.



Figura D7. Microsatélites mPgCIR19 con muestras del 144 a 160 y microsatélites mPgCIR16 con muestras de 1 a 4.



Figura D8. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 5 a 26.

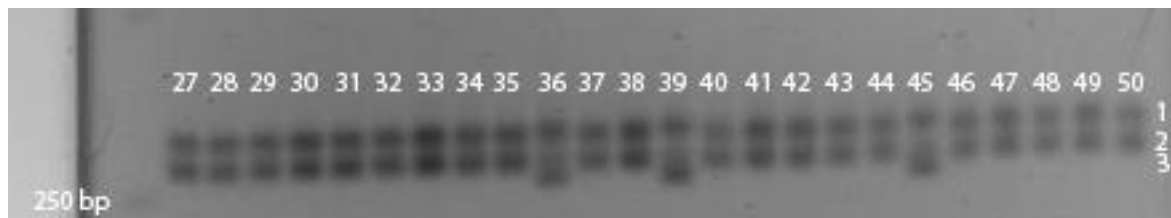


Figura D9. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 27 a 50.

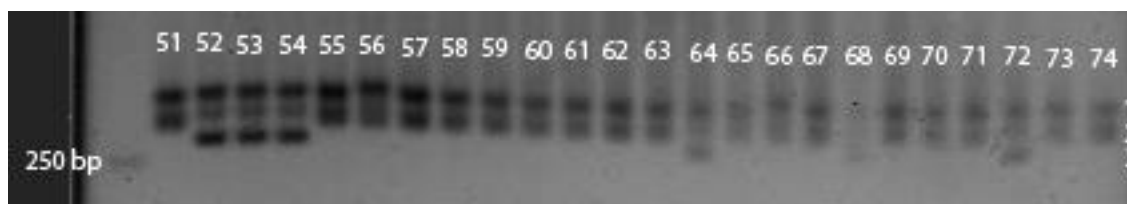


Figura D10. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 51 a 74.

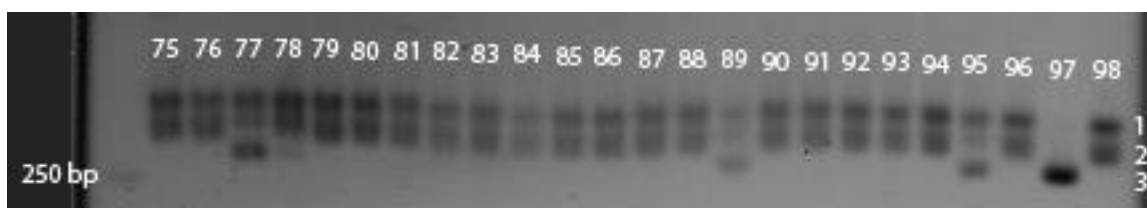


Figura D11. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 75 a 98.

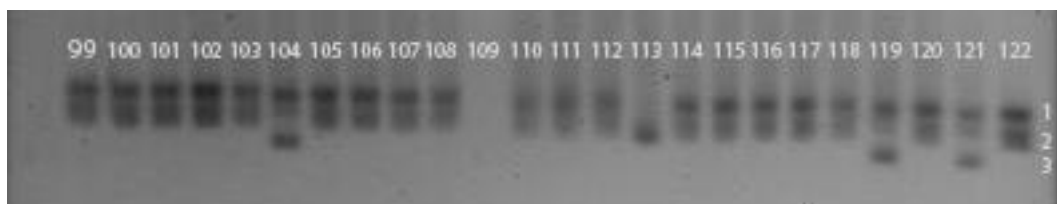


Figura D12. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 99 a 122.



Figura D13. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 123 a 146.



Figura D14. Microsatélites mPgCIR16 con muestras del 147 a 160 y microsatélite mPgCIR10 con muestras de 1 a 10.

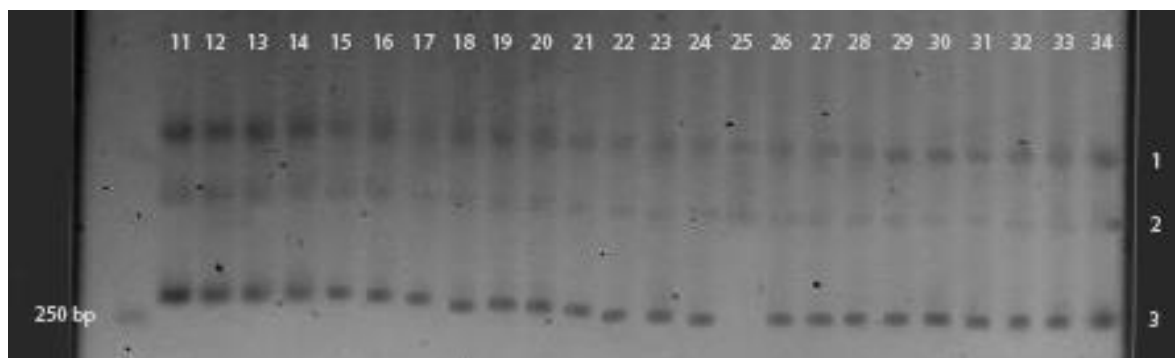


Figura D15. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 11 a 34.

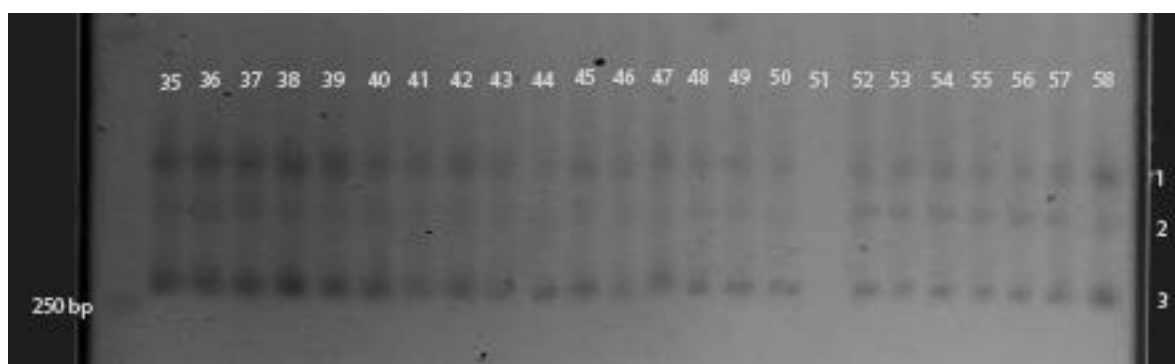


Figura D16. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 35 a 48.

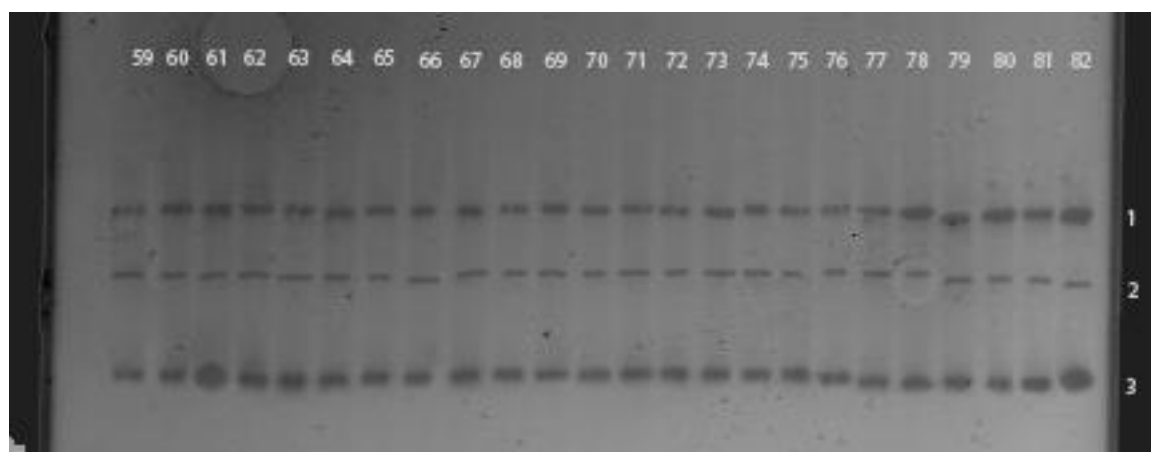


Figura D17. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 59 a 82.



Figura D18. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 83 a 104.

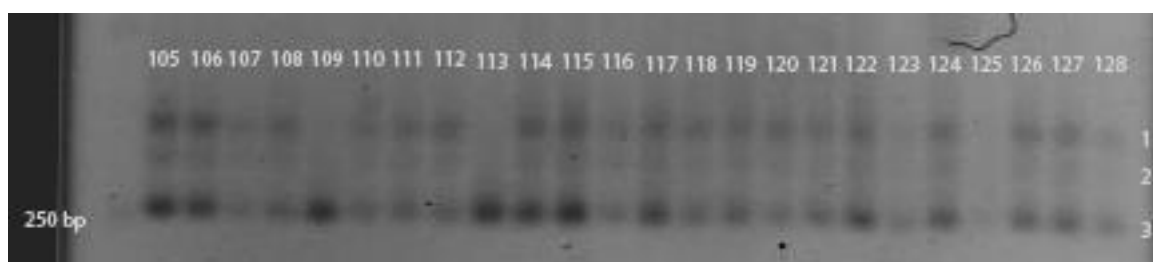


Figura D19. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 105 a 128.

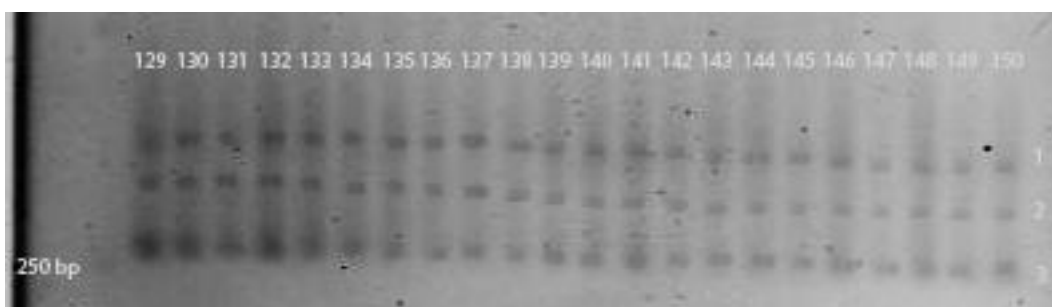


Figura D20. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 129 a 150.

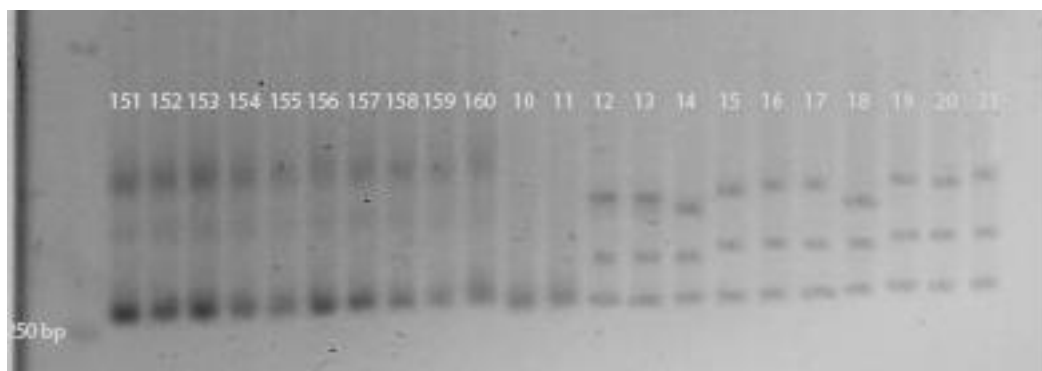


Figura D21. Microsatélites mPgCIR10 con muestras del 151 a 160 y repetición de microsatélite mPgCIR19 con muestras de 10 a 21.

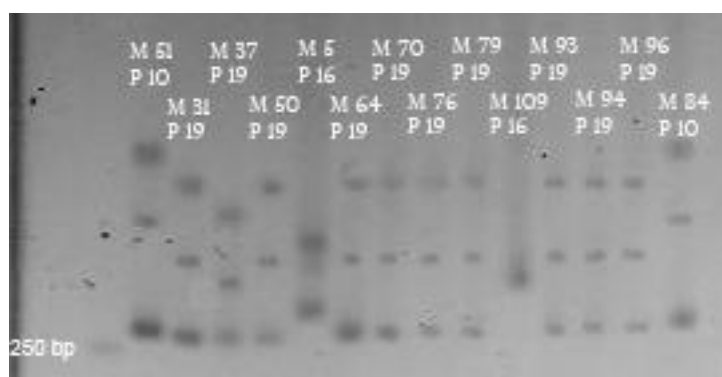


Figura D22. Gel de repetición de muestras no amplificadas.

APÉNDICE E. Datos obtenidos de la amplificación de microsatélites

# Árbol	Nombre alterno	mPgCIR19				mPgCIR16				mPgCIR10		
		Locus 1	Locus 2	Locus 3	Locus 4	Locus 5	Locus 6	Locus 7	Locus 8	Locus 9	Locus 10	Locus 11
Árbol 1	C1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 2	C2	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 3	C3	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 4	C4	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 5	C5	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 6	C6	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 7	C7	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
Árbol 8	C8	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 9	C9	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 10	C10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
Árbol 11	C11	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
Árbol 12	C12	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 13	C13	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 14	C14	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 15	C15	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 16	C16	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 17	C17	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 18	C18	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 19	C19	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 20	C20	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 21	C21	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 22	C22	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 23	C23	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1

Árbol 24	C24	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 25	C25	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
Árbol 26	J1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 27	J2	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 28	J3	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 29	J4	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 30	J5	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 31	J6	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 32	J7	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 33	J8	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 34	J9	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 35	J10	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 36	J11	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 37	J12	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 38	J13	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 39	J14	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 40	J15	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 41	J16	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 42	J17	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 43	J18	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 44	J19	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 45	J20	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 46	J21	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 47	J22	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 48	J23	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 49	J24	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 50	J25	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 51	J26	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 52	J27	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Árbol 53	J28	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 54	J29	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 55	J30	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 56	J31	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 57	J32	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 58	J33	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 59	J34	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 60	J35	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 61	J36	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 62	J37	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 63	M1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 64	M2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 65	M3	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 66	M4	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 67	M5	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 68	M6	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 69	M7	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 70	M8	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 71	M9	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 72	M10	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 73	M11	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 74	M12	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 75	M13	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 76	M14	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 77	M15	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 78	M16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 79	M17	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 80	M18	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 81	M19	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1

Árbol 82	M20	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 83	M21	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 84	M22	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 85	M23	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 86	M24	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 87	M25	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 88	M26	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 89	M27	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 90	M28	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 91	M29	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 92	M30	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 93	M31	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 94	M32	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 95	M33	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 96	M34	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 97	M35	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
Árbol 98	M36	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 99	M37	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 100	M38	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 101	M39	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 102	M40	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 103	M41	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 104	M42	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Árbol 105	M43	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 106	M44	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 107	M45	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 108	M46	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 109	M47	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Árbol 110	M48	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1

Árbol 111	M49	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 112	M50	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 113	M51	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Árbol 114	M52	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 115	M53	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 116	M54	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 117	M55	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 118	M56	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 119	M57	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 120	M58	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 121	M59	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 122	M60	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 123	C26	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 124	C27	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 125	C28	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 126	C29	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 127	C30	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 128	C31	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 129	C32	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 130	C33	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 131	C34	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 132	C35	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 133	C36	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 134	C37	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 135	C38	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 136	C39	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 137	C40	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 138	C41	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
Árbol 139	C42	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1

Árbol 140	C43	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 141	C44	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 142	C45	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 143	C46	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 144	C47	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 145	C48	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 146	C49	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 147	C50	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 148	J38	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 149	J39	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 150	J40	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 151	J41	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 152	J42	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 153	J43	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 154	J44	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 155	J45	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 156	J46	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 157	J47	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Árbol 158	J48	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 159	J49	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Árbol 160	J50	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1