



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE  
VARIEDADES MEXICANAS DE HIGO (*Ficus carica* L.)**

**MAYRA TERESA GARCÍA RUIZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

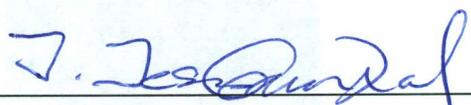
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

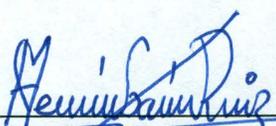
2014

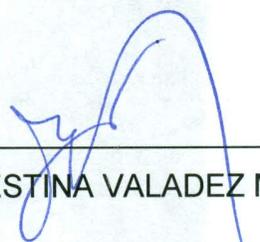
La presente tesis, titulada: **Caracterización Morfológica y Genética de Variedades Mexicanas de Higo (*Ficus carica* L.)**, realizada por la alumna: **Mayra Teresa García Ruiz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:   
DR. J. JESÚS GARCÍA ZAVALA

ASESOR:   
DR. HERNÁN GARCÍA RUIZ

ASESOR:   
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:   
DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

ASESOR:   
DR. GILBERTO RENDÓN SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, México, agosto de 2014

# CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE VARIEDADES MEXICANAS DE HIGO (*Ficus carica* L.)

Mayra Teresa García Ruiz, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2014

## Resumen

El higo común (*Ficus carica* L.) fue introducido en México por los misioneros Franciscanos españoles en el siglo XVI, por lo que se asume que los higos mexicanos son de la variedad española Black Mission. Nosotros colectamos y propagamos plantas de higo de seis estados del centro de México. Aquí nosotros presentamos una caracterización morfológica de poblaciones mexicanas de higo, basada en atributos cualitativos y cuantitativos del fruto, así como una metodología estandarizada para la extracción de ADN y un análisis de huellas de ADN, basadas en una combinación de RAPDs, ISSRs y RFLPs. Nuestros resultados muestran una gran diversidad en la morfología del fruto, la que no puede ser explicada únicamente por efecto de las condiciones ambientales. Las principales diferencias entre las poblaciones mexicanas de higo son el tamaño o peso del fruto, el color de la pulpa, la longitud del cuello y la forma del pedúnculo. Las huellas de ADN demuestran de manera contundente que las poblaciones de higo en el centro de México son genéticamente diferentes. Con base en estos resultados, llegamos a la conclusión de que después de cientos de años los higos negros se han adaptado a condiciones ambientales locales en el centro de México, generando variedades claramente distintas que representan diversidad morfológica y genética valuable y previamente no descrita. Aunque México no es el centro de origen del higo, nuestros resultados muestran claramente que México es una fuente de diversidad genética del higo. También sugerimos nombres para las variedades caracterizadas con base en sus lugares de origen y establecemos las bases para la futura caracterización agronómica y molecular de variedades de higo.

**Palabras clave:** diversidad morfológica, variedades de higo, huellas de ADN.

**MORPHOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF MEXICAN FIG  
(*Ficus carica* L.) VARIETIES**

**Mayra Teresa García Ruiz, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2014**

**Abstract**

The common fig (*Ficus carica* L.) was introduced into Mexico by Spanish Franciscan missionaries in the 16<sup>th</sup> century, so that it is assumed that Mexican figs belong to the Spanish cultivar Black Mission. We collected and propagated fig plants from six states in the Central Mexico region. Here we present a morphological characterization of Mexican fig populations, based on qualitative and quantitative fruit traits, as well as a standardized method to extract DNA from young leaves, and a DNA fingerprinting analysis based on a combination of RAPDs, ISSRs and RFLPs. Our results show a great diversity in the morphology of the fruit, which can not be explained only by the effects of environmental conditions. The main morphological differences among Mexican fig landraces are the fruit size or weight, color of the pulp, length of the neck and the shape of the stalk. DNA fingerprinting showed in a forceful way that the Mexican fig populations were genetically different among them. Based on these results, we came to the conclusion that after hundreds of years of cultivations, the black figs have been adapted to the local environmental conditions of the center of Mexico, yielding in several clearly distinct landraces, which represent valuable and previously undescribed genetic and morphological diversity. Though Mexico is not the center of origin of the fig, our results show clearly that Mexico is a source of genetic diversity of the fig. We also suggest names for the varieties characterized based on their place of origin and established the basis for further agronomic characterization of fig varieties.

**Key words:** morphological diversity, fig varieties, DNA fingerprinting.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, que me guarda como a la niña de sus ojos, me corona de favores, multiplica mis fuerzas, y me sustenta con la diestra de su justicia.

Al pueblo de México que financía al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico que me brindó para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, por contribuir en mi formación académica.

Al Donald Danforth Plant Science Center, en St. Louis, Missouri, USA, por la oportunidad de realizar una estancia doctoral en el laboratorio del Dr. James Carrington.

Al Dr. J. Jesús García Zavala, por su paciencia, sugerencias, apoyo desinteresado, tiempo dedicado en la revisión de la tesis, y constante motivación para llevar a buen término esta investigación, y con ello, la obtención de mi grado.

Al Dr. Hernán García Ruiz, por guiarme de manera personal durante la estancia doctoral en Danforth, enseñándome diferentes aspectos de la ciencia y de la vida misma, y por sus valiosas sugerencias en la revisión del artículo científico y la tesis.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por sus consejos, apoyo para realizar parte de esta investigación con recursos de su laboratorio, sus sugerencias en la revisión del artículo y de la tesis, y por alentarme a seguir siempre hacia adelante.

Al Dr. Gregorio Arellano Ostoia, por su valentía para aceptar formar parte de mi Consejo Particular, con la única intención de apoyarme en la culminación de mis estudios.

Al Dr. Gilberto Rendón Sánchez, por sus enseñanzas a lo largo de mis estudios de doctorado y por su apoyo incondicional para ser parte de mi Consejo Particular.

Al Dr. Javier Hernández Morales, por sus sugerencias a lo largo de mi estancia en el Colegio de Postgraduados y por brindarme un espacio en su laboratorio para llevar a cabo parte de esta investigación, apoyándola incluso con recursos de sus propios proyectos.

Al M. C. Alfonso Muratalla Lúa, por compartir el material genético de dos variedades de higo incluidas en esta investigación, por permitirme hacer uso de su invernadero, y por sus sugerencias y enseñanzas.

Al Dr. Sergio Sandoval, M. C. Victoria Ayala, Dr. Marcos Soto, M. C. Rubén San Miguel, Dr. Arturo Galvis, M. C. Tita, Dr. Gabino García y Dr. Henry Wagaba, por las facilidades brindadas para hacer uso de sus laboratorios para llevar a cabo diversas partes de esta investigación, así como su apoyo en la identificación de microorganismos, el uso de software y análisis genéticos.

Al Dr. Manuel Anaya Garduño, por alentarme a recuperar la confianza en mi misma, permitirme formar parte del equipo de trabajo de CIDECALLI, y por apoyarme incondicionalmente para concluir esta investigación.

Al Dr. Francisco Escobar Vega, por defender los derechos de los estudiantes y apoyarme desinteresadamente para llevar a buen término mis estudios de doctorado.

Al Dr. Daniel Teliz Ortíz, por sus consejos y apoyo moral a lo largo de mi paso por el Colegio de Postgraduados.

Al Lic. Armando Ramírez Gómez, por analizar críticamente mi situación como estudiante del COLPOS y hacer que la justicia se imparta de manera imparcial.

Al Dr. Jorge Flores Velázquez, porque los verdaderos amigos permanecen para siempre.

A la M. C. Diana Garfias, por las horas y horas de esfuerzo dedicadas para escucharme, aconsejarme, y ayudarme a encontrar una pizca de esperanza.

A Gisela, Huitzi, Ana, Irma, Karina, Gerardo y Nora, compañeros de laboratorio y cubículo; María, Michaela, Mary y Penny, equipo de trabajo en Danforth; Alberto y Dolores, personal de apoyo en el laboratorio de Biología Molecular de Fitotecnia, UACH; Maricela y Ma. de La Paz, de Fisiología Vegetal; Yolanda de Hidrociencias; Carmen, Dionicio y Luz, compañeros de Fitopatología; Dr. Víctor Conde Martínez, y M. C. Antonio García Esteva, de Botánica; por los gratos recuerdos.

Al equipo de trabajo de CIDECALLI: Sandra R. M. C. Vélez Arteaga, Yesika Mata Gallardo y Jhonatan Chacón Rodríguez, por su valioso apoyo moral y logístico durante la fase final de mi investigación.

A Ana María, Claudia, Alfredo, Paola, Mayela, Pascual, Gabriela, Raúl, Elizabeth, Hépsiva, Antonio, Isabel, Carolina, Jesús, Xóchitl, Tomás, Ignacio, Guadalupe, Fredy, Moisés, Hernán, y Victoria, por su ejemplo de unidad, trabajo en equipo, fortaleza, oraciones, y perseverancia en Cristo Jesús.

## DEDICATORIA

*Con profundo cariño dedico esta investigación a quienes me guiaron, me apoyaron y me formaron en alguna etapa de mi vida:*

*Mis padres y hermanos.*

*Mis abuelitos.*

*Familia García Luna.*

*Familia García Hernández.*

*Familia Díaz García.*

*Familia Salazar García.*

*Familia García García.*

*Familia Chávez García.*

*Profesora Ma. Guadalupe Plaza Paredes.*

*Profesora Ma. Magdalena López Correa.*

*M. C. Virginia Cano García.*

*M. C. Alba Luz Reyes Vigíl.*

*Ing. Juvenal Yañez Vargas.*

## CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
1.1. Objetivos.	3
1.2. Hipótesis.	4
1.3. Literatura Citada.	5
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	8
2.1. Origen y distribución geográfica del higo.	8
2.2. Características botánicas del higo.	9
2.3. Clasificación taxonómica del higo.	12
2.4. Tipos de higueras.	13
2.5. Variedades de higo.	15
2.6. Propiedades nutritivas y nutraceuticas del higo.	20
2.7. Indicadores de cosecha del higo.	21
2.8. Fisiología y vida de anaquel del higo.	23
2.9. Control de microorganismos en higo.	25
2.10. Cultivo del higo en México.	27
2.11. Caracterización de higo con base en atributos morfológicos.	29
2.12. Caracterización de higo con base en marcadores moleculares.	31
2.13. Literatura Citada	32
<b>III. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE HIGOS (<i>Ficus carica</i> L.) EN MÉXICO</b>	41
3.1. Resumen.	41
3.2. Abstract.	42
3.3. Introducción.	43
3.4. Materiales y Métodos.	46
3.5. Resultados y Discusión.	50
3.6. Conclusiones.	55
3.7. Literatura Citada.	56

<b>IV. PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS DE HIGO</b>	<b>60</b>
<b>(<i>Ficus carica</i> L.)</b>	
4.1. Resumen.	60
4.2. Abstract.	61
4.3. Introducción.	62
4.4. Materiales y Métodos.	65
4.5. Resultados y Discusión.	69
4.6. Conclusiones.	73
4.7. Literatura Citada.	73
<b>V. HUELLAS DE ADN DE VARIEDADES MEXICANAS DE HIGO (<i>Ficus</i></b>	<b>78</b>
<b><i>carica</i> L.)</b>	
5.1. Resumen.	78
5.2. Abstract.	79
5.3. Introducción.	80
5.4. Materiales y Métodos.	83
5.5. Resultados y Discusión.	91
5.6. Conclusiones.	98
5.7. Literatura Citada.	99
<b>VI. VALOR NUTRITIVO Y NUTRACÉUTICO DE VARIEDADES</b>	<b>103</b>
<b>MEXICANAS DE HIGO (<i>Ficus carica</i> L.)</b>	
6.1. Resumen.	103
6.2. Abstract.	104
6.3. Introducción.	105
6.4. Materiales y Métodos.	106
6.5. Resultados y Discusión.	111
6.6. Conclusiones.	115
6.7. Literatura Citada.	116

<b>VII. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DEL DETERIORO POSTCOSECHA DE HIGO (<i>Ficus carica</i> L.)</b>	118
7.1. Resumen.	118
7.2. Abstract.	119
7.3. Introducción.	120
7.4. Materiales y Métodos.	122
7.5. Resultados y Discusión.	126
7.6. Conclusiones.	130
7.7. Literatura Citada.	131
<b>VIII. DISCUSIONES GENERALES</b>	133
8.1. Literatura Citada.	138
<b>IX. CONCLUSIONES GENERALES</b>	141

## ÍNDICE DE CUADROS

1	Características de las variedades de higo de mayor producción a nivel internacional.	16
2	Composición química de frutos de higo fresco y deshidratado.	20
3	Métodos de control de microorganismos en pre y postcosecha de higo.	26
4	Comportamiento de la producción de higo en México durante los últimos 30 años.	28
5	Solución nutritiva utilizada para la fertilización de plantas de higo de diferentes partes del centro de México.	48
6	Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de diferentes poblaciones del centro de México, utilizados para la caracterización morfológica de los frutos.	49
7	Características del fruto de diferentes poblaciones de higo del centro de México.	51
8	Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de diferentes poblaciones del centro de México, utilizados para la extracción de ADN.	66
9	Concentración y calidad del ADN obtenido de órganos de diferente edad de varias poblaciones de higo del centro de México.	70

10	Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de diferentes poblaciones del centro de México, utilizados para para el análisis de huellas de ADN.	84
11	Secuencias de los primers utilizados en el análisis de huellas de ADN de diferentes poblaciones de higo del centro de México.	86
12	Número de bandas totales y polimórficas y polimorfismo de los primers que generaron bandas de ADN visibles para la diferenciación molecular de poblaciones de higo del centro de México.	92
13	Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de la variedad Neza, utilizados para determinar el contenido de minerales, fenoles y antocianinas del fruto.	107
14	Composición mineral (mg 100 g de materia seca) de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero en diferentes épocas del año.	111
15	Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de la variedad Neza, utilizados para identificar las causas del deterioro postcosecha del fruto.	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

- 1 Partes de las flores e infrutescencias de higo. Las flores pistiladas de estilo corto y las flores estaminadas se encuentran en los higos silvestres. Las flores pistiladas de estilo largo se encuentran en los higos comestibles. La figura fue adaptada de Storey (1975) y Stover *et al.* (2007). 11
  
- 2 Periodo de producción de frutos de higo en función del tipo de higuera cultivada para la región de Israel. \*: La 3<sup>ra</sup> cosecha de las higueras Caprifig comienza en diciembre y continúa en enero del año siguiente. Las higueras tipo Común y San Pedro son bíferas o reflorescentes, es decir presentan dos flujos de producción al año. Las higueras tipo Smyrna son uníferas y producen una sola cosecha al año. La figura es de elaboración propia y fue adaptada del IPGRI (2003) y Flaishman *et al.* (2008). 14
  
- 3 Variedades de higo de mayor valor comercial en el mundo. La figura es de elaboración propia y fue adaptada con imágenes tomadas de diferentes sitios web: <http://figsfun.com/fvar-Sframes1.html>, <http://gofreshusa.com>.  
<http://photobucket.com/albums/ffPawgene/figs.html>.  
<http://www.gapphotos.com/images/figs.html>.  
<http://wahaiifruit.net>.  
<http://jmarchinifarms/figs.com>.  
<http://glutenfreelifestyleitaliangirl.com>. 19
  
- 4 Distribución del cultivo de la higuera en la República Mexicana. La figura es de elaboración propia y fue adaptada con información tomada del SIAP (2011) e imágenes tomadas del sitio web (<http://jmarchinifarms/figs.com>). 27
  
- 5 Características representativas del fruto de diferentes poblaciones de higo del centro de México. 52

- 6 Tamaño del fruto de diferentes poblaciones de higo del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámamac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), comparado con los estándares internacionales de higo (IPIGRI, 2003) y las variedades Sarylop (Ersoy *et al.*, 2008) y Black Mission (Condit, 1955; Storey 1977; CFAB, 2011). A) Biomasa fresca del fruto (g). B) Longitud del fruto (cm). C) Diámetro del fruto (cm). D) Longitud del cuello del fruto (cm). Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ). 54
- 7 Calidad de ADN de higo de órganos de diferente edad de varias poblaciones del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámamac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), verificada en geles de agarosa al 1 %. A) Hojas jóvenes. B) Hojas maduras. C) Frutos jóvenes. D) Frutos maduros. Los marcadores de 100 pb y 1Kb fueron utilizados como marcadores de ADN de peso molecular estándar. 72
- 8 Diseño de primers utilizando la secuencia del ADNc del gen AT5G6010 (Fruitfull) de *A. thaliana*. A) Alineamiento BLAST de la secuencia del ADNc de *A. thaliana* con varias especies de plantas. B) Coordenadas de los primers utilizados basándonos en la secuencia del ADN genómico del Fruitfull. 89
- 9 Huellas de ADN de diferentes poblaciones de higo del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámamac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), utilizando ISSRs. *A. thaliana* variedad Columbia (Col-0) fue incluida como testigo. A) Patrón de electroforesis de los productos de PCR corridos en geles de agarosa al 1 %. B) Patrón de electroforesis de los productos de PCR digeridos con las enzimas BgIII-BamHI, corridos en geles de poliacrilamida al 6 %. Los marcadores de 100 pb y 1Kb fueron utilizados como marcadores de ADN de peso molecular estándar. El panel inferior de los geles de poliacrilamida muestra una exposición más larga del área 93

entre 0.075 y 0.2 Kb.

- 10 Árbol filogenético (200 remuestreos) de diferentes poblaciones de higo del centro de México, basado en los patrones de electroforesis de los geles de poliacrilamida de los ISSRs, con tres repeticiones (A, B y C) de cada población. 94
- 11 Huellas de ADN de diferentes poblaciones de higo el centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), utilizando los primers específicos diseñados a partir del Fruitfull. *A. thaliana* variedad Columbia (Col-0) fue incluida como testigo. A) Patrón de electroforesis de los productos de PCR corridos en geles de agarosa al 1 %. B) Patrón de electroforesis de los productos de PCR digeridos con las enzimas BgIII-BamHI, corridos en geles de poliacrilamida al 6 %. Los marcadores de 100 pb y 1Kb fueron utilizados como marcadores de ADN de peso molecular estándar. El panel inferior de los geles de poliacrilamida muestra una exposición más larga del área entre 0.075 y 0.2 Kb. 96
- 12 Árbol filogenético (200 remuestreos) de diferentes poblaciones de higo del centro de México, basado en los patrones de electroforesis de los geles de poliacrilamida de los primers específicos diseñados a partir del Fruitfull, con tres repeticiones (A, B y C) de cada población. 97
- 13 Secuencia de extracción e identificación de compuestos fenólicos de frutos de higo por medio de HPLC. 110
- 14 Contenido de fenoles y antocianinas totales de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero en diferentes épocas del año. 113
- 15 Compuestos fenólicos identificados en frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero en diferentes épocas del año. 114

- 16 Infestación (%) de frutos de higo de la variedad Neza, tratados con diferentes compuestos seguros al 1 %. Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ). 127
- 17 Colonias de hongos desarrolladas en frutos de higo de la variedad Neza, tratados con diferentes compuestos seguros al 1 %. Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ). 127
- 18 Hongos causantes del deterioro postcosecha de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero. 128
- 19 Efectividad fungistática de diferentes compuestos seguros (1 %) aplicados en frutos de higo de la variedad Neza. Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ). 129

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La planta del higo (*Ficus carica* L.) y sus frutos han sido aprovechados por el hombre desde tiempos inmemoriales. Análisis arqueobotánicos revelaron que el higo común fue la primera planta cultivada en el mundo, precediendo a la domesticación de los cereales (Krislev *et al.*, 2006). La migración humana contribuyó a dispersar la planta fuera de su ambiente natural (Condit, 1955; Storey, 1977), y actualmente el higo es cultivado en 48 países alrededor del mundo (FAO, 2010). El higo es un componente florístico de la familia Moraceae, la cual incluye 37 géneros y más de 1,100 especies (Datwyler y Weiblen, 2004). El género *Ficus* se distribuye principalmente en climas cálidos y templados, y comprende aproximadamente 881 especies. Por esta razón, es considerado como el género de plantas más diverso en el mundo (Kumar *et al.*, 2011).

En México, la diversidad genética y morfológica de la planta de higo es completamente desconocida. Nosotros nos dimos a la tarea de coleccionar y propagar plantas de higo de poblaciones cultivadas en diferentes estados de la República Mexicana, con los propósitos de caracterizar la diversidad genética y morfológica de los higos mexicanos y de establecer el primer banco de germoplasma de higo en nuestro país. Tradicionalmente, los bancos de germoplasma resguardan descripciones morfológicas y etnobotánicas de materiales de diferentes especies con valor comercial, pero no incluyen información genética (García *et al.*, 2003).

La descripción morfológica de variedades se basa en la medición de un grupo de características fenotípicas que permita diferenciarlas entre sí (IPGRI, 2003). Este método es de amplia aplicación y permite separar a las plantas en grupos claramente distintos. Sin embargo, la aplicación de este método requiere de entrenamiento y experiencia de los evaluadores, y está sujeto a variaciones personales de apreciación (Gallegos *et al.*, 2005). El higo no es la excepción. Para reducir esos sesgos se han desarrollado guías técnicas que sirven como punto de comparación estándar para la evaluación de las características de interés. El IPGRI (International

Plant Genetic Resources Institute) ha reconocido la importancia de la caracterización de especies y variedades de higo, apoyándose en descriptores biológicos, agronómicos, morfológicos y químicos, cualitativos y cuantitativos. Las características más importantes son el hábito de crecimiento, número de cosechas al año, forma de polinización; longitud y diámetro del tallo, de la hoja y del fruto; longitud del lóbulo central de la hoja, del peciolo, del cuello y del pedúnculo; peso del fruto, color del exocarpio y de la pulpa, sabor, jugosidad, firmeza, contenido de sólidos solubles totales, y acidez total (IPGRI, 2003).

Por otro lado, el caracterizar la diversidad genética de cualquier especie vegetal mediante huellas de ADN representa muchas ventajas. Una de ellas es que éstas no son influenciadas por el ambiente ni por la etapa fenológica del cultivo (Valadez *et al.*, 2001). Estas huellas conocidas como polimorfismos de ADN o marcadores moleculares requieren de las técnicas de electroforesis para poder ser visualizadas en geles de agarosa o poliacrilamida (García, 2000).

Hasta el día de hoy, se han desarrollado al menos 40 tipos de marcadores moleculares (Semagn *et al.*, 2006; Sarwat, 2010). Los más comunes son los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los Microsatélites (SSR) (Semagn *et al.*, 2006; Sarwat, 2012). Los ISSR fueron desarrollados in 1994 a partir de regiones microsatelitales de 16 a 18 pares de bases (Khaled *et al.*, 2010). Los ISSR han adquirido popularidad debido a que son altamente polimórficos, delimitan secuencias altamente conservadas y son muy útiles en la identificación de variación natural en plantas (Sarwat, 2012). La efectividad de los ISSR ha sido confirmada por varios investigadores en especies como crisantemo (Palai y Rout, 2011), uva (Hassan *et al.*, 2011), y rosa (Jabbarzadeh *et al.*, 2010). Actualmente, los ISSR son considerados como una de las mejores opciones para realizar estudios sobre huellas genéticas de ADN, diversidad y estabilidad genética, marcación de genes, identificación de híbridos y variedades, variación somaclonal y calidad de la

producción (Jabbarzadeh *et al.*, 2010; Khaled *et al.*, 2010; Sarwat, 2012). Específicamente en higo, los ISSR han sido usados con propósitos de identificación varietal y determinación de relaciones filogenéticas entre variedades (Khadari *et al.*, 2003; Guasmi *et al.*, 2006; Mallikarjuna *et al.*, 2010).

En el contexto de esta investigación, se puede afirmar que la planta de higo fue introducida a México en 1683 por los misioneros españoles Franciscanos (Storey, 1977). Actualmente, el higo es cultivado comercialmente en 11 estados de la República Mexicana (SIAP, 2011). Sin embargo, en nuestro país no hay información acerca de la caracterización molecular o diversidad natural de variedades de higo, y en general se cree que los higos mexicanos son y representan a la variedad española Black Mission. En este estudio, nosotros encontramos y reportamos variación natural previamente no descrita de la morfología del fruto entre higos negros de diferentes partes de México. Para estudiar la variación genética entre variedades de higo negro del centro de México, nosotros realizamos una caracterización morfológica inicial y análisis de huellas de ADN basadas en una combinación de RAPDs, ISSRs y RFLPs. Nuestros resultados demuestran que los higos negros, inicialmente derivados de Black Mission, se han adaptado a las condiciones ambientales locales en el centro de México, generando con ellos variedades claramente distintas, las cuales representan diversidad genética valuable y previamente no descrita.

### **1.1. Objetivos**

1. Caracterizar poblaciones de higo del centro de México con base en la forma y otras características del fruto que ellas producen.
2. Establecer, validar, y proponer un método para la extracción de ADN de plantas de higo.

3. Caracterizar poblaciones de higo del centro de México, mediante huellas de ADN basadas en una combinación de RAPDs, ISSRs y RFLPs.
4. Determinar el valor nutritivo y nutracéutico de frutos de higo de la variedad Neza, con base en el contenido de minerales, fenoles y antocianinas.
5. Identificar las causas del deterioro postcosecha de frutos de higo de la variedad Neza y su control, basado en un análisis de efectividad de diferentes “compuestos seguros”.

## **1.2. Hipótesis**

### **Objetivo 1**

Ho: La diversidad morfológica de los frutos de higo provenientes de diferentes partes del centro de México, no se debe solamente a los efectos de las diferencias en condiciones ambientales donde éste se produce.

Ha: La diversidad morfológica de los frutos de higo provenientes de diferentes partes del centro de México, se debe únicamente a los efectos de las condiciones ambientales donde éste se produce.

### **Objetivo 2**

Ho: La concentración y la calidad del ADN varían en función de la edad y órgano de las plantas utilizadas para su extracción.

Ha: La concentración y la calidad del ADN son constantes y no son influenciadas por la edad ni por el tipo de órgano de las plantas que se usen para su extracción.

### **Objetivo 3**

Ho: Las diferencias genéticas entre higos de distintas partes de México pueden ser detectadas mediante huellas de ADN tipo RAPDs, ISSRs y RFLPs.

Ha: El análisis de huellas de ADN tipo RAPDs, ISSRs y RFLPs, no permitirá detectar diferencias genéticas entre higos provenientes de distintas partes de México.

### **Objetivo 4**

Ho: El contenido de minerales, fenoles y antocianinas de los frutos de higo, varía con la época del año, la región de origen o el tipo de higo.

Ha: El contenido de minerales, fenoles y antocianinas de los frutos de higo, no varía con la época del año, la región de origen o el tipo de higo.

### **Objetivo 5**

Ho: El deterioro postcosecha de los frutos de higo es causado por diversas clases de microorganismos.

Ha: El deterioro postcosecha de los frutos de higo no es causado por diversas clases de microorganismos.

## **1.3. Literatura Citada**

Condit, I. J. 1955. Fig Varieties: A Monograph. Hilgardia. 23 (11): 323-539.

Datwyler, S. L.; G. D. Weiblen. 2004. On the origin of the fig: phylogenetic relationships of moraceae from NDHF sequences. American Journal of Botany. 91(5): 767-777.

- FAO. 2010. Statistical Yearbook. Agricultural Production. Consultado en Marzo del 2012. Disponible en  
[<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>].
- Gallegos V., C.; A. F. Barrientos Priego; J. Cervantes H.; 2005. Manual gráfico para la descripción de nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-SAGARPA. Universidad Autónoma Chapingo. 116 p.
- García P., H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIG. 1 (2): 31-41.
- García Z., E. A.; G. E. García S.; E. Cárdenas C.; R. E. Vázquez A.; F. Zavala G.; A. Gutiérrez D. 2003. Clasificación y estimación de la diversidad genética de nopal (*Opuntia* spp.) en base a descriptores fenotípicos y marcadores genéticos moleculares. En: G. Esparza F.; M. A. Salas L.; J. Mena C.; R. D. Valdez C.; Memorias del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional Sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Zacatecas, Zacatecas. pp-95-100.
- Guasmi, F.; A. Ferchichi; L. Kadifafarés. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. African Journal of Biotechnology. 5 (15): 1370-1374.
- Hassan, H. A.; A. G. El-Homosany; H. Amina; M. A. Shaheen. 2011. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes (*Vitis vinifera* L.) Collection. World Applied Sciences Journal. 15 (10): 1369-1375.
- IPGRI. 2003. Descriptors for Fig. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, and International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies, Paris, France. 52 p.
- Jabbarzadeh, Z.; M. Khosh-khui; H. Salehi; A. Saberivand. 2010. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. African Journal of Biotechnology. 9 (37): 6091-6095.
- Khadari, B.; I. Hochu; S. Santoni; M. Ater; F. Kjellberg; A. Oukabli; J. P. Roger. 2003. Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. Acta Hort. 605: 69-75.

- Khaled, C.; B. Ghada; B. A. Ahmed; S. Olfa; M. Messaoud; T. Mokhtar; S. H. Amel. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochem Genet.* 48:789-806.
- Krislev, M. E. A. Hartmann; O. Bar-Yosef. 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science.* 312 (5778): 1273-1275.
- Kumar, A.; O. Bajpai; A. K. Mishra; N. Sahu S. K. Behera; L. B. Chaudhary. 2011. Assessment of Diversity in the Genus *Ficus* L. (Moraceae) of Katerniaghat Wildlife Sanctuary, Uttar Pradesh, India. *American Journal of Plant Science.* 2: 78-92.
- Mallikarjuna, K. A.; E. Stover; D. Velasco; A. Koehmstedt. 2010. Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). *Genética.* 138:681-694.
- Palai, S. K.; G. R. Rout. 2011. Characterization of new variety of *Chrysanthemum* by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira.* 29: 613-617.
- Sarwat, M. 2012. ISSR: Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols: A reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. In: Nikolaus J. Sucher et al. (eds.) *Methods in Molecular Biology.* 862: 103-121.
- Semagn, K.; B. Jornstad; M. N. Ndjiandjop. 2006. An overview of molecular markers method for plants. *African Journal of Biotechnology.* 5 (25): 2540-2568.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2011. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. México, D. F. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [\[www.siap.gob.mx/index.option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351\]](http://www.siap.gob.mx/index.option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351).
- Storey, W. B.; J. E. Enderud; W. F. Saleeb; E. M. Nauer. 1977. *The Fig: its biology, history, culture and utilization.* Jurupa Mountains Cultural Center, Riverside, California. 94 p.
- Valadez M., E.; K. Gunter; J. Ramser; B. Huttler; I. Rubluo. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 24:103-120.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Origen y distribución geográfica del higo

El higo común (*Ficus carica* L.) fue la primera planta cultivada en el mundo (Krislev *et al*, 2006). Su centro de origen no ha sido establecido claramente, ya que se trata de una especie de distribución mundial, identificada por primera vez en los países cercanos al Mediterráneo (Álvarez-Arbesú y Fernández-Prieto, 2000). Sin embargo, análisis moleculares recientes sugieren que el higo es originario de Turquía (Karandeniz, 2009). La migración humana contribuyó a dispersar la planta fuera de su ambiente natural, inicialmente en Arabia, Argelia, Egipto, España, Francia, Grecia, Italia, Libia, Marruecos, Palestina, Portugal, Túnez y Siria, y después en todo el mundo (Condit, 1955; Storey, 1977). Los romanos la distribuyeron entre los territorios que conquistaron y se cree que al iniciarse el coloniaje, los españoles introdujeron la planta de higo en el continente Americano, específicamente en el estado de California, Estados Unidos, a principios del siglo XVIII. De California la higuera fue distribuida en el sureste del país (Price y White, 1902).

En México, el higo fue introducido por los misioneros españoles en 1683 (Storey, 1977), quienes establecieron las plantas en los atrios de las iglesias en los estados de Hidalgo, Guanajuato, Morelos, San Luis Potosí y Zacatecas. Se cree que de ahí se distribuyó la plantación del árbol de higo en todo el país, y desde entonces es un componente importante de los huertos familiares (Parra, 1996). En el siglo XIX, el fruto de higo empezó a comercializarse en todo el territorio nacional como fruta fresca o cristalizada (Carballo, 1980). Años más tarde, en las principales zonas de producción de higo se establecieron algunas fábricas de dulces que empezaron a comercializar la fruta deshidratada y en almíbar (Sánchez y Martínez, 1987; Parra, 1996). Esto contribuyó para que entre 1927 y 1946 se incrementara la superficie del cultivo en un 255 %, consolidándose la oferta de esta fruta en el mercado nacional (Carballo, 1980).

## 2.2. Características botánicas del higo

**Raíz.** El sistema radical de la higuera es fibroso y superficial (20-45 cm de profundidad), se expande triplicando el tamaño de la copa (6-10 m) y es altamente eficiente en la absorción de agua y nutrimentos (Flores, 1990). Las plantas de un año de edad presentan raíces frágiles que se rompen con facilidad en la base del tallo. Las plantas de dos años de edad presentan raíces fuertemente unidas al tallo y son menos susceptibles a daños. En general, las plantas adultas se adaptan a suelos calizos y pobres en nutrientes, toleran la salinidad, el déficit de humedad prolongado, y son resistentes a nemátodos (Melgarejo, 2000). Sin embargo, cuando se cultivan en suelos arenosos muestran sensibilidad al ataque del nemátodo *Melodoygine incognita* (Flaishman *et al.*, 2008).

**Tallo.** La higuera presenta un tallo principal grueso de hasta 0.3 m de diámetro, con corteza lisa, de color gris pálido que se agrieta con facilidad porque es muy suave y delgada, provocando debilitamiento de la planta (Flores, 1990). El tallo desarrolla ramas primarias y secundarias cubiertas por una corteza fina, sin rugosidades. Los entrenudos son abultados y desarrollan hojas e inflorescencias en cada yema axilar (Flaishman *et al.*, 2008). En ambientes favorables para el crecimiento de la planta, los tallos son globosos, vigorosos y alcanzan los 10 m de altura. En contraste, en condiciones desfavorables, como la presencia de heladas o sequía prolongada, los tallos son compactos y pequeños (Flores, 1990). Las ramas del higo crecen de manera continua desde la primavera hasta el otoño, y el desarrollo del fruto tiene lugar de manera simultánea al crecimiento de las ramas, en las axilas de los brotes vegetativos (Melgarejo, 2000). Las ramas presentan dominancia apical, son de fácil enraizamiento y se utilizan para la propagación de la especie (Flores, 1990).

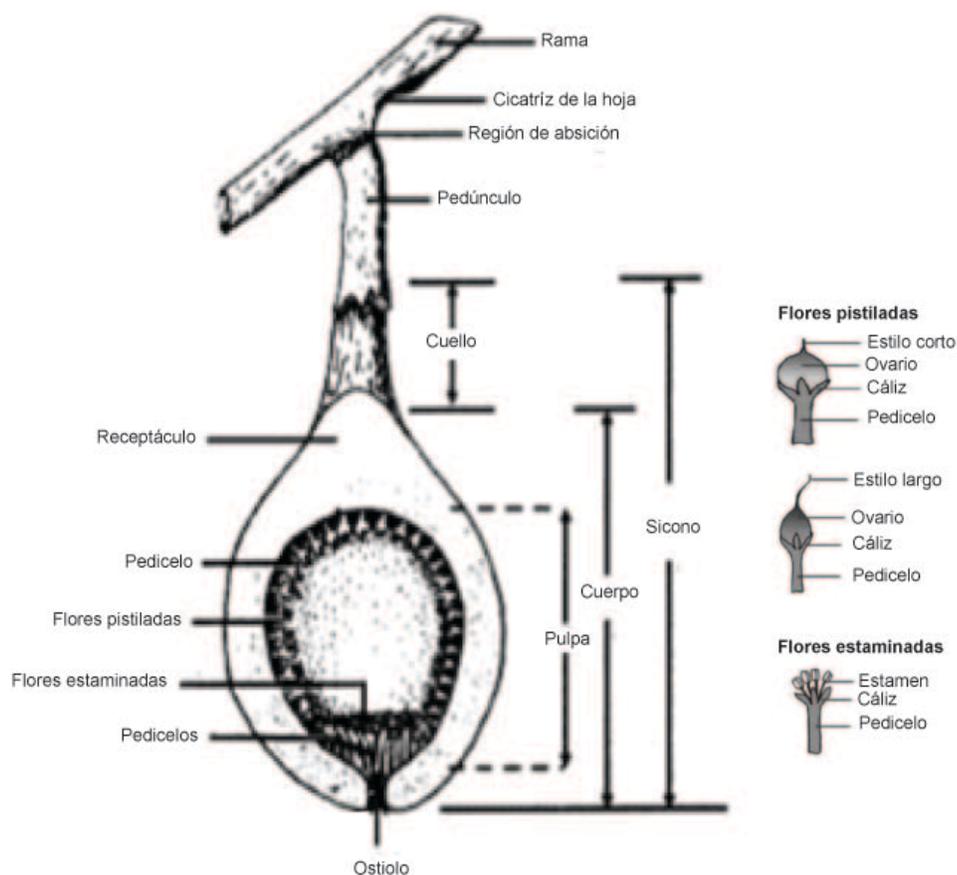
**Hoja.** Las hojas de la higuera son grades, de color verde intenso, de forma palmeada con tres a siete lóbulos, muy reticuladas por el envés y con peciolo largo y grueso (Flores, 1990). Presentan filotaxia alterna, crecen durante la primavera y permanecen en la planta hasta que las temperaturas bajas del otoño provocan su

caída. Una característica distintiva de la higuera es la producción abundante de látex en las hojas y todos los tejidos verdes de la planta (Flores, 1990). El látex es sumamente tóxico y venenoso, por lo que es utilizado como sistema de defensa, pudiendo causar la muerte de herbívoros, vertebrados, insectos y microorganismos (Melgarejo, 2000).

**Flor.** Las flores de la higuera se encuentran dentro de un receptáculo carnoso (Figura 1). Las flores femeninas presentan cinco pétalos de color rosa o blanquecino, un solo carpelo, ovario súpero, estilo largo o corto y estigma bífido (Figura 1); se distribuyen de forma irregular en la inflorescencia y solo pueden ser observadas seccionando el receptáculo. Las flores masculinas presentan tres sépalos y cuatro estambres; se localizan en la entrada del ostiolo (Figura 1) y solo pueden ser observadas al momento de la apertura de las brácteas que las protegen (Flores, 1990). Las plantas de higo pueden ser monóicas, si las flores masculinas y femeninas están presentes en la misma planta, o dióicas, si las flores masculinas y femeninas se encuentran en plantas separadas (Beck y Lord, 1988).

**Fruto.** El receptáculo floral se hincha y se vuelve carnoso por la fecundación, desarrollando infrutescencias conocidas como brevas o higos, pero no existen diferencias entre brevas e higos, solo la diferenciación temporal en su desarrollo y maduración (Flaishman *et al.*, 2008). Las infrutescencias (Figura 1) son siconos blandos de sabor muy dulce, cubiertos por un exocarpio muy delgado de colores variados como amarillo, café, morado, rojo o verde, según la variedad (Solomon *et al.*, 2006), que contienen pequeños aquenios que semejan semillas, pero son en realidad los frutos verdaderos (Melgarejo, 2000). Morfológicamente, las infrutescencias pueden ser ovoides o piriformes. Los frutos ovoides son más anchos en la parte media, mientras que los frutos piriformes son más anchos cerca del ostiolo. El ostiolo puede ser pequeño, mediano o grande, mientras que la cavidad interna puede estar ausente, ser muy pequeña, pequeña, mediana, grande o muy grande. El tamaño de los frutos puede ser pequeño (29-46 mm de longitud y 28-38 mm de diámetro), mediano (29-54 mm de longitud y 38-49 mm de diámetro), grande

(54-75 mm de longitud y 50-60 mm de diámetro), o muy grande (> 75 mm de longitud y > 60 mm de diámetro). El tamaño del cuello puede ser corto (< 5 mm de longitud), mediano (5-10 mm de longitud), o largo (> 10 mm de longitud). El pedúnculo puede ser largo y delgado, corto y grueso, o largo y grueso. El color de la pulpa puede ser blanco-amarillo, ámbar, rosa, rojo, o rojo oscuro. El albedo puede presentar coloraciones claras o intensas. La firmeza puede ser baja, media, o alta. El contenido de sólidos solubles puede ser bajo (10-13 %), medio (13.1-16 %), alto (16-20 %), o muy alto (> 20 %). La acidez titulable expresada como porcentaje de ácido cítrico varía de < 0.05 - > 3 % (IPGRI, 2003).



**Figura 1.** Partes de las flores e infrutescencias de higo. Las flores pistiladas de estilo corto y las flores estaminadas se encuentran en los higos silvestres. Las flores pistiladas de estilo largo se encuentran en los higos comestibles. La figura fue adaptada de Storey (1975) y Stover *et al.* (2007).

Las infrutescencias de higo se desarrollan de manera similar a una yema. Cuando las brácteas se abren para dar paso al receptáculo, miden de 2 a 4 mm; posteriormente, el crecimiento continúa, y en un lapso de 6 a 7 semanas llegan a los 2 o 4 cm de longitud. La infrutescencia continúa su crecimiento y alcanza su tamaño máximo en la etapa de envero, que es cuando la infrutescencia se encuentra en madurez comercial. El periodo de desarrollo de yema a fruto maduro varía de 115 a 121 días (Melgarejo, 2000). Conforme avanza la maduración, internamente se produce el cambio de color blanco a amarillo, púrpura, rosa o rojo, mientras que externamente se desarrolla el color característico de la variedad (Solomon *et al.*, 2006). A partir de que el fruto alcanza la maduración completa se produce el agrietamiento de la piel, y si no se cosecha se desprende del árbol en pocos días (Melgarejo, 2000).

### **2.3. Clasificación taxonómica del higo**

El género *Ficus* comprende especies cultivadas y especies silvestres que varían en las características fenotípicas de la planta y del fruto (Condit, 1955; Flaishman *et al.*, 2008). Sin embargo, toda esa variación está representada en taxones básicos, como los que se muestran a continuación:

- Reino: Vegetal.
- Subreino: Tracheobionta.
- División: Magnoliophyta.
- Clase: Magnoliopsida.
- Orden: Rosales.
- Familia: Moraceae.
- Subfamilia: Ficeae.
- Género: *Ficus*.
- Subgénero: *Ficus*.
- Especie: *F. carica*.

El higo es un componente florístico de la familia Moraceae. Esta incluye 37 géneros y más de 1,100 especies que son utilizadas para la producción de fruto o madera (Datwyler y Weiblen, 2004). El género *Ficus* es el más diverso en el mundo, y comprende aproximadamente 881 especies que se distribuye principalmente en climas cálidos y templados (Kumar *et al.*, 2011). La especie *F. carica* es conocida por sus frutos comestibles por humanos y animales, mientras que *F. elastica* y *F. microcarpa* se utilizan con propósitos ornamentales (Beck y Lord, 1988).

#### 2.4. Tipos de higueras

Con base en la forma de polinización y el número de cosechas producidas al año, se han descrito cuatro tipos de higueras (Toribio y Montes, 1996; Melgarejo, 2000; Ilgin *et al.*, 2007):

1. **Higueras comunes.** Las plantas presentan flores hermafroditas. Los frutos son partenocárpicos, se autopolinizan pero no ocurre fecundación; el fruto se desarrolla por el estímulo que ocasiona el grano de polen sobre el estigma, no producen semillas y producen una o dos cosecha al año (Figura 2). Se cultivan en España, Estados Unidos y México (Melgarejo, 2000; Aguilera *et al.*, 2009; CFAB, 2011). La variedad Black Mission pertenece a este tipo de higueras (Flaishman *et al.*, 2008).
2. **Higueras tipo Smyrna.** Las plantas presentan flores dióicas y requieren polinización. Los frutos desarrollan semillas y producen una sola cosecha al año (Figura 2). Se cultivan principalmente en el continente Africano y Europeo (Toribio y Montes, 1996; Melgarejo, 2000). Las variedades Sarylop, Marabout y Zidi son algunos ejemplos de este tipo de higueras (Flaishman *et al.*, 2008).
3. **Higueras tipo San Pedro.** Las plantas presentan flores dióicas. Los frutos son partenocárpicos en la primera cosecha y requieren polinización en la segunda

cosecha (Figura 2). Se cultivan en España y Estados Unidos (Melgarejo, 2000). A este tipo de higueras pertenecen las variedades Dauphine, King y San Pedro (Flaishman *et al.*, 2008).

4. **Higueras Caprifig.** También son conocidas como higueras silvestres. Las plantas presentan flores dióicas, producen tres cosechas al año (Figura 2), pero los frutos no son comestibles, solamente se utilizan como fuente de polen. Este tipo de higos son los hospederos de la avispa polinizadora *Blastophaga senes*. Por esta razón se cultivan en todas las regiones productoras de higos tipo Smyrna y San Pedro (Melgarejo, 2000; Ilgin *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Periodo de producción de frutos de higo en función del tipo de higuera cultivada para la región de Israel. \*: La 3<sup>ra</sup> cosecha de las higueras Caprifig comienza en diciembre y continúa en enero del año siguiente. Las higueras tipo Comun y San Pedro son bíferas o reflorescentes, es decir presentan dos flujos de producción al año. Las higueras tipo Smyrna son uníferas y producen una sola cosecha al año. La figura es de elaboración propia y fue adaptada del IPGRI (2003) y Flaishman *et al.* (2008).

Además del tipo de higuera, la fecha de maduración de los frutos de higo varía en función de la variedad, las condiciones ambientales y de manejo agronómico del cultivo. La maduración se considera temprana si ocurre antes del mes de julio, y tardía si se presenta después del mes de agosto (Sánchez y Martínez, 1987; IPGRI, 2003). El periodo de cosecha de higo puede ser muy compacto (< 15 días), compacto (15-20 días), mediano (21-40 días), amplio (41-60 días), o muy amplio (> 60 días) (IPGRI, 2003). Cuando es compacto, las infrutescencias conservan el tamaño. En contraste, cuando es amplio, las infrutescencias presentan diferentes tamaños (Flores, 1990). Durante el otoño los frutos son de menor calidad, alcanzan menor tamaño, presentan coloración desuniforme, y contenido de sólidos solubles más bajo (< 14 %) (Baccaunaud *et al.*, 1995). Después de la cosecha, la planta de higo entra en reposo, pero sus requerimientos de frío invernal son mínimos. En España, temperaturas de 16 °C son suficientes para que la planta salga de ese estado. Para disminuir pérdidas por falta de frío, se realizan aplicaciones de cianamida de hidrógeno al 3 %, 30 a 60 días antes de la brotación (Melgarejo, 2000).

## 2.5. Variedades de higo

Aproximadamente 607 variedades de higo han sido descritas (Condit, 1955; Toribio y Montes, 1996; Álvarez-Arbesú y Fernández-Prieto, 2000). De estas, solo 46 son las más cultivadas en todo el mundo (Cuadro 1) (Flaishman *et al.*, 2008), y 28 han sido descritas como resistentes a bajas temperaturas (Price y White, 1902). A nivel internacional, la producción comercial de frutos de higo se basa en las variedades Adriatic, Black Mission, Brown Turkey, Conadria, Kadota y Sarylop (Figura 3). Con excepción de Black Mission, la variedad partenocárpica de mayor producción en California, Estados Unidos (CFAB, 2011), todas estas variedades pertenecen a las higueras tipo Smyrna o de polinización cruzada, y producen una sola cosecha al año (Piga *et al.*, 2003; Koyuncu, 2004; Flaishman *et al.*, 2008; El-Gharably *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2010; Xanthopoulos *et al.*, 2010).

**Cuadro 1. Características de las variedades de higo de mayor producción a nivel internacional.**

Cultivar	Tipo de higuera	Región de cultivo	Tamaño del fruto	Color del exocarpio	Color del mesocarpio	Uso
Abicouy	Común	Francia	Mediano	Negro	Rojo	F/D
Adriatic	Común	USA	Pequeño	Verde/Amarillo	Rojo	F/D
Allomi	Smyrna	Irán	Mediano	Morado/Negro	Amarillo	F
Alma	Común	USA	Pequeño	Amarillo	Ámbar	F
Bardacik	Smyrna	Turquía	Pequeño	Verde claro	Rosa oscuro	F
Black Mission	Común	USA España México	Mediano	Negro	Rosa/Púrpura	F
Beall	Común	USA	Mediano	Violeta	Rosa claro	F
Beyaz orak	San Pedro	Turquía	Pequeño	Verde/Café	Rosa claro	F
Brawswic	Común	China	Grande	Café claro	Ámbar	F
Brown Turkey	Común	USA Israel	Grande	Café oscuro	Amarillo	F/D
Bursa Siyahi	Smyrna	Turkey	Grande	Violeta/Negro	Rosa/Rojo	F
Celeste	Común	USA	Pequeño	Violeta/Café	Ámbar	F
Chichek	Común	Turquía	Mediano	Negro	Rojo	F/D
Conadria	Común	USA	Mediano	Verde/Amarillo	Rosa claro	D
Cuello de Dama	Común	Chile España Francia	Mediano	Verde	Rojo	F
Dalmatic	Común	Francia	Grande	Verde	Rojo	F
Dauphine	San Pedro	Francia	Mediano	Verde	Rosa/Rojo	F
Goklop	Smyrna	Turquía	Muy grande	Verde/amarillo	Rosa/Rojo	F/D

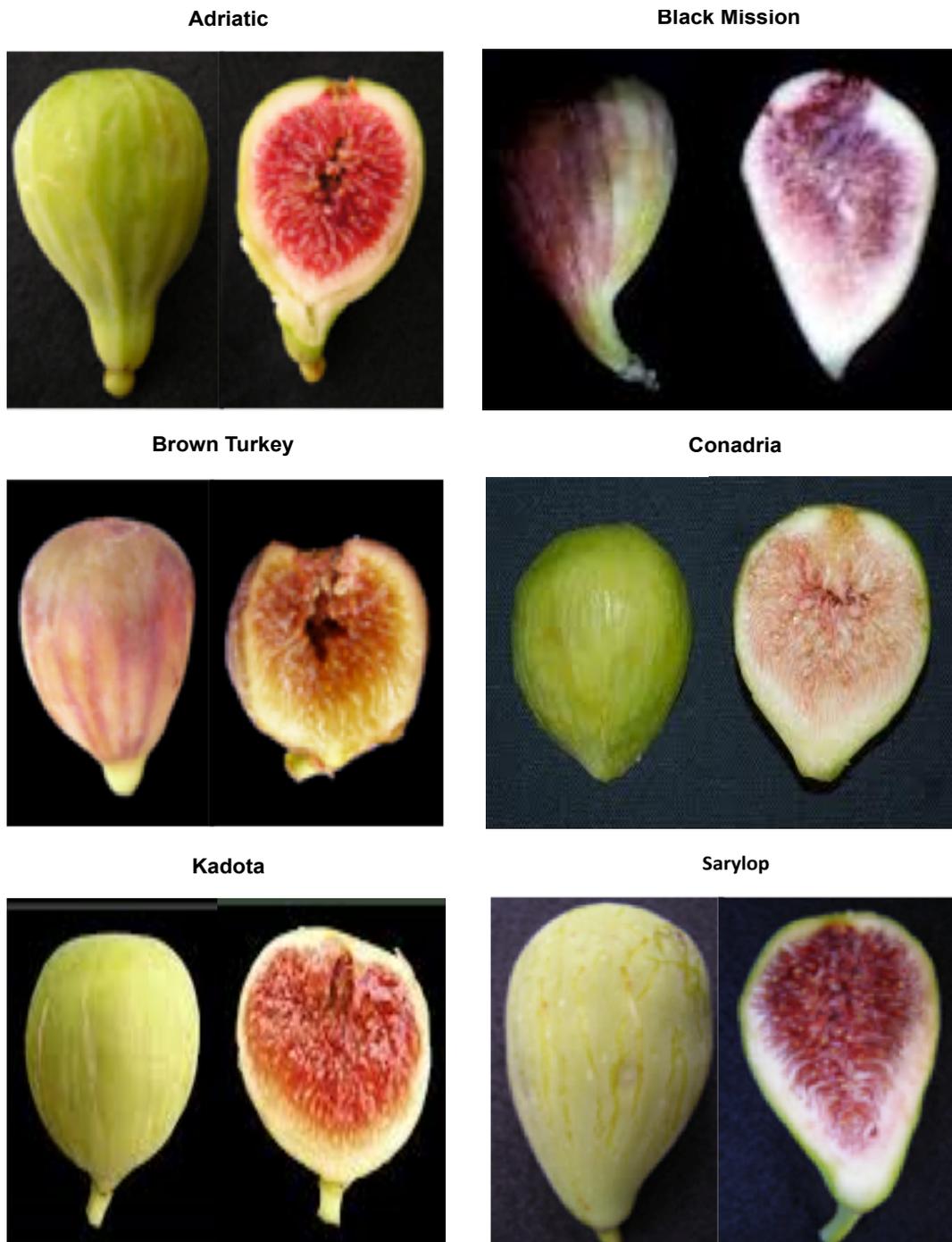
**Cuadro 1. Características de las variedades de higo de mayor producción a nivel internacional (continuación).**

Cultivar	Tipo de higuera	Región de cultivo	Tamaño del fruto	Color del exocarpio	Color del mesocarpio	Uso
Kadota	Común	Chile Italia USA	Mediano	Verde/Amarillo	Amarillo	F
Kalomon	Smyrna	Grecia	Grande	Verde	Ámbar	F/D
Kashky	Smyrna	Irán	Mediano	Amarillo	Rojo	F/D
Kshany	Común	Irán	Grande	Amarillo	Rojo	F
King	San Pedro	USA	Mediano	Rojo	Ámbar	F
Lampa	San Pedro	España	Mediano	Verde/Morado	Ámbar	F/D
Preta	Pedro	Italia				
Lampiera	San Pedro	Portugal	Mediano	Café claro	Rosa	F
Mangefy	Común	Irán	Grande	Amarillo	Amarillo	F
Masui	Común	Japón	Grande	Morado	Rosa	F/D
dauphine						
Meshky	Común	Irán	Grande	Morado/Negro	Rojo	F/D
Neri	Común	Italia	Mediano	Negro	Rojo	F
Panache	Común	USA	Mediano	Verde/Amarillo	Rosa/Rojo	F
Ponte de la gada	San Pedro	Italia	Mediano	Verde/Morado	Rosa	F
Roshnick	Común	Albania	Pequeño	Café	Amarillo	D
Sabz	Smyrna	Irán	Grande	Amarillo	Ámbar	F/D
Shah-anjer	Smyrna	Irán	Grande	Verde/Amarillo	Amarillo	F/D
San Pietro	Smyrna	Italia	Pequeño	Verde	Amarillo	D

**Cuadro 1. Características de las variedades de higo de mayor producción a nivel internacional (continuación).**

Cultivar	Tipo de higuera	Región de cultivo	Tamaño del fruto	Color del exocarpio	Color del mesocarpio	Uso
Sarylop	Smyrna	USA Turquía	Grande	Verde/Amarillo	Ámbar	D
Sierra	Común	USA	Grande	Amarillo	Rosa claro	F
Siyah	Smyrna	Irán	Mediano	Morado	Rosa/Rojo	F
Siyah	Común	Turquía	Grande	Morado	Rosa oscuro	F
incir						
Siyah	Común	Turquía	Pequeño	Morado/Negro	Rojo	F
orak						
Sultani	Común	Egipto Turquía	Mediano	Morado/Café	Rosa	F/D
Verde	Smyrna	Italia	Pequeño	Rojo	Ámbar	D
Tsapela	Smyrna	Grecia	Mediano	Amarillo	Ámbar	D
Yesilguz	Smyrna	Turquía	Grande	Verde claro	Rojo oscuro	F
Zard	Común	Irán	Grande	Amarillo	Amarillo	F
peazi		Marruecos				
Zidi	Smyrna	Turquía	Muy grande	Morado/Negro	Rojo	F/D

**Fuente:** Elaboración propia con información tomada de Condit (1955), Storey (1977), Piga *et al.* (2003), Koyuncu (2004), Flaishman *et al.* (2008), El-Gharably *et al.* (2009), Sen *et al.* (2010), Xanthopoulos *et al.* (2010). \*F: fresco, F/D: fresco y deshidratado, D: deshidratado.



**Figura 3.** Variedades de higo de mayor valor comercial en el mundo. La figura es de elaboración propia y fue adaptada con imágenes tomadas de diferentes sitios web: <http://figsfun.com/fvar-Sframes1.html>, <http://photobucket.com/albums/ffPawgene/figs.html>, <http://wahaiifruit.net>, <http://jmarchinifarms/figs.com>, <http://glutenfreelifestyleitaliangirl.com>, <http://gofreshusa.com>.

## 2.6. Propiedades nutritivas y nutracéuticas del higo

El higo contiene sustancias nutritivas como las vitaminas, minerales, carbohidratos, proteínas y fibra dietética, que ayudan al crecimiento y desarrollo en niños (Cuadro 2). La proporción de cada componente varía de acuerdo con factores diversos, como las condiciones edafoclimáticas del cultivo, la especie, la variedad y la etapa de desarrollo del fruto (Baccaunaud *et al.*, 1995; Ersoy *et al.*, 2007).

**Cuadro 2.** Composición química de frutos de higo fresco y deshidratado.

Nutriente	Cantidad (100 g de porción)	
	Fruto fresco	Fruto deshidratado
Vitamina A	2.0 mg	0.0 mg
Vitamina C	2.0 mg	1.0 mg
Vitamina B6	0.11 mg	0.11 mg
Calcio	35.0 mg	162.0 mg
Potasio	232.0 mg	680.0 mg
Magnesio	17.0 mg	68.0 mg
Sodio	1.0 mg	10.0 mg
Fierro	0.07 mg	67.0 mg
Fósforo	14.0 mg	167.0 mg
Zinc	0.15 mg	0.55 mg
Carbohidratos	19.18 g	63.87 g
Proteínas	0.75 g	3.30 g
Fibra dietética	2.90 g	9.80 g
Agua	79.11 %	30.05 %
Cenizas	0.66 g	1.86 g
Valor energético	74.0 kcal	249.0 kcal

Fuente: INCAP (2012).

En frutos de higo maduros de las variedades Bursa Siyahi, Jemaáoui, Magouli, Rogabi, Wedlani y Zidi, las sustancias nutritivas más abundantes son la glucosa (3.49), fructosa (2.54), y los minerales como el calcio (162.0-295.86), magnesio (68.0-71.64), potasio (680.0-739.75), fósforo (67.0), sodio (10.0-28.95), hierro (2.03), y zinc (1.25), mg por 100 g de materia seca (Aljane *et al.*, 2007; Ersoy *et al.*, 2007).

El higo no contiene grasa ni colesterol, y es fuente de benzaldehído, un compuesto anticancerígeno (Slavin, 2006). El valor energético elevado del higo (74 kcal), derivado de su contenido de azúcares, convierten al fruto de higo en un producto energizante, ideal para el consumo de personas con desgaste físico, niños en crecimiento, estudiantes y deportistas (USDA, 2005).

El estudio de las propiedades nutracéuticas del higo, como los fenoles y antocianinas, ha cobrado importancia debido a que mejoran la calidad de vida del humano, manteniendo niveles adecuados de salud y previniendo enfermedades crónicas (Vinson, 1999; Piga *et al.*, 2008; El Gharras, 2009). En higos frescos, los compuestos fenólicos varían de 1000 a 1100 mg kg<sup>-1</sup> (Vinson, 1999), y las antocianinas se presentan en cantidades de 162 mg kg<sup>-1</sup> (Aguilera *et al.*, 2009). En particular, la variedad Black Mission posee los contenidos más altos de antocianinas, por lo que está considerada como la variedad que presenta la capacidad antioxidante más elevada (36 %) de todos los tipos de higueras y colores del fruto (Solomon *et al.*, 2006).

## **2.7. Indicadores de cosecha del higo**

El color y la firmeza del fruto de higo son los indicadores de cosecha más importantes (Celikel y Karacali, 1998; Oezeker y Isfendiyaroglu, 1998; Brien y Hardy, 2002; Rodov *et al.*, 2002; Souza y Ferraz, 2005; Colares y De Oliveira, 2009). Los frutos deben ser cosechados cuando alcanzan la madurez completa. Cuando el fruto se destina al consumo en fresco, debe estar completamente coloreado y firme.

Cuando se usa para deshidratación solar, en algunos lugares como Turquía o Marruecos, se deja madurar en el árbol hasta que se desprenda por si solo (Brien y Hardy, 2002).

En las variedades de higo conocidos como Bardacik, Cicek, Ciftlikkoy, Kurabakunya, Irimor, Ovacik y Yesilkapli, la firmeza del fruto varía de 0.20 a 1.20 kg cm<sup>-2</sup> (Oezeker y Isfendiyaroglu, 1998). Las diferencias se atribuyen a la geometría asimétrica, cavidad interna (a mayor tamaño menor calidad), contenido de fibra, tipo de tejido y resistencia mecánica del fruto, que en general es baja (Souza y Ferraz, 2005).

En particular, el mejor indicador para la cosecha de frutos de higo de la variedad Roxo de Valinhos, es una deformación del 10 % con respecto a la forma original del fruto (Colares y De Oliveira, 2009). Para Black Mission, el criterio óptimo es un color entre morado claro y oscuro, sintiéndose suaves al tacto con ligera presión; mientras que para los higos tipo Smyrna, el color debe ser blanco amarillento o amarillo claro y ser completamente firmes (Crisosto *et al.*, 2002). La variedad Brazilian presenta diferentes indicadores de cosecha, dependiendo de la época del año, siendo conveniente recolectarlo en verano, cuando desarrolla de un 70 a 90 % de coloración morada y son firmes. En otoño, los frutos deben exhibir más de un 90 % de color morado y ser un poco suaves (Rodov *et al.*, 2002).

En los principales países productores de higo, en la mayoría de las variedades, el momento óptimo para la cosecha es cuando la piel se agrieta. Sin embargo, por cuestiones de apariencia, los consumidores prefieren frutos sin rajaduras, lo que obliga a que la infrutescencia se coseche en madurez fisiológica. El agrietamiento coincide con la madurez de consumo, pero si no se consume se debe deshidratar para que pueda almacenarse (Melgarejo, 2000).

## 2.8. Fisiología y vida de anaquel del higo

El higo pertenece al grupo de los frutos climatéricos. Su tasa de respiración y producción de etileno es moderada, con valores de 10 a 20 mg CO<sub>2</sub> kg h<sup>-1</sup> y de 1 a 10 μl C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> kg h<sup>-1</sup>, respectivamente (Kader, 2002). Cuando el fruto está completamente maduro es exageradamente suave, altamente perecedero y muy susceptible a daños mecánicos, por lo que su vida de anaquel es de dos días cuando más (Venditti *et al.*, 2005).

En primavera, después de la cosecha, los frutos de higo muestran un comportamiento climatérico, con cambios en color, firmeza y contenido de sólidos solubles; pero en otoño, muchos de esos cambios no ocurren, porque son fuertemente afectados principalmente por las temperaturas inferiores a 10 °C (Melgarejo, 2000). En general, la síntesis de azúcares se incrementa significativamente en el fruto dos semanas antes de la cosecha (Yahata y Nogata, 1999).

La principal restricción para la comercialización del fruto fresco es su corta vida de anaquel, la cual no supera los dos días debido principalmente al acelerado proceso de maduración y crecimiento de patógenos (Venditti *et al.*, 2005), a técnicas de cosecha (manual o mecánica), a transporte, empaque y condiciones de almacenamiento inadecuadas como frutos a granel, sin empaque, a temperatura y humedad relativa ambiental (Lima *et al.*, 2005).

Los frutos de higo que se almacenan a 15 °C durante una semana, presentan un rápido ablandamiento de los tejidos, disminución de azúcares totales, firmeza del fruto, y decoloración de la piel cuatro días después de la cosecha, comparados con los frutos almacenados a 5 °C, los cuales disminuyen su firmeza y contenido de azúcares totales lentamente (Yahata y Nogata, 2000). Por otro lado, los frutos almacenados a 2 y 8 °C y 90 % de humedad relativa durante dos semanas, disminuyen su peso entre un 10.1 y 16.9 % (Venditti *et al.*, 2005).

El uso de películas plásticas como empaque en frutos de higo fresco, almacenados a 1 °C y 70 % de humedad, permiten almacenar los frutos por 15 días, además de conservar el aspecto externo y textura del fruto. En contraste, los frutos refrigerados bajo las mismas condiciones de almacenamiento sin empaque, después de 10 días presentan altos valores de jugosidad (Gawade y Waskar, 2005).

Las atmósferas modificadas con 60, 70, 80 y 90 % de CO<sub>2</sub>, permiten alargar la vida de anaquel por 30 días, retardar la tasa de ablandamiento, y conservar la apariencia visual de frutos de higo de la variedad Masudohin, almacenados a 0 °C, sin afectar el contenido de acidez y sólidos solubles (Park y Jung, 2000). En frutos de la variedad Craxiou de Porcu, las atmósferas modificadas con 100 % de CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub>, mantienen la frescura de los frutos durante una semana y disminuyen las pérdidas postcosecha de un 30 a 55 % (D'Aquino *et al.*, 1998).

Con atmósferas controladas a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> disminuye la velocidad de respiración y la tasa de producción de etileno, pero incrementa la producción de etanol y acetaldehído en higos tipo Calymirna y Black Mission (Colelli y Kader, 1994). Para conservar buena calidad de estas variedades, se recomienda almacenarlos a temperaturas de 0 a 5 °C, en atmósferas enriquecidas con 15 a 20 % de CO<sub>2</sub> (Colelli y Kader, 1991).

Las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (2 %) y altas concentraciones de N<sub>2</sub> (98 %), son más efectivas en la conservación de frutos de higos de la variedad Mavra (de color morado), almacenados a -1 °C. Bajo estas condiciones de almacenamiento, disminuye la velocidad de respiración y la tasa de producción de etileno, se mantiene la firmeza y los cambios en coloración de la pulpa o la piel, y los cambios en contenido de sólidos solubles y acidez titulable no son significativos (Tsantili *et al.*, 2003). Se debe tomar en cuenta que el tiempo de conservación de los frutos varía en función de la temperatura, humedad relativa, composición de la atmósfera seleccionada, la variedad y la etapa de maduración del fruto (Kader, 2003).

## 2.9. Control de microorganismos en higo

El método de control predominante de microorganismos en higos frescos sigue siendo el químico. Sin embargo, existe una tendencia a utilizar métodos alternativos y sustancias que no causan daños en la salud humana ni en el medio ambiente, como los llamados “compuestos seguros” (Cuadro 3). Estos compuestos, conocidos en Inglés como GRAS (Generally Recognized as Safe), son utilizados para el control de microorganismos en frutos frescos y como tratamientos microbianos pre y pos deshidratación, para la conservación de los frutos por periodos prolongados (Lima *et al.*, 2005; Venditti *et al.*, 2005).

Los compuestos seguros, como el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) en concentraciones de 0.5 al 3 %, han sido utilizados en la variedad de higo Craxiou de Porcu como posibles alternativas para el control de *Botrytis cinerea*, previo al almacenamiento de los frutos frescos (2 y 8 °C y 90 % de humedad relativa) por dos semanas. El bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 0.5 %, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 3 %, y ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) al 1 %, se han probado en frutos de chabacano, granada, kiwi y naranja. En todos los casos, los tratamientos han sido exitosos, logrando reducir en forma significativa las pérdidas postcosecha causadas por pudrición o sobremaduración del fruto. Además, el cloruro de calcio generó un incremento variable en la firmeza (Antunes *et al.*, 2007).

El agua caliente (30 °C por 65 min y 80 °C por 16 min) combinada con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 2.5 %, se han utilizado para controlar la carga microbiana en frutos de higo de la variedad Sarylop. Sin embargo, no se ha alcanzado un buen control de los microorganismos, pues la cantidad de bacterias encontradas en los frutos es elevada (2.20-2.73 cfu g<sup>-1</sup>), y no hay ningún control sobre levaduras (26.5 cfu g<sup>-1</sup>) (Demirbucker *et al.*, 2004).

**Cuadro 3.** Métodos de control de microorganismos en pre y postcosecha de higo.

Método	Concentración/ T (°C )	Tiempo	Forma de aplicación	Patógenos controlados	Eficiencia (%)
<b>Compuestos seguros</b>					
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5-3 %	NR	NR	<i>B. cinerea</i>	90-98
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	25-100 ppm	NR	NR	<i>B. cinerea</i>	90-98
Calor	30 °C	65 min	Inmersión	Bacterias	0
	80 °C	16 min	Inmersión	mesofílicas	0
Calor y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	80 °C 2.5 %	16 min	Inmersión	Levaduras	3-40
Ozonificación	1-10 ppm	3-5 h	Vacío	Bacterias mesofílicas	16-100
				Coliformes, Levaduras y hongos	11-70
	0.1-1.0 ppm	1 h	Vacío	<i>E. coli</i>	8-50
	1-9 ppm	1 h	Vacío	<i>B. cereus</i>	57-64
<b>Rayos Uv</b>	NR	1-2 h	Radiación	Hongos toxígenos	94 %

**Fuente:** Elaboración propia con información tomada de Antunes *et al.* (2003); Demirbuker *et al.* (2004); Venditti *et al.* (2005); Molinu *et al.* (2006); Oztekinet *al.* (2006); Antunes *et al.* (2007); Isman y Biyik (2008); Yelsicimen y Ozdemir (2008).

En general, la efectividad que se logra en el control de levaduras, hongos y bacterias de los frutos de higo, depende de las características del tratamiento que se utilice, la dosis de aplicación de las sustancias utilizadas, y el tiempo de exposición del fruto. Se sugiere evitar el contacto de los frutos cosechados con el suelo, ya que ahí se aloja una gran cantidad de esporas de diferentes microorganismos (Karaca y Nas, 2008).

## 2.10. Cultivo del higo en México

La higuera es una especie vegetal tolerante a la sequía que ofrece muchas ventajas de producción en amplias regiones ecológicas de México. Después de su introducción en nuestro país por los misioneros españoles (Storey, 1977), la higuera se convirtió en un componente importante de los huertos familiares (Parra, 1996). La planta crece en toda la República en forma de poblaciones naturales. Sin embargo, es cultivada a campo abierto en condiciones de secano solo en algunos estados (Figura 4). Desde 1980, la superficie sembrada (ha) y la producción (Ton) de higo a nivel nacional ha sufrido fluctuaciones, debido a que la época de cosecha del fruto (junio-julio) coincide con la época de lluvias, lo que favorece la infección por patógenos y causando pérdidas de biomasa, cambios de color, sabor y textura del fruto, y pérdidas postcosecha hasta del 50 % (Sánchez y Martínez, 1987; Chimi *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Distribución actual del cultivo de la higuera con fines comerciales en la República Mexicana. La figura es de elaboración propia y fue adaptada con información tomada del SIAP (2011) e imágenes tomadas del sitio web (<http://jmarchinifarms/figs.com>).

Para disminuir las pérdidas postcosecha elevadas de higo, los productores tradicionalmente recurren a la cristalización de los frutos. Este método postcosecha ha resultado ser eficiente para conservar los frutos por más tiempo, extender su periodo de comercialización, e inhibir el desarrollo de microorganismos. Sin embargo, la principal desventaja de la cristalización es que eleva la cantidad de azúcares totales de los frutos y además los frutos presentan un contenido mineral escaso, debido a que son cosechados antes de la madurez comercial (Sánchez y Martínez, 1987).

Actualmente, los principales productores de higo a campo abierto son los estado de Morelos (851 ha), Baja California Sur (278 ha), Hidalgo (53 ha), Veracruz (40 ha), y el Distrito Federal (23 ha). La producción anual estimada es de 3,642 Ton, y el rendimiento promedio es de 4.48 Ton ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2011). Esta producción no es suficiente para satisfacer la demanda nacional, por lo que se recurre a la importación, principalmente de fruta deshidratada. Las principales razones por las que la producción de higo se ha mantenido estancada (Cuadro 4) han sido la ausencia de tecnologías para el manejo agronómico y el manejo postcosecha del cultivo, así como la falta de capacitación a productores (Sánchez y Martínez, 1987).

**Cuadro 4.** Comportamiento de la producción de higo en México durante los últimos 30 años.

<b>Año</b>	<b>Superficie sembrada (ha)</b>	<b>Producción (Ton)</b>	<b>Rendimiento (Ton ha<sup>-1</sup>)</b>
1980	4,126	24,975	6.2
1990	787	3,059	4.3
2000	1,1170	2,425	2.9
2010	1201	3,640	4.4

**Fuente:** Elaboración propia con información tomada del SIAP (1980-2010).

El cultivo en invernadero podría ser una alternativa para incrementar la producción de higo y satisfacer la demanda nacional. En España, la implementación de los sistemas modernos de la agricultura protegida han permitido incrementar el rendimiento de 4.5 Ton ha<sup>-1</sup> a campo abierto a 81.0 Ton ha año<sup>-1</sup> bajo invernadero (Melgarejo *et al.*, 2007).

En México, el cultivo de higo bajo cubierta plástica ha sido explorado desde mediados del 2008, pero solamente a nivel experimental, en Texoco, estado de México. Los sistemas de producción consistían en el establecimiento del cultivo en suelo a baja densidad, en invernaderos rústicos con fertilización manual y aplicación de riego rodado. Sin embargo, con estos sistemas fue posible obtener 120 Ton de fruto por hectárea por año (Mendoza, 2009).

En los sistemas de producción rústicos, las tuzas (*Geomys arenarius*) y las aves se convirtieron en una plaga importante que redujeron drásticamente la densidad de plantación y el rendimiento de higo (Mendoza, 2009). Por este motivo, los sistemas de producción de higo a nivel experimental han ido evolucionado. Actualmente, las plantas son cultivadas en macetas con diferentes sustratos y sistemas de fertirriego para evitar las pérdidas por tuzas y como sistema innovador, lo que ha permitido incrementar la producción y cosechar fruta durante todo el año.

### **2.11. Caracterización de higo con base en atributos morfológicos**

Para la caracterización morfológica de especies y variedades, generalmente se utilizan las guías internacionales del IPGRI o de la UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) (IPGRI, 2003; Gallegos *et al.*, 2005). Entre 1980 y el 2003, el IPGRI desarrolló guías técnicas para la caracterización estándar de atributos morfológicos de 89 cultivos distintos, incluyendo al aguacate, arroz, avena, café, cítricos, durazno, fresa, frijol, higo, maíz, manzana, papa, papaya, piña,

sorgo, soya, y tomate. Estas guías contemplan la caracterización morfológica de las plantas con base en 6 tipos de descriptores:

1. **Biológicos:** tipo de polinización, longitud del periodo de polinización, periodo del amarre de frutos, fecha de maduración, periodo de cosecha y principio de defoliación de la planta.
2. **De crecimiento:** hábito de crecimiento, vigor de la planta, número de ramas, dominancia apical, formación de brotes laterales, estación de crecimiento de los brotes laterales, forma, longitud, diámetro y color de las yemas terminales y capacidad de enraizamiento de los brotes.
3. **De la hoja:** número de hojas por tallo, forma de la hoja, de la base y del margen de la hoja, número de lóbulos, forma de los lóbulos, longitud, diámetro y área de la hoja, color de la hoja, venación de la hoja, longitud, diámetro y color del peciolo.
4. **Del fruto:** color del exocarpio y mesocarpio, forma, tamaño, longitud y diámetro y color del fruto, forma del ápice del fruto, tamaño, color y grado de adhesión del ostiolo, forma, tamaño de la cavidad, longitud del cuello, longitud y grado de abscisión del pedúnculo, facilidad de pelado, presencia de estrías, presencia de lenticelas, tamaño y color de las lenticelas, color del albedo, sabor, jugosidad, firmeza, contenido de sólidos solubles totales y acidez total (IPGRI, 2003).
5. **Agronómicos:** número de hojas por rama, número de ramas por tallo, longitud del tallo, longitud de las ramas, número de frutos por rama, fechas de poda, rendimiento por árbol, rendimiento por hectárea, rendimiento entre los 3 y 5 años.
6. **Susceptibilidad a estrés biótico y abiótico:** resistencia a temperaturas altas o bajas, resistencia a sequía, salinidad y plagas y enfermedades.

La caracterización morfológica se debe realizar en plantas que crecen bajo un mismo ambiente, en las que se hayan detectado caracteres distintivos de importancia en la diferenciación de especies y variedades. En caso de que las plantas no produzcan alguna característica importante para su diferenciación, pueden ser llevadas a un ambiente distinto en donde puedan expresar rasgos característicos que permitan diferenciarlas (Gallegos *et al.*, 2005).

La morfología reflejada por los frutos de higo se debe en parte a las condiciones del medio ambiente en que se han desarrollado y evolucionado (Condit, 1995; Storey, 1977). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que algunas de esas características se hayan generado por cambios evolutivos recientes, tal como sucede en el caso de las cactáceas (Bravo, 1978).

## **2.12. Caracterización de higo con base en marcadores moleculares**

La caracterización genética de plantas en general ha sido mejorada a través del uso de técnicas de biología molecular, como los marcadores bioquímicos y moleculares, caracteres citológicos, y la identificación de genes (Arulsekhar y Parfitt, 1986; IPGRI, 2003; Satwar, 2012).

Los marcadores bioquímicos se basan en el uso de isoenzimas como la ácido fosfatasa (ACPH), esterasas  $\alpha$  and  $\beta$  (EST A and B), isocitrato deshidrogenasa (ICD), malato deshidrogenasa (MDH), fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), fosfoglucosa isomerasa (PGI), fosfoglucosa mutasa (PGM) y peroxidasas (Arulsekhar y Parfitt, 1986).

Los marcadores moleculares son diversos. Al menos 40 tipos de marcadores han sido descritos. Los más comunes son los RFLPs, RAPDs, ISSRs, AFLPs y Microsatélites (Semagn *et al.*, 2006; Sarwat, 2012). Cada tipo de marcadores presenta ventajas y desventajas, las cuales pueden ser utilizadas con base en los

objetivos y la precisión que se desea obtener en la investigación (Semagn *et al.*, 2006). Estos cinco tipos de marcadores han sido utilizados en higo en estudios de genotipificación, diversidad genética de plantas silvestres o tipo Caprifig, estimación de diferencias genéticas y selección de clones de interés, identificación de especies y variedades, y determinación de relaciones filogenéticas (Galderisi *et al.*, 1999; Cabrita *et al.*, 2001; De Masi *et al.*, 2003; Khadari *et al.*, 2003; Giraldo *et al.*, 2005; Khadari *et al.*, 2005; De Masi *et al.*, 2005; Guasmi *et al.*, 2006; Chatti *et al.*, 2007; Mallikarjuna *et al.*, 2010; Dalkilic *et al.*, 2011).

Los caracteres citológicos consideran principalmente el número de cromosomas y el nivel de ploidía de la especie estudiada, mientras que la identificación de genes se basa en la secuenciación de genes específicos que controlen alguna característica de interés particular (IPGRI, 2003).

Particularmente en higo, la identificación o diferenciación de especies y variedades se ha mejorado mediante análisis de huellas de ADN (Khadari *et al.*, 2003; Guasmi *et al.*, 2006; Jabbarzadeh *et al.*, 2010; Khaled *et al.*, 2010; Mallikarjuna *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2011; Palai y Rout, 2011; Sarwat, 2012). La detección de huellas de ADN requiere de la técnica de electroforesis para separar las moléculas en función de su peso molecular, a través de una matriz semisólida que normalmente es agarosa o poliacrilamida (García, 2000; Osorio *et al.*, 2005).

### **2.13. Literatura Citada**

- Aguilera O., M.; M. G. Alanis G.; C. L. García D.; C. M., Hernández B. 2009. Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. Universidad y Ciencia Trópico Húmedo. 25 (2): 151-158.
- Aljane, F.; I. Toumi; A. Ferchichi. 2007. HPLC determination of sugars and atomic absorption analysis of mineral salts in fresh figs of Tunisian cultivars. African Journal of Biotechnology. 6: 599-602.

- Aljane, F.; A. Ferchichi. 2009. Postharvest chemical properties and mineral contents of some fig (*Ficus carica* L.) cultivars in Tunisia. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 7 (2): 209-212.
- Álvarez-Arbesú, R.; J. A. Fernández-Prieto. 2000. Poblaciones silvestres de higueras, vides y olivos en la costa cantábrica. Consideraciones acerca de su origen. *Naturalia Cantabrica*.1:33-43.
- Antunes, D.; R. Oliveira; M. G. Miguel; M. A. Martins; C. Picab; M. A. Neves. 2003. The effect of calcium chloride and thermal postharvest treatments on storage ability and quality of fig fruit. *Acta Horticulturae*. 640: 715-719.
- Antunes, D.; G. Miguel; A. Neves. 2007. Innovative postharvest techniques for sustainable handling of horticultural products. Proceedings of the 3rd IASME/WSEAS International Conference on energy, environment, ecosystems and sustainable development (EEESD '07), Agios Nikolaos, Crete Island, Greece, 24-26 July. pp. 93-97.
- Arulsekar, S.; D.E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *HortScience*. 21: 928-933.
- Baccaunaud, M.; J. Raynal; F. Baboulène. 1995. Maintaining quality after harvest. *Arboriculture Fruitière*. 489: 37-42.
- Beck, N. G.; E. M. Lord. 1988. Breeding system in *Ficus carica*, the common fig II. Pollination events. *Am. J. Bot.* 75:1913-1922.
- Bravo H., E. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 743 p.
- Brien, J.; S. Hardy. 2002. Fig growing in NSW. Agfact H3.1.19, First Edition. State of New South Wales-NSW Agriculture. 8 p.
- Cabrita, L. F.; U. Aksoy; S. Hepaksoy; J. M. Leitao. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Sci. Hort.* 87: 261-273.
- California Fig Advisor Board (CFAB). 2011. Industri Overview. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [http://californiafigs.com/uploads/FIG%20FACTS%202011.pdf]

- Carballo G., G. 1980. El cultivo de la higuera. Comisión Nacional de Fruticultura. México. pp. 2-12.
- Celikel, F. G.; I. Karacali. 1998. Effects of harvest maturity and precooling on fruit quality and longevity of 'Bursa Siyahi' figs (*Ficus carica* L.). *Acta Horticulturae*. 480. 283-288.
- Chatti, K.; O. Saddoud; A. Salhi-Hannachi; M. Mars; M. Marrakchi; M. Trifi. 2007. Analysis of genetic diversity and relationships in a Tunisian fig (*Ficus carica*) germplasm collection by random amplified microsatellite polymorphisms. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 386-391.
- Chimi, H.; A. Ooaouich; M. Semmar; S. Tayebi. 2008. Industrial processing of figs by solar drying in Morocco. *Acta Horticulturae*. 331-334.
- Colares S., F.; A. C. De Oliveira F. 2009. Variabilidade de índices de firmeza em figo utilizando ponteira cilíndrica e pratos planos. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal-SP*. 31: 257-261.
- Colelli, G.; F. G. Mitchell; A. A. Kader. 1991. Extension of postharvest life of 'Mission' figs by CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *HortScience*. 26 (9): 1193-1195.
- Condit, I. J. 1955. Fig Varieties: A Monograph. *Hilgardia*. 23 (11): 323-539.
- Crisosto, C. H.; E. J. Mitcham; A. A. Kader. 2002. Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. Centro de Investigación e Información en Tecnología Postcosecha. Universidad de Davis, California. 4 p.
- Dalkılıç, Z.; H. Osman M.; G. Gunver-Dalkılıç; H. Kocatas. 2011. Genetic diversity of male fig (*Ficus carica* caprificus L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*. 10 (4): 519-526.
- D'Aquino, S.; A. Piga; M. G. Molinu; M. Agabbio; C. Papoff. 1998. Maintaining quality attributes of "Craxiou de porcu" fresh fig fruit in simulated marketing conditions by modified atmosphere. *Acta Horticulturae*. 289-294.
- Datwyler, S. L.; G. D. Weiblen. 2004. On the origin of the fig: phylogenetic relationships of moraceae from NDHF sequences. *American Journal of Botany*. 91(5): 767-777.

- De Masi, L.; M. Cipollaro; G. Di Bernardo; U. Galderisi; G. Galano; A. Cascino; G. Grassi; E. Pavone; A. Simeone. 2003. Clonal selection and molecular characterization by RAPD analysis of the fig (*Ficus carica* L.) Dottato and Bianco del Cilento cultivars in Italy. *Acta Hort.* 605: 65-68.
- De Masi, L.; D. Castaldo; G. Galano; P. Minasi; B. Laratta. 2005. Genotyping of fig (*Ficus carica* L) via RAPD markers. *J. Sci. Food Agric.* 85: 2235-2242.
- Demirbucker, D.; S. Simsek; A. Yemenicioglu. 2004. Potential application of hot rehydration alone or in combination with hydrogen peroxide to control pectin methylesterase activity and microbial load in cold-stored intermediate-moisture sun-dried Figs. *JFS: Food Chemistry and Toxicology.* 69 (3): 170-178.
- El-Gharably, A. M.; A. I. Nagib; E. M. Rizk. 2009. Evaluation of quality attributes for egyptian apricot and fig cultivar produced by osmodrying process. *Annals Agric. Sci.* 54 (2): 359-396.
- El Gharras, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology.* 44: 2512-2518.
- Ersoy, N.; S. Gözlekci; L. Kaynak; B. Dal; K. Yazıcı. 2008. Relationship among the shoot, leaf and fruit growth of some fig (*Ficus carica*) cultivars grown in Antalya conditions. *Acta Hort.* 798: 143-148.
- Flaishman, M. A.; V. Rodov; E. Stover. 2008. The fig: botany, horticulture, and breeding. *Horticultural Reviews.* 34: 113-196.
- Flores D., A. 1990. La Higuera. *Frutal mediterráneo para climas cálidos.* Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 190 p.
- Galderisi, U.; M. Cipollaro; G. Di Bernardo; L. De Masi; G. Galano; A Cascino. 1999. Identification of the edible fig 'Bianco del Cilento' by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Hort. Sci.* 34: 1263-1265.
- Gallegos V., C.; A. F. Barrientos Priego; J. Cervantes H.; 2005. Manual gráfico para la descripción de nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-SAGARPA. Universidad Autónoma Chapingo. 116 p.
- García P., H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIG.* 1 (2): 31-41.

- Gawade, M. H.; D. P. Waskar. 2004. Dried fig (*Ficus carica* L.) storage under various environments. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*. 41 (4): 426-429.
- Giraldo, E.; M. A. Viruel; M. López-Corrales, J. I. Hormaza. 2005. Characterization and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80: 217-224.
- Guasmi, F.; A. Ferchichi; L. Kadifafarés. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology*. 5 (15): 1370-1374.
- Hassan, H. A.; A. G. El-Homosany; H. Amina; M. A. Shaheen. 2011. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes (*Vitis vinifera* L.) Collection. *World Applied Sciences Journal*. 15 (10): 1369-1375.
- Ilgin, M.; F. Ergenoglu; S. Caglar. 2007. Viability, germination and amount of pollen in selected caprifig types. *Pak. J. Bot.* 39: 9-14.
- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). 2012. Tabla de composición de alimentos de Centro América. Serviprensa, S. A. 126 p.
- IPGRI. 2003. Descriptors for Fig. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, and International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies, Paris, France. 52 p.
- Isman, B.; H. Biyik. 2009. The aflatoxin contamination of fig fruits in Aydin city (Turkey). *Journal of Food Safety*. 29: 318-330.
- Jabbarzadeh, Z.; M. Khosh-khui; H. Salehi; A. Saberivand. 2010. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. *African Journal of Biotechnology*. 9 (37): 6091-6095.
- Kader, A. A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. Third Edition. University of California. 535 p.
- Kader, A. A. 2003. A summary of CA requirements and recommendations for fruits other than apples and pears. *Acta Horticulturae*. 737-740.
- Karaca, H.; S. Nas. 2008. Mycotoxin in dried figs. *Acta Horticulturae*. 789: 307-312.

- Karandeniz, T. 2009. Clonal selection in Siyah fig cv. at Black Sea region of Turkey. In: Fourth International Symposium on Fig. Meknes, Morocco.
- Khadari, B.; I. Hochu; S. Santoni; M. Ater; F. Kjellberg; A. Oukabli; J. P. Roger. 2003. Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. *Acta Hort.* 605: 69-75.
- Khadari, B; C. Grout; S. Santoni; F. Kjellberg. 2005. Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: A study using mtDNA RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 52: 97-109.
- Khaled, C.; B. Ghada; B. A. Ahmed; S. Olfa; M. Messaoud; T. Mokhtar; S. H. Amel. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochem Genet.* 48:789-806.
- Koyuncu, M. A. 2004. Promising fig (*Ficus carica* L.) genetic resources from Birecik (Urfa) region of Turkey. *European Journal of Horticultural Science.* 69 (4): 153-158.
- Krislev, M. E. A. Hartmann; O. Bar-Yosef. 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science.* 312 (5778): 1273-1275.
- Kumar, A.; O. Bajpai; A. K. Mishra; N. Sahu S. K. Behera; L. B. Chaudhary. 2011. Assessment of Diversity in the Genus *Ficus* L. (Moraceae) of Katerniaghat Wildlife Sanctuary, Uttar Pradesh, India. *American Journal of Plant Science.* 2: 78-92.
- Lima, L. C.; M. S. C. Dias; M. V. Castro; R. N. Martins; P. M. Ribeiro Júnior; E. de B. Silva. 2005. Post-harvest conservation of unripe figs (*Ficus carica* L.) cv. "Roxo de Valinhos" treated with sodium hypochlorite and stored under refrigeration in passive modified atmosphere. *Ciência e Agrotecnologia.* 29:4:810-816.
- Mallikarjuna, K. A.; E. Stover; D. Velasco; A. Koehmstedt. 2010. Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). *Genética.* 138:681-694.
- Melgarejo M., P. 2000. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol I. Ediciones Madrid Vicente y Mundi-Prensa. Madrid, España. 378 p.
- Melgarejo, P.; J. J. Martínez; F. Hernández D.; M. Salazar; R. Martínez. 2007. Preliminary results on fig soil-less culture. *Scientia Horticulturae.* 111 (3): 255-259.

- Mendoza C., V. M. 2009. Producción intensiva de higo (*Ficus carica* L.) bajo invernadero. Tesis de Maestría. Postgrado de Recurso Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. 66p.
- Molinu, M. G.; T. Venditti; A. Dore; G. D'Hallewin; A. Serusi; A. Del Caro; M. Agabbio. 2006. Postharvest decay reduction of fig fruit (*Ficus carica*) by hot water sodium carbonate solutions dip. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 71 (3): 923-8.
- Oezeker, E.; M. Isfendiyaroglu. 1998. Evaluation of table fig cultivars in Cesme Peninsula. *Acta Horticultura.* 480: 55-60.
- Osorio, M.; A. Vegas; A. Márquez. 2005. Estandarización de las condiciones para la separación electroforética de productos amplificados por microsatélites en materiales de papa. *Revista Digital CENIAP HOY.* 8. Maracay, Aragua, Venezuela.
- Oztekin, S.; B. Zorlugenc; F. Kiroglu Z. 2006. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering.* 75: 396–399.
- Palai, S. K.; G. R. Rout. 2011. Characterization of new variety of *Chrysanthemum* by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira.* 29: 613-617.
- Park, Y. S; S. T. Jung. 2000. Effects of CO<sub>2</sub> treatments within polyethylene film bags on fruit quality of fig fruits during storage. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science.* 41 (6): 618-622.
- Parra Lerma, J. 1996. Estudio fenológico de un huerto de higuera (*Ficus carica* L.) en el Ejido Francisco Villa, municipio de Comundu, Baja California Sur. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. 81 p.
- Piga, A.; M. Agabbio; G. A. Farris. 2003. Dehydration performance of local fig cultivars. *Acta Horticulturae.* 605: 241-245.
- Piga, A.; A. Del Caro; I. Pinna. 2008. Osmo-dehydration of fig fruits with five sugars. *Acta Horticulturae.* 798: 313-318.
- Price, R. H; E. A. White. 1902. The fig. *Bolletín No. 62.* Agricultural Experimental Stations. College Station, Brazos Country, Texas.
- Rodov, V.; J. Percelan; B. Horev; Y. Vinokur; S. Ben-Yehoshua; Z. Yablovich; M. Flaishman. 2002. Development of dark figs for export: I. Optimal picking criteria for the 'Brazilian' variety. *Alon Hanotea.* 56 (8): 372-376.

- Sánchez B., V. M.; G. Martínez G. 1987. Procesamiento del higo en la zona noreste del estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 101 p.
- Sarwat, M. 2012. ISSR: Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols: A reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. In: Nikolaus J. Sucher et al. (eds.) *Methods in Molecular Biology*. 862: 103-121.
- Slavin, J. L. 2006. Figs: Past, Present and Future. *Nutrition Today*. 41 (4): 180-184.
- Semagn, K.; B. Jornstad; M. N. Ndjiandjop. 2006. An overview of molecular markers method for plants. *African Journal of Biotechnology*. 5 (25): 2540-2568.
- Sen, F.; K. B. Meyvacı; F. Turanlı; U. Aksoy U. 2010. Effects of short-term controlled atmosphere treatment at elevated temperature on dried fig fruit. *Journal of Stored Products Research*. 46: 28-33.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 1980-2011. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. México, D. F. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [www.siap.gob.mx/index.option=com\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351].
- Solomon, A.; S. Golubowicz, S.; Z. Yablowicz, Z.; S. Grossman; M. Bergman; H. Gottlieb; A. Altman; Z. Kerem; M. A. Fleishman. 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food Chem*. 54 (20): 7717-7723.
- Souza, F. C.; A. C. Ferraz. 2005. Resistência mecânica e coeficiente de atrito do figo 'Roxo de Valinhos' para projeto de embalagens. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 34. Anais Canoas.
- Storey, W.B. 1975. Figs. In: J. Janick and J. N. Moore (eds.). *Advances in fruitbreeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN. pp. 568-589.
- Storey, W. B.; J. E. Enderud; W. F. Saleeb; E. M. Nauer. 1977. *The Fig: its biology, history, culture and utilization*. Jurupa Mountains Cultural Center, Riverside, California. 94 p.
- Stover, E.; M. Aradhya; L. Ferguson; C. H. Crisosto. 2007. The Fig: Overview of an Ancient Fruit. *HortScience*. 42 (5): 1083-1087.

- Toribio, F.; P. Montes. 1996. Variedades de la higuera. *Vida Rural*. 27:1-5.
- Tsantili, E.; G. Karaiskos; C. Pontikis. 2003. Storage of fresh figs in low oxygen atmosphere. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78: 56-60.
- USDA. 2005. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi bin/list\_nut\_edit.pl].
- Venditti, T.; M. G. Molinu; A. Dore; G. D'hallewin; P. Fiori; M. Tedde; M. Agabbio. 2005. Treatments with GRAS compounds to keep fig fruit (*Ficus carica* L.) quality during cold storage. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 70(3): 39-343.
- Vinson, J. A. 1999. The functional food properties of fig. *Cereal foods world*. 44 (2): 82-97.
- Xanthopoulos, G.; S. Yanniotis; G. Lambrinos. 2010. Study of the drying behavior in peeled and unpeeled whole figs. *Journal of Food Engineering*. 97: 419-424.
- Yahata, D.; H. Nogata. 1999. Cultivar variations in sugar contents in the fig syconia, their parts and nodal positions. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 68:5:987-992.
- Yesilcimen, M.; A. M. Ozdemir. 2008. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology*. 25: 386-391.

### III. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE HIGOS (*Ficus carica* L.) EN MÉXICO

#### 3.1. Resumen

El higo común (*Ficus carica* L.) crece en poblaciones naturales y cultivadas en todos los estados de la República Mexicana. Sin embargo, la diversidad genética existente en el país es completamente desconocida, y no existen parámetros para la caracterización fenotípica o genética de poblaciones de higo. Ante la falta de información, se cree que los higos mexicanos pertenecen a la variedad española Black Mission. En este estudio, nosotros presentamos una caracterización morfológica de seis poblaciones de higos mexicanos basada en una combinación de atributos cualitativos y cuantitativos del fruto. Nuestros resultados muestran que después de cientos de años los higos negros se han adaptado a condiciones ambientales locales en el centro de México, generando con ello variedades claramente distintas que representan diversidad morfológica valuable y previamente no descrita. Las principales diferencias morfológicas entre las poblaciones mexicanas de higo identificadas en este estudio son el tamaño o peso del fruto, el color de la pulpa, y la longitud del cuello y la forma del pedúnculo. Con base en estos resultados sugerimos que las poblaciones descritas en este estudio son variedades naturales de higo, y les asignamos un nombre que las identifica con su lugar de origen. La caracterización morfológica que presentamos aquí establece las bases para la futura caracterización agronómica y molecular de variedades de higo.

**Palabras clave:** diversidad morfológica, variedades de higo, atributos cualitativos y cuantitativos del fruto.

## MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF FIGS (*Ficus carica* L.) IN MEXICO

### 3.2. Abstract

The common fig (*Ficus carica* L.) grows in natural and cultivated populations in all the states of the Mexican Republic. However, the natural diversity that exists in this species is completely unknown, and parameters for the phenotypic or genetic characterization of fig populations do not exist. Due to the lack of information, it is believed that Mexican figs belong to the Spanish variety Black Mission. In this study, we present a morphological characterization of six Mexican fig populations based on qualitative and quantitative fruit traits. Our results show that after hundreds of years of cultivation, black figs have been adapted to the local environmental conditions of the Central Mexico region, yielding this in several clearly distinct varieties, which represent valuable and previously undescribed morphological diversity. The main morphological differences identified in this study among Mexican fig populations are the fruit size or weight, color of the pulp, length of the neck, and the shape of the stalk. Based on these results we suggest that the populations described in this study are native fig varieties, and we assigned to them a name that identifies their place of origin. The morphologic characterization that we present in this study establishes the basis for further agronomic and molecular characterization of fig varieties.

**Key words:** morphological diversity, fig varieties, qualitative and quantitative fruit traits.

### 3.3. Introducción

El fruto de higo (*Ficus carica* L.) es importante en la alimentación humana por su contenido de proteínas, vitaminas, minerales, carbohidratos y fibra dietética (Aljane *et al.*, 2007; Ersoy *et al.*, 2007; INCAP, 2012). El contenido de proteínas varía de 0.75 a 3.30 g por 100 g de porción comestible (INCAP, 2012). Las vitaminas más abundantes en los frutos de higo son la vitamina A (2.0 mg), vitamina B6 (0.11 mg) y vitamina C (2.0 mg por 100 g de porción comestible) (INCAP, 2012). Los minerales como el calcio (35.0 a 162.0 mg), potasio (232.0 a 680.0 mg), magnesio (17.0 a 68.0 mg), sodio (1.0 a 10.0 mg), hierro (0.07 a 67.0 mg), fósforo (14 a 167.0 mg), y zinc (0.15 a 0.55 mg) por 100 g de porción comestible, son los nutrientes que se encuentran en mayor proporción en los frutos (Aljane *et al.*, 2007; INCAP, 2012). Los principales carbohidratos del fruto son la glucosa (3.49 mg) y fructosa (2.54 mg por 100 g de materia seca) (Ersoy *et al.*, 2007). La fibra dietética de los frutos varía de 2.90 a 9.80 mg por 100 g de porción comestible (INCAP, 2012). El valor energético elevado del higo (74.0 a 249.0 kcal), derivado de su contenido de azúcares, convierte al fruto de higo en un producto energizante, ideal para el consumo de personas con desgaste físico, niños en crecimiento, estudiantes y deportistas (USDA, 2005).

Los frutos de higo no contienen grasa ni colesterol y son fuente de benzaldehído, un compuesto anticancerígeno (Slavin, 2006), y antioxidantes (Vinson, 1999; Slavin, 2006; Aguilera *et al.*, 2009). En particular, la variedad Black Mission posee los contenidos más elevados de antocianinas, por lo que está considerada como la variedad que presenta la capacidad antioxidante más elevada (36.0 %) (Solomon *et al.*, 2006) de todos los tipos (Común, Smyrna, Caprifig y San Pedro) y más colores de frutos de higo (negro, rojo, verde, amarillo y café) (Toribio y Montes, 1996; Melgarejo, 2000; Solomon *et al.*, 2006; Ilgin *et al.*, 2007). Los antioxidantes desarrollan funciones nutraceuticas que mejoran la calidad de vida del humano, manteniendo niveles adecuados de salud y previniendo enfermedades crónicas (Vinson, 1999; Piga *et al.*, 2008; El Gharras, 2009). Por todas estas propiedades, el

higo es considerado como uno de los frutos más saludables y nutritivos (Piga *et al.*, 2003; Slavin, 2006).

Los frutos de higo se consumen como fruta fresca, deshidratada o industrializada, en forma de jugos, mermeladas, pastas, vinos y licores (Piga *et al.*, 2003; Slavin, 2006). Medicinalmente, las hojas de la planta son utilizadas como analgésico, antimicrobiano cicatrizante, desinflamante, desparasitante, expectorante, laxante y reafirmante (Goor, 1965; Grivetti y Applegate, 1997). También son utilizadas en tratamientos de alopecia, eliminación de verrugas e infertilidad de la mujer. Por esta razón, los griegos consideran a la higuera como un símbolo de fertilidad (Goor, 1965; Grivetti y Applegate, 1997).

Los frutos de higo, llamados infrutescencias, son siconos blandos de sabor muy dulce, cubiertos por un exocarpio muy delgado de colores variados como negro, rojo, verde, amarillo o café, según la variedad (Solomon *et al.*, 2006). Las infrutescencias contienen pequeños aquenios que semejan semillas, pero son en realidad los frutos verdaderos (Melgarejo, 2000). El receptáculo floral se hincha y se vuelve carnoso por la fecundación, desarrollando brevas o higos, según la fecha de maduración, pero no existen diferencias genéticas ni morfológicas entre brevas e higos, solo la diferenciación temporal en su desarrollo y maduración (Flaisman *et al.*, 2008). Morfológicamente, las infrutescencias pueden ser ovoides o piriformes (IPGRI, 2003). Cuando la cosecha es compacta, las infrutescencias conservan la forma y el tamaño. En contraste, cuando la cosecha es abundante, se pueden encontrar infrutescencias de diferentes formas y tamaños (Flores, 1990). El periodo de cosecha varía según el tipo de higuera cultivada. Al final de este periodo, la planta se defolia y entra en reposo. En ambientes benignos, con temperaturas de 10 °C, las yemas pueden permanecer en el árbol durante el invierno y continuar su crecimiento en la primavera. Por esta razón, en un mismo brote se pueden encontrar brevas en ramas del año anterior e higos en ramas en crecimiento anual. La temperatura, fotoperiodo y humedad relativa afectan el tamaño del fruto y el desarrollo del color (Flaisman *et al.*, 2008).

La caracterización morfológica de especies y variedades de higo se basa en atributos cualitativos y cuantitativos del fruto (IPGRI, 2003). Las características evaluadas más importantes son el tamaño o peso del fruto, longitud, diámetro, color del exocarpio y mesocarpio, firmeza, tamaño del ostiolo, tamaño de la cavidad, longitud del cuello, y forma del pedúnculo (IPGRI, 2003; Ersoy *et al.*, 2008; Aljane y Ferchichi, 2009). A nivel internacional, las variedades comerciales conocidos como, Black Mission, Bursa Siyahi, Conadria, Deanna, Kimy, Niedda Longa, Mattalona, San Pietro, Sarylop, Verde y Tsapela, han sido caracterizadas morfológicamente (Piga *et al.*, 2003; Babalis y Belessiotis, 2004; Koyuncu, 2004; Gawade y Waskar, 2005; Xanthopoulos *et al.*, 2007; Flaishman *et al.*, 2008; El-Gharably *et al.*, 2009; Piga y Del Caro, 2009; Sen *et al.*, 2010). De todas estas variedades, solo Black Mission pertenece al tipo de los higos comunes o partenocárpicos, mientras que las demás variedades pertenecen a los higos tipo Smyrna o de polinización cruzada (Condit, 1955; Storey, 1977). La variedad Black Mission se cultiva principalmente en California, Estados Unidos (Storey, 1977; CFAB, 2011), y se caracteriza por producir higos piriformes de 3.81 a 7.5 cm de longitud y 5.08 cm de diámetro, de tamaño mediano, con peso de 25.0 a 56.0 g, con exocarpio negro y mesocarpio rosa; de excelente calidad, sabor y dulzura; con contenido de SST de 14.3 a 22.5 % (Condit, 1955; Storey, 1977; CFAB, 2011; King *et al.*, 2012).

En México, no hay información acerca de la diversidad morfológica de variedades de higo, por lo que se cree que los higos mexicanos pertenecen a la variedad española Black Mission. Para evaluar la variación morfológica entre variedades de higos negros del centro de México, nosotros realizamos una caracterización morfológica inicial basada en una combinación de atributos cualitativos y cuantitativos del fruto. Nuestros resultados muestran variación morfológica del fruto previamente no descrita entre higos negros de diferentes partes de México. La diversidad en la forma del fruto no puede ser explicada únicamente por los efectos de las condiciones ambientales, y proponemos nombres para estas poblaciones basándonos en sus lugares de origen. Estos resultados establecen las bases para la futura caracterización agronómica y molecular de variedades de higo.

### **3.3.1. Objetivo**

Caracterizar poblaciones de higo del centro de México con base en la forma del fruto.

### **3.3.2. Hipótesis**

Ho: La diversidad morfológica de los frutos de higo provenientes de diferentes partes del centro de México, no se debe únicamente a los efectos de las diferencias en las condiciones ambientales.

Ha: La diversidad morfológica de los frutos de higo provenientes de diferentes partes del centro de México, se debe a los efectos de las condiciones ambientales.

## **3.4. Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

Se evaluaron frutos de seis poblaciones de higo del tipo común o partenocárpicas, provenientes de diferentes estados del centro de México, en enero del 2011. En los lugares de origen, las poblaciones son conocidas como Black Mission. Con propósitos de diferenciación, nosotros asignamos un nombre a cada uno de las poblaciones. Las variedades conocidas en México como Neza y Tecámac fueron seleccionadas por el Maestro Alfonso Muratalla Lúa, del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Las cuatro poblaciones identificadas como Ixmiquilpan, Salvatierra, Tetela y Zacapala, fueron seleccionadas por Víctor Mendoza y Mayra García, estudiantes del Postgrado de Recurso Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, del Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Ninguna de estas poblaciones ha sido descrita en la literatura previamente.

## **Propagación y cultivo de las plantas**

Plantas de higo de cada una de las seis poblaciones fueron propagadas por estacas de madera dura, a partir de plantas de tres años de edad establecidas en suelo en sus lugares de origen. Las estacas de 25 cm de longitud fueron desinfectadas con Furadán ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) y enraizadas con ácido indolbutírico (AIB) a 10,000 ppm. El enraizado se realizó durante 60 días en un microtúnel utilizando turba como sustrato. Las estacas enraizadas fueron transferidas a macetas de plástico soplado de color negro con capacidad de 40 L, utilizado como sustrato una mezcla de tezontle rojo (45 %), tepojal (45 %), y vermicomposta (10 %). El arreglo de la plantación fue de 1.60 m entre hileras y 0.50 m entre plantas, con una densidad de 1.25 plantas  $\text{m}^{-2}$  establecidas en un invernadero de 1000  $\text{m}^2$ , en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). La UACH se encuentra ubicada geográficamente entre los  $19^\circ 27' 30''$  latitud norte y  $98^\circ 54' 14''$  longitud oeste, a una altitud de 2240 m sobre el nivel del mar, en Texcoco, estado de México. El riego se realizó con un sistema por goteo con emisores autorregulados a  $4 \text{ L h}^{-1}$ , con salidas a 4 estacas de 12 cm, con un gasto de  $1 \text{ L h}^{-1}$ , manejado con un programador de tiempo (Galcon 8006-AC 6). La frecuencia del riego fue de 3 minutos por hora, iniciando a las 9 am y concluyendo a las 6 pm. La fertilización se manejó en solución nutritiva en el agua de riego (Cuadro 5). El agua de riego presentó pH de 7.20 y conductividad eléctrica de  $0.30 \text{ dS m}^{-1}$ . La solución nutritiva presentó pH de 5.60 y conductividad eléctrica de  $2.61 \text{ dS m}^{-1}$ . El pH y la conductividad eléctrica fueron determinados con un potenciómetro portátil (Hanna 19380). Las condiciones de humedad y temperatura prevalecientes en el invernadero durante la conducción del experimento (Cuadro 6) fueron registradas cada hora con data logger (Hoboware).

**Cuadro 5.** Solución nutritiva utilizada para la fertilización de plantas de higo de diferentes partes del centro de México.

<b>Fuente</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>g/1000 L</b>	<b>kg/40 m<sup>3</sup></b>
Nitrato de calcio	940	940	37.6
Nitrato de potasio	200	200	8.0
Sulfato de potasio	340	340	13.6
Fosfato monoamónico	55	55	2.2
Sulfato de magnesio	490	490	19.6
Sulfato ferroso	15	15	600 g
Sulfato de manganeso	4	4	160 g
Borax	4.5	4.5	180 g
Sulfato de cobre	0.40	0.40	16 g
Sulfato de zinc	0.44	0.44	17.6 g
Ácido fosfórico	0.067 ml	6 ml	2.7 L
Ácido sulfúrico	0.033 ml	33 ml	1.3 L

### **Caracterización morfológica del fruto**

Las plantas de higo de las seis poblaciones bajo estudio fueron cultivadas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 6) y de manejo agronómico. El muestreo de frutos se realizó en julio del 2012, cuando las plantas se encontraban a la mitad del periodo de cosecha. Para esto, para cada población, se seleccionaron al azar 20 frutos maduros provenientes del tercio medio de las plantas. Un fruto se considera maduro solamente si cumple las siguientes características: exocarpio completamente negro, suaves al tacto y con pedúnculo curvo. Los frutos fueron cosechados entre las 9:00 y 10:00 horas, e inmediatamente fueron trasladados al laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, para la evaluación de las características morfológicas, con base en un grupo de descriptores cualitativos y cuantitativos establecidos para frutos de higo por el IPGRI (2003). Durante el muestreo de frutos,

la temperatura media del invernadero fue de 29.2 °C y la humedad relativa de 78.1 %.

**Cuadro 6.** Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de diferentes partes del centro de México, utilizados para la caracterización morfológica de los frutos.

<b>Condición ambiental</b>	<b>Enero-Junio del 2011</b>	<b>Julio-Diciembre del 2011</b>	<b>Enero-Julio del 2012</b>
<b>Temperatura (°C)</b>			
Mínima	2.50	1.83	3.62
Media	19.33	18.26	18.39
Máxima	48.87	50.44	44.72
<b>Humedad relativa (%)</b>			
Mínima	10.58	15.68	18.07
Media	67.10	71.33	71.24
Máxima	95.86	92.95	93.88

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Para la caracterización morfológica de frutos de higo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos, formados por las poblaciones de higo provenientes de diferentes estados del centro de México: 1 (Ixmiquilpan), 2 (Salvatierra), 3 (Tecámac), 4 (Tetela), 5 (Neza) y 6 (Zacapala), con 20 repeticiones cada uno. La unidad experimental fue un fruto. Los datos de las variables cuantitativas fueron sometidos a pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett) en el paquete estadístico SAS. Se verificó que los datos cumplieran con los supuestos básicos del análisis de varianza. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), en el paquete estadístico SAS (SAS, 1999-2000, versión 8.1). La representación gráfica de los datos fue realizada en el programa SigmaPlot (versión 10.1) para computadora personal.

### **Variables respuesta**

- **Forma del fruto.** Ovoide o piriforme.
- **Forma del ápice del fruto.** Redondo, plano o cónico.
- **Tamaño del ostiolo.** Pequeño, mediano, grande o muy grande.
- **Tamaño de la cavidad.** Ninguna, muy pequeña, pequeña, mediana o grande.
- **Color de la pulpa.** Blanca/amarilla, ámbar, rosa, roja o roja/púrpura.
- **Color del albedo.** Ninguno, claro o intenso.
- **Firmeza.** Suave, media, firme.
- **Facilidad de pelado.** Fácil, media, difícil.
- **Forma del pedúnculo.** Largo y delgado, corto y grueso o largo y grueso.
- **Abscisión del pedúnculo.** Fácil o difícil.
- **Biomasa fresca (g).** Los frutos fueron pesados individualmente en balanza granataria electrónica (OHAUS, con precisión de 0.1 g).
- **Longitud y diámetro (cm).** Los frutos fueron medidos individualmente con vernier digital (Mitutoyo®, Japón).
- **Longitud del cuello (cm).** Los frutos fueron medidos individualmente en la parte del cuello con vernier digital (Mitutoyo®, Japón).

## **3.5. Resultados y Discusión**

### **Caracterización morfológica del fruto con base en atributos cualitativos**

En un esfuerzo por registrar la diversidad natural de higo en México, nosotros establecimos una colección de germoplasma en la Universidad Autónoma Chapingo, en el estado de México. Esta es la primera y única colección de higo en México, y actualmente consta de seis poblaciones originarias de diferentes estados del centro de México. Las plantas fueron cultivadas en un invernadero del Módulo de Horticultura del Departamento de Fitotecnia. En sus lugares de origen, las poblaciones son conocidas como Black Mission. Sin embargo, la caracterización morfológica del fruto (Cuadro 7) mostró que existe gran variación natural entre poblaciones.

**Cuadro 7.** Características del fruto de diferentes poblaciones de higo del centro de México.

Descriptor	Población					
	Ixmiquilpan	Salvatierra	Tecámac	Tetela	Neza	Zacapala
Origen	Hgo	Gto	Edo. Méx	Mor	Edo. Méx	Pue
Forma	Piriforme	Piriforme	Ovoide	Ovoide	Piriforme	Ovoide
Ápice	Redondo	Redondo	Plano	Redondo	Redondo	Redondo
Tamaño del ostiolo	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Mediano	Grande	Pequeño
Tamaño de la cavidad	Ninguna	Muy pequeña	Ninguna	Mediano	Pequeño	Grande
Color de la pulpa	Roja	Roja	Amarilla	Rosa	Roja	Roja
Color del albedo	Claro	Claro	Ninguno	Claro	Claro	Claro
Firmeza	Firme	Media	Firme	Media	Suave	Firme
Facilidad de pelado	Media	Fácil	Difícil	Media	Fácil	Difícil
Forma del pedúnculo	Largo y delgado	Corto y grueso	Corto y grueso	Largo y delgado	Largo y grueso	Corto y grueso
Abscisión del pedúnculo	Difícil	Fácil	Fácil	Difícil	Fácil	Difícil

Las principales diferencias entre poblaciones son el tamaño o peso del fruto, la forma del fruto y la longitud del cuello del fruto (Figura 5). El clima juega un papel muy importante en la expresión de las características morfológicas de las plantas (Price y White, 1902; Storey, 1977). Las poblaciones de higo descritas en este trabajo fueron cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la diversidad natural en la forma del fruto de exocarpio negro, no puede ser explicada únicamente por el clima. Las diferencias morfológicas encontradas claramente indican que las poblaciones de higo en el centro de México son genéticamente distintas.



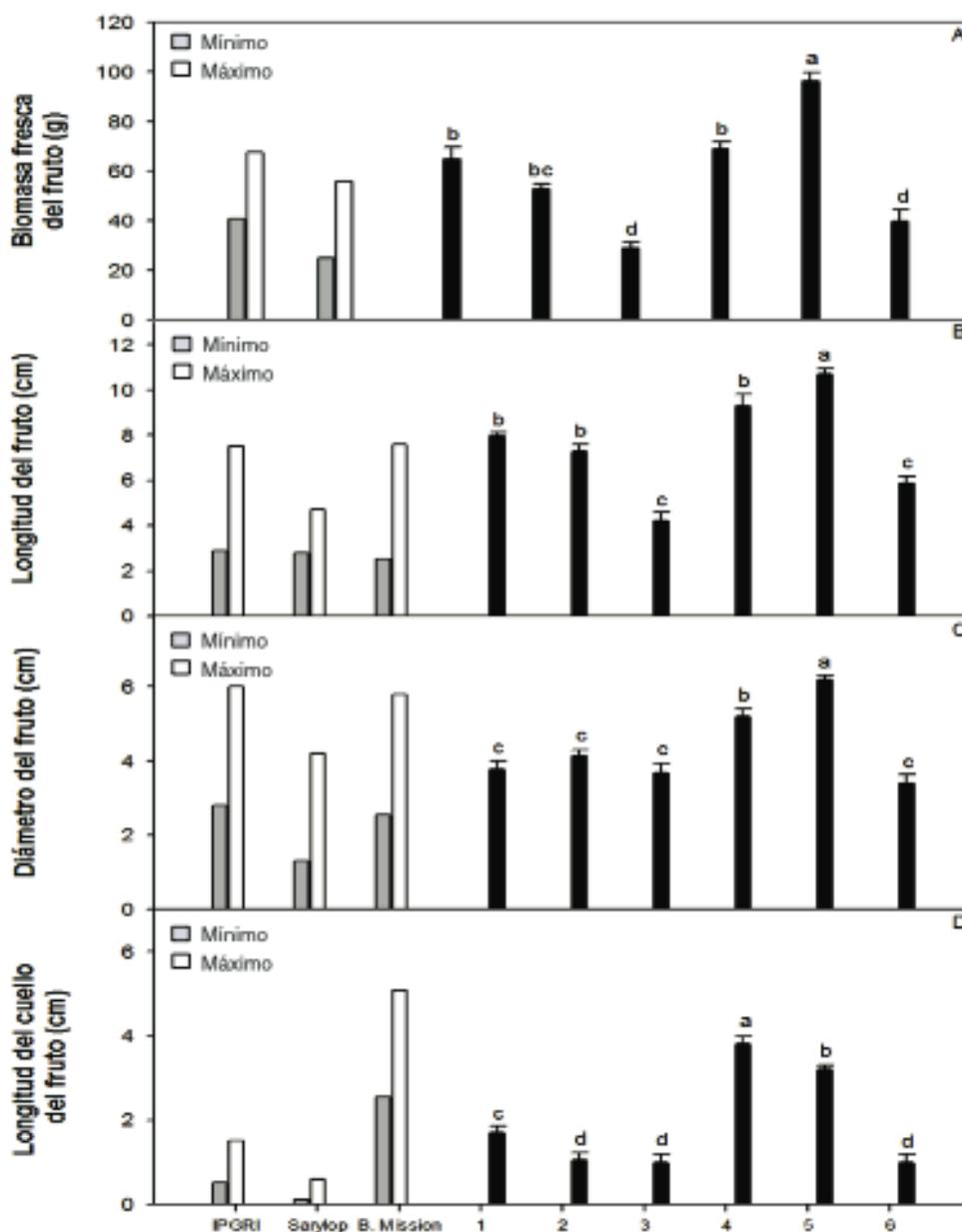
**Figura 5.** Características representativas del fruto de diferentes poblaciones de higo del centro de México.

A pesar de las diferencias observadas, no podemos descartar la posibilidad de que en algún momento las poblaciones de higo descritas en este estudio hayan compartido un ancestro común. Sin embargo, actualmente las poblaciones son diferentes entre ellas. Con propósitos de identificación, nosotros asignamos un nombre a cada población (Cuadro 7), basándonos en sus lugares de origen. Utilizando una combinación de atributos cualitativos del fruto (Cuadro 7 y Figura 5),

sus principales características son como se indica a continuación: Ixmiquilpan presenta frutos piriformes con pulpa roja, sin cavidad, con cuello largo y pedúnculo largo y delgado. Salvatierra presenta frutos piriformes con pulpa roja y cavidad muy pequeña. Tecámac presenta frutos ovoides con pulpa amarilla sin cavidad. Tetela presenta frutos ovoides con pulpa rosa, cuello muy largo y pedúnculo largo y delgado. Neza presenta frutos piriformes de tamaño muy grande con pulpa roja, cuello largo, pedúnculo largo y grueso y ostiolo muy grande. Zacapala presenta frutos ovoides con cavidad grande y pedúnculo corto y grueso.

### **Caracterización morfológica del fruto con base en atributos cuantitativos**

Los descriptores morfológicos para frutos de higo en general (IPGRI, 2003) y para las variedades Sarylop y Black Mission en particular, están disponibles en la literatura (Condit, 1955; Storey, 1977; Ersoy *et al.*, 2008; CFAB, 2011; King *et al.*, 2012; Oguzhan y Atila, 2012). Nosotros utilizamos las referencias cuantitativas del IPGRI (2003) y de las variedades Sarylop y Black Mission, como estándares para comparar las poblaciones de higos mexicanos descritas en este estudio. Así, variación significativa en el tamaño o peso del fruto fue observada entre las poblaciones de higo (Figura 6). Sin embargo, cinco de las seis poblaciones evaluadas en este estudio, presentaron un tamaño que se encuentra en el rango de valores mínimos y máximos descritos para el tamaño del fruto (biomasa fresca, longitud, diámetro y longitud del cuello). Tecámac y Zacapala produjeron frutos pequeños. Interesantemente, Neza produjo los frutos más grandes y pesados de las seis poblaciones, y además fueron más grandes y pesados que los frutos de la variedad Sarylop y Black Mission (Condit, 1955; Storey, 1977; Ersoy *et al.*, 2008; Oguzhan y Atila, 2012).



**Poblaciones de higo de diferentes estados de la República Mexicana**

**Figura 6.** Tamaño del fruto de diferentes poblaciones de higo del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), comparado con los estándares internacionales de higo (IPIGRI, 2003) y las variedades Sarylop (Ersoy *et al.*, 2008) y Black Mission (Condit, 1955; Storey 1977; CFAB, 2011). A) Biomasa fresca del fruto (g). B) Longitud del fruto (cm). C) Diámetro del fruto (cm). D) Longitud del cuello del fruto (cm). Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ).

Es probable que las diferencias en tamaño entre la variedad Neza y los estándares internacionales se deban a las condiciones ambientales. Nuestros resultados son derivados de plantas cultivadas en invernadero, mientras que los estándares internacionales fueron derivados de plantas cultivadas a campo abierto (Condit, 1955; Storey 1977; IPIGRI, 2003; Ersoy *et al.*, 2008; CFAB, 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la variedad Neza tiene un potencial enorme para la producción comercial. De acuerdo con esta conclusión, en México, el rendimiento promedio de higo en agricultura tradicional es de 4.48 Ton ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2011). Sin embargo, nosotros hemos estimado que bajo condiciones de invernadero, la variedad Neza puede producir fácilmente hasta 120 Ton ha<sup>-1</sup> por año.

### **3.6. Conclusiones**

- Los higos negros se han adaptado a condiciones ambientales locales en el centro de México, fijando genéticamente tales adaptaciones, por lo que se han generado variedades claramente distintas que representan diversidad morfológica valuable.
- Las principales diferencias morfológicas entre las variedades mexicanas de higo, identificadas en este estudio como Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza y Zacapala, son el tamaño o peso del fruto, el color de la pulpa, la longitud del cuello y la forma del pedúnculo.
- Con la caracterización morfológica de los higos negros identificados en este estudio, establecemos las bases para la futura caracterización agronómica y molecular de variedades mexicanas de higo.

### 3.7. Literatura Citada

- Aguilera O., M.; M. G. Alanis G.; C. L. García D.; C. M., Hernández B. 2009. Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 25 (2): 151-158.
- Aljane, F.; I. Toumi; A. Ferchichi. 2007. HPLC determination of sugars and atomic absorption analysis of mineral salts in fresh figs of Tunisian cultivars. *African Journal of Biotechnology*. 6: 599-602.
- Aljane, F.; A. Ferchichi. 2009. Postharvest chemical properties and mineral contents of some fig (*Ficus carica* L.) cultivars in Tunisia. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 7 (2): 209-212.
- Babalís, S. J.; G. V. Belessiotis. 2004. Influence of the drying conditions on the drying constants and moisture diffusivity during the thin-layer drying of figs. *Journal of Food Engineering*. 65: 449-458.
- California Fig Advisor Board (CFAB). 2011. Industri Overview. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [http://californiafigs.com/uploads/FIG%20FACTS%202011.pdf]
- Condit, I. J. 1955. Fig Varieties: A Monograph. *Hilgardia*. 23 (11): 323-539.
- El-Gharably, A. M.; A. I. Nagib; E. M. Rizk. 2009. Evaluation of quality attributes for egyptian apricot and fig cultivar produced by osmodrying process. *Annals Agric. Sci.* 54 (2): 359-396.
- El Gharras, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 2512-2518.
- Ersoy, N.; S. Gözlekçi; L. Kaynak. 2007. Changes in sugar contents of fig fruit (*Ficus carica* L. cv. Bursa Siyahı) during development. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2 (2): 22-26.
- Ersoy, N.; S. Gözlekci; L. Kaynak; B. Dal; K. Yazıcı. 2008. Relationship among the shoot, leaf and fruit growth of some fig (*Ficus carica*) cultivars grown in Antalya conditions. *Acta Hort.* 798: 143-148.
- Flaishman, M. A.; V. Rodov; E. Stover. 2008. The fig: botany, horticulture, and breeding. *Horticultural Reviews*. 34: 113-196.

- Flores D., A. 1990. La Higuera. Frutal mediterráneo para climas cálidos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 190 p.
- Gawade, M. H.; D. P. Waskar. 2004. Dried fig (*Ficus carica* L.) storage under various environments. Journal of Food Science and Technology (Mysore). 41 (4): 426-429.
- Goor, A. 1965. The history of the fig in the holy land from ancient times to the present day. Economic Botany. 19 (2): 124-135.
- Grivetti, L. E.; E. A. Applegate. 1997. From Olympic to Atlanta: a cultural-historical perspective on diet and athletic training. J. Nutr. 127: 860-868.
- Ilgin, M.; F. Ergenoglu; S. Caglar. 2007. Viability, germination and amount of pollen in selected caprifig types. Pak. J. Bot. 39: 9-14.
- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). 2012. Tabla de composición de alimentos de Centro América. Serviprensa, S. A. 126 p.
- IPGRI. 2003. Descriptors for Fig. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, and International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies, Paris, France. 52 p.
- King, E. S.; H. Hopfer; M. T. Haug; J. D. Orsi; H. Heymann; G. M. Crisosto; C. H. Crisosto. 2012. Describing the appearance and flavor profiles of fresh fig (*Ficus carica* L.) cultivars. Journal of Food Science. 77 (11): 41-50.
- Koyuncu, M. A. 2004. Promising fig (*Ficus carica* L.) genetic resources from Birecik (Urfa) region of Turkey. European Journal of Horticultural Science. 69 (4): 153-158.
- Melgarejo M., P. 2000. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol I. Ediciones Madrid Vicente y Mundi-Prensa. Madrid, España. 378 p.
- Muratalla L., A.; V. M. Mendoza C.; A. López J. 2012. El higo `Neza` una oportunidad para alto rendimiento. XXIV Congreso Nacional y IV Internacional de Fitogenética. Monterrey, Nuevo León. 24-28 de Septiembre. p. 110.
- Oguzhan, C.; P. Atila. 2012. Morphological diversity among fig (*Ficus carica* L.) accessions sampled from the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Turk J Agric For. 6: 179-193.

- Piga, A.; M. Agabbio; G. A. Farris. 2003. Dehydration performance of local fig cultivars. *Acta Horticulturae*. 605: 241-245.
- Piga, A.; A. Del Caro; I. Pinna. 2008. Osmo-dehydration of fig fruits with five sugars. *Acta Horticulturae*. 798: 313-318.
- Piga, A.; A. Del Caro. 2009. The influence of air drying and storage on polyphenol content of figs (*Ficus carica* L.). Proceeding for the Fourth International Symposium on Fig. Meknes, Morocco. pp: 82.
- Price, R. H; E. A. White. 1902. The fig. Bolletin No. 62. Agricultural Experimental Stations. College Station, Brazos Country, Texas.
- Slavin, J. L. 2006. Figs: Past, Present and Future. *Nutrition Today*. 41 (4): 180-184.
- Sen, F.; K. B. Meyvaci; F. Turanli; U. Aksoy U. 2010. Effects of short-term controlled atmosphere treatment at elevated temperature on dried fig fruit. *Journal of Stored Products Research*. 46: 28-33.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2011. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. México, D. F. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [www.siap.gob.mx/index.option=com\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351].
- Solomon, A.; S. Golubowicz, S.; Z. Yablowicz, Z.; S. Grossman; M. Bergman; H. Gottlieb; A. Altman; Z. Kerem; M. A. Fleishman. 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food Chem*. 54 (20): 7717-7723.
- Storey, W. B.; J. E. Enderud; W. F. Saleeb; E. M. Nauer. 1977. The Fig: its biology, history, culture and utilization. Jurupa Mountains Cultural Center, Riverside, California. 94 p.
- Toribio, F.; P. Montes. 1996. Variedades de la higuera. *Vida Rural*. 27:1-5.
- USDA. 2005. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi bin/list\_nut\_edit.pl].
- Vinson, J. A. 1999. The functional food properties of fig. *Cereal foods world*. 44 (2): 82-97.

Xanthopoulos, G.; N. Oikonomou; G. Lambrinos. 2007. Applicability of a single-layer drying model to predict the drying rate of whole figs. *Journal of Food Engineering*. 81: 553-559.

## IV. PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS DE HIGO (*Ficus carica* L.)

### 4.1. Resumen

El higo común (*Ficus carica* L.), por sus características propias, presenta contenidos elevados de látex y azúcares que dificultan la extracción de ADN de tejidos de la planta para su amplificación y análisis mediante huellas genéticas. Varios métodos han sido descritos para la extracción de ADN en diferentes especies vegetales pero no en higo. Aquí nosotros hicimos modificaciones a métodos previamente descritos y presentamos un método nuevo para la extracción de ADN a partir de hojas jóvenes y maduras, y de frutos jóvenes y maduros de higo. Nuestros resultados muestran que el método del CTAB al 4 % con nuestras modificaciones, puede ser usado para la extracción de ADN de higo. Sin embargo, la concentración y calidad del ADN varían en función de la edad del órgano utilizado para la extracción. Las hojas jóvenes son el órgano más recomendado para la extracción de ADN en concentración y calidad óptimas para su amplificación y análisis de huellas de ADN. De acuerdo con nuestros resultados, nosotros sugerimos que en estudios futuros de caracterización molecular de higo, se utilice el ADN obtenido de las hojas jóvenes.

**Palabras clave:** extracción de ADN, higo, CTAB, concentración de ADN, calidad de ADN, tejido de planta.

## A PROTOCOL FOR EXTRACTING DNA FROM FIG (*Ficus carica* L.) PLANTS

### 4.2. Abstract

The common fig (*Ficus carica* L.) as a species presents high content of latex and sugars that difficult DNA extraction from plant tissues for its amplification and analysis by genetic fingerprinting. Several methods have been described for DNA extraction for different vegetal species but fig. Here, we made modifications to methods previously described and presented a new method for extracting DNA from young and mature leaves and young and mature fruits of fig. Our results show that the 4 % CTAB method with our modifications can be used for extracting DNA from fig. However, DNA concentration and quality vary with the age of the organ utilized for the extraction. The young leaves of the fig plants are the most recommended organ for extracting DNA in an optimum concentration and quality for its amplification and DNA fingerprinting analysis. According to our results, we suggest that in future fig molecular characterization studies, DNA from the young leaves is to be used.

**Key words:** ADN extraction, fig, CTAB, DNA concentration, DNA quality, plant tissue.

### 4.3. Introducción

Los análisis de ADN se han convertido en un elemento esencial en estudios biosistemáticos, epidemiológicos, taxonómicos, de genética poblacional, evolución, y caracterización de especies y variedades (Pérez *et al.*, 2011). Las muestras de ADN pueden ser aisladas de cualquier tejido biológico (Pardo y Pérez, 2004). Sin embargo, el desarrollo de métodos moleculares modernos como la clonación, hibridación y secuenciación, requieren del establecimiento de protocolos de extracción de ADN simples y eficientes (Osorio *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2011). Actualmente, numerosos protocolos convencionales y comerciales para la extracción de ADN de diversas especies herbáceas, leñosas y perennes han sido descritos (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle y Doyle, 1987; Edwards *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993; Weir *et al.*, 1996; Csaikl *et al.*, 1998; Jewit *et al.* 1998; Lefort y Douglas, 1999; Huescas, 2004; Pérez *et al.*, 2011).

Entre los protocolos convencionales se encuentra el del CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). Este protocolo fue desarrollado inicialmente para maíz (Dellaporta *et al.*, 1983). Sin embargo, ha sido adaptado para la extracción de ADN de camote, encino, nopal, orquídeas, papa y soya (Doyle y Doyle, 1987; Ghislaim *et al.*, 1998; Jewit *et al.*, 1998; Luna, 2008; Posso, 2009; Pérez *et al.*, 2011). Este método de extracción es intensamente laborioso, consume mucho tiempo y presenta problemas por la presencia de nucleasas como la ADNasa que degradan el ADN, así como la presencia de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación (Couch y Fritz, 1990; Doulis *et al.*, 2000; Valadez y Kahl, 2000; Huescas, 2004). Sin embargo, las nucleasas pueden ser inactivadas por medio de magnesio, EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid), EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) y fenantrolina en diferentes concentraciones, en función de la especie utilizada. Las macromoléculas como las proteínas pueden ser disociadas mediante la adición de PVP (Polivinilpirrolidona) en concentración mayor al 1 % en el buffer de aislamiento inicial (Weir *et al.*, 1996; Stange *et al.*, 1998; Valadez y Kahl, 2000).

Entre los protocolos comerciales para la extracción de ADN se encuentran el del Nucleon PhytoPure™ system® (Invitrogen). Este protocolo ha demostrado ser altamente efectivo en la remoción de polisacáridos de especies como acelga, algodón, arabidopsis, araucaria, cedro, cocotero, chile, col, eucalipto, fresa, y maíz (Tepnel, 2003). Los protocolos Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit® (Sigma) y REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit® (Sigma), facilitan la extracción rápida del ADN, eliminan la necesidad de congelamiento de los tejidos, y además incluyen una mezcla para PCR formulada especialmente para la amplificación directa del ADN extraído (Sigma, 2004). El protocolo del Plant DNAzol Reagent® (Invitrogen) fue diseñado para la extracción de ADN a partir de cantidades de tejido de 0.1 g en tan solo 30 a 60 min, y puede ser utilizado en estudios de clonación y mapeo genético (Invitrogen, 2004). A pesar de la facilidad y rapidez que ofrecen los protocolos comerciales para la extracción de ADN, el protocolo del CTAB permite obtener ADN más puro e íntegro que cualquiera de ellos, por lo que sigue siendo actualmente el método de extracción más utilizado en diferentes especies (Weising *et al.*, 2005).

La integridad, la pureza, y la concentración del ADN extraído son los factores más importantes que se deben tomar en cuenta antes de proceder con el análisis molecular de cualquier tipo. La integridad puede ser determinada de manera cualitativa en minigeles de agarosa teñidos en bromuro de etidio y fotografiados bajo luz Uv. (Sambrook *et al.*, 1989; Muller y Schweiser, 1994; Weir *et al.*, 1996). La pureza y la concentración pueden ser determinadas cuantitativamente por espectrofotometría, mediante la relación de absorbancia 260/280. Si esta relación se encuentra entre 1.7 y 2.0, se considera que las muestras de ADN son puras y están libres de contaminantes celulares (Weir *et al.*, 1996). Una relación menor indica contaminación con proteínas o fenoles, y una relación mayor de 2.0 indica que las muestras contienen polisacáridos (Weir, 1996; Doulis *et al.*, 2000).

Específicamente en higo, la extracción de ADN se ha realizado con el método del CTAB. Sin embargo, los resultados obtenidos son muy variables, debido principalmente a las limitaciones para su aislamiento en cantidad y calidad adecuada

(Khadari *et al.*, 2003; Khadari *et al.*, 2004; Guasmi *et al.*, 2006; Achtak, 2009; Khaled *et al.*, 2010; Mallikarjuna *et al.*, 2010). Por esta razón, se hace necesario estandarizar protocolos de extracción de ADN de higo a partir de diferentes órganos de las plantas, que garanticen que el material genético inicial sea adecuado para su amplificación exitosa, independientemente del tipo de marcadores moleculares que se desee utilizar.

En nuestro país, se han adaptado protocolos para la extracción de ADN de cultivos como el maíz, frijol, nopal, chile, chícharo, garbanzo, encino y orquídeas (De la Cruz *et al.*, 1997; Valadez *et al.*, 2001; Garzón *et al.*, 2002; Iruela *et al.*, 2002; Huescas, 2004; Luna *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay información acerca del cultivo de higo. Nosotros colectamos y propagamos plantas de higo de seis estados del centro de México y extrajimos ADN de órganos de diferente edad. En este estudio, nosotros reportamos variación previamente no descrita de la calidad y concentración del ADN aislado de hojas y frutos de higos negros de diferentes partes de México. Para evaluar la variación en la calidad y concentración del ADN entre genotipos de higo negro del centro de México, nosotros estandarizamos un protocolo de extracción de ADN a partir de hojas jóvenes y maduras y frutos jóvenes y maduros. Nuestros resultados muestran que el ADN aislado de los higos negros presenta concentración y calidad variable en función de la edad del órgano utilizado para su extracción. Las hojas jóvenes facilitan la extracción, y el ADN aislado presenta una concentración más alta que las hojas maduras y frutos jóvenes y maduros. Nosotros sugerimos que en estudios futuros de caracterización molecular de genotipos de higo se utilice el ADN aislado de las hojas jóvenes.

#### **4.3.1. Objetivo**

Establecer un método para la extracción de ADN de plantas de higo.

### **4.3.2. Hipótesis**

Ho: La concentración y la calidad del ADN varían en función de la edad y órgano de las plantas utilizadas para su extracción.

Ha: La concentración y la calidad del ADN son constantes y no son influenciadas por la edad ni por el tipo de órgano de las plantas que se usen para la extracción.

## **4.4. Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

En este estudio se evaluaron para extracción de ADN hojas jóvenes y maduras y frutos jóvenes y maduros de seis poblaciones de higo del tipo común o partenocárpico, recolectados en diferentes estados del centro de México, en enero del 2011. Las hojas jóvenes y los frutos jóvenes, ambos de color verde claro, fueron recolectados del ápice de las plantas. Las hojas maduras, de color verde oscuro y los frutos maduros, de color negro, fueron recolectadas del tercio medio de las plantas. Las seis poblaciones fueron caracterizadas morfológicamente en el Capítulo III de esta investigación.

### **Reproducción y cultivo de las plantas**

Plantas de higo de las poblaciones de interés, y que fueron reproducidas por estacas conforme a lo descrito en el Capítulo III de esta investigación, fueron cultivadas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 8) y de manejo agronómico.

**Cuadro 8.** Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de diferentes poblaciones del centro de México, utilizadas para la extracción de ADN.

<b>Condición ambiental</b>	<b>Octubre-Diciembre del 2011</b>	<b>Enero-Marzo del 2012</b>
<b>Temperatura (°C)</b>		
Mínima	1.83	3.62
Media	17.89	17.51
Máxima	50.47	44.72
<b>Humedad relativa (%)</b>		
Mínima	15.68	18.07
Media	69.97	69.78
Máxima	92.42	93.62

### **Extracción de ADN**

Entre octubre y diciembre del 2011, cuando las plantas de higo producidas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 9) y de manejo agronómico, se encontraban al final del periodo de cosecha, se realizó la extracción del ADN a partir de hojas jóvenes y maduras y de frutos jóvenes y maduros de las poblaciones Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza, y Zacapala. Las hojas y los frutos fueron cosechados entre las 9:00 y 10:00 horas e inmediatamente fueron trasladados al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, para su utilización. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y desinfectadas en una solución de Extrán (2 %) durante 5 min. El exceso de humedad fue removido con papel absorbente. El buffer de extracción se compuso de: CTAB al 4 %, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP al 1 % y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.4 %. La extracción del ADN mediante el método del CTAB al 4 % se realizó de la siguiente manera:

1. Tres gramos de muestra de hojas o de frutos fueron trituradas manualmente con nitrógeno líquido en mortero.
2. El tejido triturado de los frutos fue transferido inmediatamente a tubos de polietileno para centrífuga de 50 ml. A cada tubo se le agregaron 15 ml del buffer de extracción (CTAB al 4 %) previamente calentado a 60 °C. Los tubos fueron agitados manualmente para homogeneizar la mezcla.
3. Los tubos con el buffer de extracción fueron incubados por 1 h a 60 °C en baño María con agitación constante (BT25 Yamato). Para asegurar que la mezcla se calentara de manera homogénea, cada 10 min los tubos fueron agitados manualmente.
4. Después de la incubación, los tubos se dejaron enfriar por 4 min. A cada tubo se le agregaron 2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y fueron agitados por 10 min en agitador orbital (Labline).
5. Los tubos fueron centrifugados (IEC CL31 Multispeed) por 15 min a 8,000 rpm.
6. La fase acuosa fue separada y colocada en un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregaron otros dos volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y fueron agitados nuevamente por 10 min en agitador orbital (Labline). Los tubos fueron centrifugados nuevamente (IEC CL31 Multispeed) por 15 min a 8,000 rpm. La fase acuosa fue colocada en el tubo que contenía la fase acuosa previamente separada.
7. A los tubos con la fase acuosa se les agregó un volumen de isopropanol al 100 % y se mezclaron por inversión varias veces. Los tubos fueron centrifugados (IEC CL31 Multispeed) por 20 min a 4,000 rpm para precipitar el ADN.
8. A la pastilla de ADN precipitado se le agregaron 5 ml de etanol al 70 %, agitándola suavemente. El ADN fue recolectado por centrifugación (IEC CL31 Multispeed) por 10 min a 12,000 rpm.
9. El etanol fue eliminado de las muestras de ADN por inversión de los tubos.
10. El ADN fue colocado en tubos eppendor. A cada tubo se le agregó 1 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH de 8.0) para su disolución.
11. Las muestras de ADN fueron incubadas por 24 h a 4 °C.

12. Las muestras fueron homogeneizadas por centrifugación (Hettich) por 10 seg a 3,000 rpm.
13. La concentración y la calidad del ADN fueron determinadas por espectrofotometría (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000).
14. La calidad del ADN fue verificada en geles de agarosa al 1 %.
15. Las muestras de ADN fueron conservadas en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Para la extracción de ADN de las hojas y frutos de higo, se utilizó un diseño experimental factorial de dos factores A y B. El factor A estuvo conformado por las edades (llamadas bloques) del órgano de la planta utilizado: 1 (hojas jóvenes), 2 (hojas maduras) 3: (frutos jóvenes) y 4 (frutos maduros). El factor B estuvo conformado por las poblaciones de higo (llamadas tratamientos) recolectados en diferentes estados del centro de México: 1 (Ixmiquilpan), 2 (Salvatierra), 3 (Tecámac), 4 (Tetela), 5 (Neza) y 6 (Zacapala). De cada combinación A y B hubo cuatro repeticiones. La unidad experimental fueron 3 g de hojas jóvenes y maduras y de frutos jóvenes y maduros obtenidos de plantas individuales. Los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett) en el paquete estadístico SAS. Se verificó que cumplieron con los supuestos básicos del análisis de varianza. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), en el paquete estadístico SAS (SAS, 1999-2000, versión 8.1). Las figuras fueron editadas en el programa Illustrator CS3 (versión 13.0) para computadora personal.

### **Variabes respuesta**

- **Concentración del ADN ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ).** La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría a 260 nm de longitud (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000), bajo el principio de que la molécula de ADN presenta su absorbancia

máxima a 260 nm (Muller y Schweizer, 1994).

- **Calidad del ADN (relación 260/280).** La calidad de ADN fue determinada por espectrofotometría (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000), con base en la relación 260/280, considerando que una muestra de ADN fue de calidad adecuada cuando presentó una relación entre 1.7 y 2.0. Posteriormente, la calidad de ADN fue verificada en geles de agarosa al 1 % sumergidos en buffer TAE (Tris-sodio Acetato-EDTA. Stock 50 X: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5 M a pH 8.0 100 mL) 1X, utilizando 10 µl de Gene Ruler 100 pb (pares de bases) Plus y 10 µl de 1 Kb (kilo bases) Plus (Thermo Scientific), como marcadores de ADN de peso molecular estándar. La electroforesis fue realizada en un analizador genético (Cleaver scientific Ltd), por 45 min a 85 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz Uv, usando un fotodocumentador (Universal Hood II, Bio Rad).

#### 4.5. Resultados y Discusión

##### **Concentración del ADN (ng µL<sup>-1</sup>)**

Para obtener ADN de higo en cantidad y calidad adecuada para su amplificación y análisis de huellas de ADN, nosotros realizamos varias modificaciones al método del CTAB al 2 % establecido por Weising *et al.* (2005). Esas modificaciones consistieron en incrementar al doble la concentración del buffer de extracción, los tiempos de incubación, los tiempos y velocidades del centrifugado y los volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico y etanol utilizados. Para determinar de qué edad y de qué tipo de órgano de las plantas de higo se obtiene ADN en mayor concentración y calidad, nosotros utilizamos hojas jóvenes, hojas maduras, frutos jóvenes y frutos maduros. El buffer de extracción al 4 % (CTAB) fue suficiente para obtener ADN en concentración media a alta, con diferencias significativas en función de la edad de las hojas (Cuadro 9). La concentración de ADN obtenido de los frutos fue baja (7.24

%) en comparación con la de las hojas. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas significativas entre frutos jóvenes y frutos maduros (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Concentración y calidad del ADN obtenido de órganos de diferente edad de varias poblaciones de higos del centro de México.

<b>Factor</b>	<b>Concentración (ng <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Calidad del ADN (relación 260/280)</b>
<b>A (Edad de los órganos)</b>		
Hojas jóvenes	931.35 ( $\pm$ 75.36) a	1.99 ( $\pm$ 0.48) a
Hojas maduras	322.68 ( $\pm$ 27.93) b	1.70 ( $\pm$ 0.16) b
Frutos jóvenes	53.66 ( $\pm$ 13.23) c	1.61 ( $\pm$ 0.14) c
Frutos maduros	37.19 ( $\pm$ 11.97) c	1.58 ( $\pm$ 0.12) c
DMS	116.06	0.11
<b>B (Poblaciones)</b>		
Ixmiquilpan	372.41 ( $\pm$ 209.98) a	1.70 ( $\pm$ 0.26) a
Salvatierra	277.30 ( $\pm$ 217.69) a	1.77 ( $\pm$ 0.20) a
Tecámac	393.30 ( $\pm$ 242.46) a	1.72 ( $\pm$ 0.21) a
Tetela	334.78 ( $\pm$ 197.27) a	1.75 ( $\pm$ 0.17) a
Neza	316.82 ( $\pm$ 173.74) a	1.80 ( $\pm$ 0.20) a
Zacapala	322.81 ( $\pm$ 182.70) a	1.72 ( $\pm$ 0.21) a
DMS	158.52	0.15
<b>A*B</b>	<b>**</b>	<b>**</b>

Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=4$ ). \*\*: Altamente significativa.

### Calidad del ADN

La calidad del ADN obtenido de órganos de diferente edad de plantas de varias poblaciones de higo, fue determinada por espectrofotometría y verificada en geles de

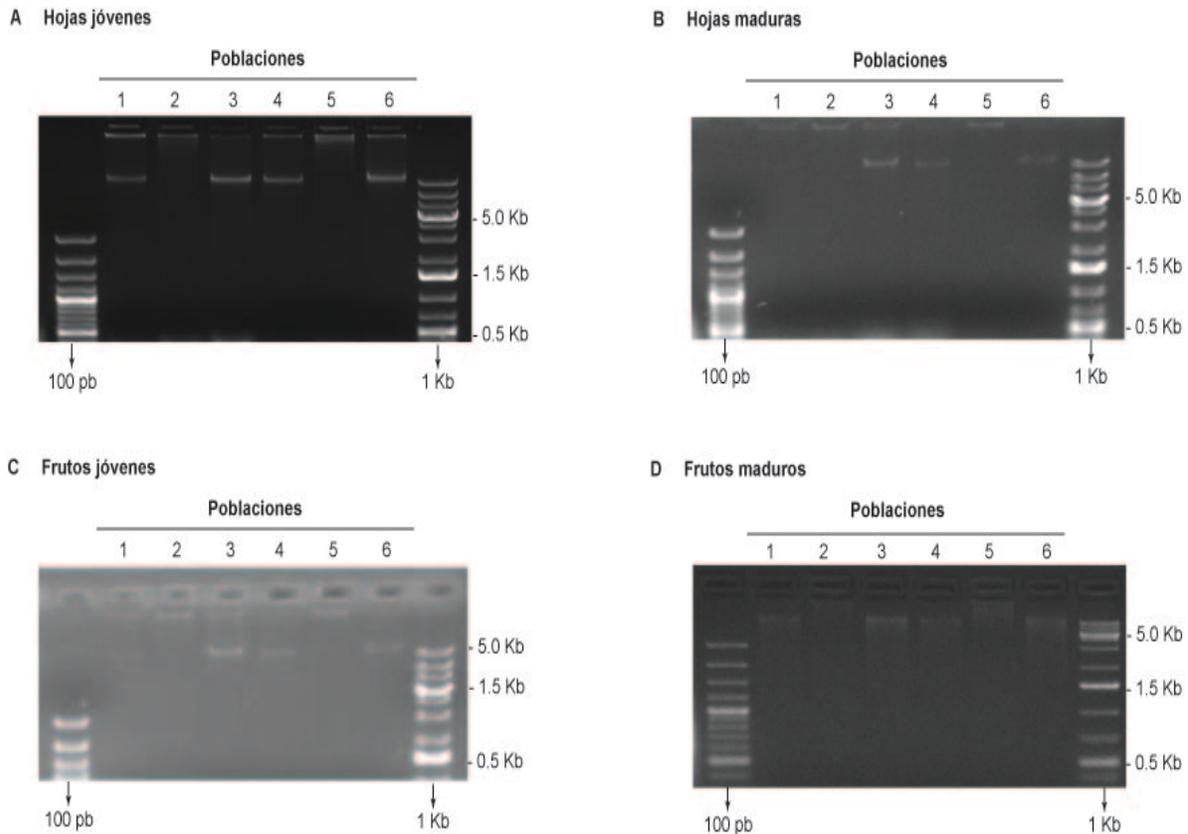
agarosa. Las mediciones cuantitativas indicaron que con el método del CTAB al 4 %, modificado por nosotros, se logró aislar ADN puro (relación 260/280= 1.7-20) con diferencias estadísticas significativas entre las hojas jóvenes y maduras de las seis poblaciones de higo evaluadas en este estudio (Cuadro 9). Sin embargo, los frutos jóvenes y maduros presentaron ADN contaminado y la pureza fue inferior (relación 260/280 <1.7) a la de las hojas (Cuadro 9). Los contaminantes pudieron haber sido principalmente los azúcares contenidos en los frutos, pues durante la extracción también se aíslan otras macromoléculas que interfieren con la pureza de los ácidos nucleicos (Couch y Fritz, 1990; Doulis *et al.*, 2000; Valadez y Kahl, 2000; Huescas, 2004).

Los resultados de este estudio sugieren que la concentración y la calidad del ADN aislado están estrechamente relacionadas, observando que las muestras más concentradas (hojas jóvenes) presentaron mayor grado de pureza, y las muestras menos concentradas (frutos maduros) presentaron menor grado de pureza (Cuadro 9). La variedad no tuvo ningún efecto sobre la concentración y la calidad de las muestras de ADN, pero la edad de los órganos utilizados sí influyó notablemente en la variación encontrada en estos dos parámetros de evaluación del ADN.

Los geles de agarosa al 1 % mostraron que con el método del CTAB al 4 % modificado por nosotros, el ADN obtenido de higo (Figura 7) se mantiene en la parte superior del gel como una banda compacta, debido al gran tamaño de los cromosomas de higo. Dos bandas de ADN se encuentran por arriba de las 8.0 Kb. El ADN genómico es la banda de mayor peso molecular. La banda que mide aproximadamente 9 Kb indica que hubo daño mecánico o degradación de ADN durante la extracción.

En las hojas jóvenes, las bandas son claramente visibles en todas las poblaciones. Sin embargo, en las hojas maduras y los frutos jóvenes y maduros, la visibilidad de las bandas disminuyó (Figura 7). Estos resultados se atribuyen principalmente a que

estas muestras de fruto y hojas maduras presentaron una concentración y calidad de ADN menor a la de las hojas jóvenes.



**Figura 7.** Calidad de DN de higo de órganos de diferente edad de varias poblaciones del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), verificada en geles de agarosa al 1 %. A) Hojas jóvenes. B) Hojas maduras. C) Frutos jóvenes. D) Frutos maduros. Los marcadores de 100 pb y 1Kb fueron utilizados como marcadores de ADN de peso molecular estándar.

Las modificaciones referidas al método del CTAB, permitieron obtener ADN de las hojas jóvenes y maduras en concentración y calidad adecuada para su amplificación (Cuadro 10, Figura 7). Resultados similares fueron publicados por Lefort y Douglas

(1999) y González *et al.* (2004), en el aislamiento de ADN de hojas jóvenes y maduras de encino rojo. El incremento del CTAB al 4 % y el PVP adicionado al buffer de extracción, favoreció el rompimiento de las células y evitó la oxidación de las muestras (Handa *et al.*, 2005). Sin embargo, las hojas jóvenes contienen látex en menor cantidad y facilitan la extracción del ADN de mayor grado de pureza.

#### **4.6. Conclusiones**

- ADN de higo de buena calidad y cantidad se pudo extraer con el método del CTAB al 4 %.
- La edad y el tipo de órgano utilizado para la extracción de ADN de higo influyen en la concentración y calidad del ADN obtenido.
- Las hojas jóvenes de las plantas de higo son el órgano más recomendado para la extracción de ADN en concentración y calidad óptimas para su amplificación y análisis de huellas de ADN.

#### **4.7. Literatura Citada**

- Achtak, H. 2009. Microsatellite Markers as Reliable Tools for Fig Cultivar Identification. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134 (6): 624-631.
- Couch, J. A.; P. J. Fritz. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter.* 8: 8-12.
- Csaikl U., M.; H. Batian; R. Brettschneider; S. Gauch; A. Meir; M. Schauerte; F. Scholz; C. Upersien; B. Vornam; B. Ziegenhagen. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, Universal maxi-preparation of High quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter.* 16: 69-86.

- De la Cruz, M.; F. Ramírez; H. Hernández. 1997. DNA isolation and amplified from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15:319-325.
- Dellaporta, S. L.; J. Wood; J. B. Hicks. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Doulis, A. G.; A. L. Harfouche; F. A. Aravanopoulos. 2000. Rapid high quality DNA isolation from cipress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the RAPD marker technique. *Plant Molecular Biology Reporter*. 17: 1-14.
- Doyle, J.J.; J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Edwards, K.; C. Johnstone; C. Thompson. 1991. A Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuclei Acids Research*. Oxford University Press. 19 (6): 1349.
- Garzón T., J. A.; G. Acosta G.; I. Torres P.; M. González C.; R. F. Rivera B.; V. Maya H.; R. G. Guevara G. 2002. Presencia de los geminivirus, huasteco del chile (PHV), texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T) y chino del tomate (VCDT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20: 45-52.
- Ghislaim M.; D. Zhang; M. R. Herrera. 1998. Protocolos del laboratorio de Biología Molecular. Tipificación Genética. Departamento de Recursos Genéticos. Manual de Capacitación. 2da Edición. Centro Internacional de la PAPA (CIP). Lima, Perú. 39 p.
- González R., A.; M. D. Arias; S. Valencia; K. Oyama. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. Laurina*(Fagaceae), two mexican red oaks. *American Journal of Botany* 91 (3): 401-409.
- Guasmi, F.; A. Ferchichi; L. Kadijafarés. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology*. 5 (15): 1370-1374.
- Gutiérrez H., G. F.; E. García R.; J. L. Arellano V.; J. Virgen V.; G. Ramírez S. 2009. Comparación molecular de la identidad genética de genotipos de maíz de diferente edad. *Agronomía Mesoamericana*. 20: 01-09.

- Handa, L.; B. P. de T. Sampaio; R. C. Quisen. 2005. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke). *Acta Amazonica*. 35: 29-33.
- Huescas E., M. I. 2004. Comparación de diferentes técnicas de extracción de ADN aplicadas a *Quercus eduardii* Trel. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. 74 p.
- Invitrogen. 2004. Invitrogen Corporation. DNAzol reagent. Consultado en Marzo del 2013. Disponible en [http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10978.pdf].
- Iruela, M.; J. Rubio; J. I. Cubero; J. Gil; T. Millán. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 104 (4): 643-651.
- Jewit, S.; I. Puddephat; J. Coveney; M. R. Davey; P. G. Alderson; K. C. Lowe; J. B. Power. 1998. Extraction of *Quercus* DNA from leaves is suitable for RAPD-PCR studies. *Tree Biotechnology Towards the Millennium*. 1: 351-357.
- Khadari, B.; I. Hochu; S. Santoni; M. Ater; F. Kjellberg; A. Oukabli; J. P. Roger. 2003. Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. *Acta Hort*. 605: 69-75.
- Khadari, B.; A. Oukabli; M. Ater; A. Mamouni; J. P. Roger; F. Kjellberg. 2004. Molecular characterization of Moroccan fig germplas using Intersimple Sequence Repeat and Simple Sequence Repeat Markers to establish a reference collection. *HortScience*. 40: 29-32.
- Khaled, C.; B. Ghada; B. A. Ahmed; S. Olfa; M. Messaoud; T. Mokhtar; S. H. Amel. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochem Genet*. 48:789-806.
- Lefort, F.; G. C. Douglas. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science*. 56 (3): 549-263.

- Luna P., A.; E. Valadez M.; A. F. Barrientos P.; V. Gallegos C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp. mediante semilla con marcadores RAPDs e ISSRs y su posible uso para diferenciación. Journal Professional Association for the Cactus Development. 3: 72-81.
- Luna P., A. 2008. Diferenciación genómica de semillas y cladodios de *Opuntia* spp., y su posible uso para diferenciación. Tesis de Doctorado. Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 128 p.
- Mallikarjuna, K. A.; E. Stover; D. Velasco; A. Koehmstedt. 2010. Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). Genetic. 138:681-694.
- Muller, H.; B. Schweiser. 1994. Biochemical applications for UV/Vis spectroscopy DNA, protein and kinetic analysis. Perkin Elmer. Ueberlingen, Alemania.
- Osorio C., E.; M. Ramírez; A. López W.; L. A. Mambuscay. 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. Revista Colombiana de Biotecnología. 11: 125-131.
- Pardo, M. A.; B. Pérez V. 2004. Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. Food Chemistry. 86: 143-150.
- Pérez A., I; L. A. Graterol; G. Osorio; C. Ramis; A. M. Bedoya; R. Figueroa R.; S. Molina; D. Infante. 2011. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Clatteya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. Bioagro. 23: 27-34.
- Posso D., D. 2009. Protocolo de extracción de ADN de plantas basado en CTAB ensayado en yucca. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Altos de Pipe, Venezuela. 3 p.
- Ramírez P., A. R.; R. Díaz R.; C. Jacinto H.; J. A. Paredes S.; R. Garza G. 2012. Diversidad de frijoles nativos de diferentes regiones del estado de Puebla. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3 (3): 467-480.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>da</sup> Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, E.U.A

- Sigma. 2004. Description of products. Consultado en Marzo del 2013. Disponible en [<http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Suite7/Suite/Suite.hjx;start=Suite.HsViewHierarchy.runDetail=Product&ProductNumber=SIGMAXNAP2&VersionSequence=1>].
- Stange, C.; D. Prehn; P. Arce-Johnson. 1998. Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. Plant Molecular Biology Reporter. 16: 1-8.
- Tepnel. 2003. Tepnel life sciences. Consultado en Marzo del 2013. Disponible en [[http://www.tepnel.co.uk/life\\_sciences/products.asp](http://www.tepnel.co.uk/life_sciences/products.asp)].
- Valadez Moctezuma, E.; G. Kahl. 2000. Huellas genómicas de ADN de plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. México, D. F. 147 p.
- Valadez M., E.; K. Gunter; J. Ramser; J. Huettel B.; I. A. Rubluo. 2001. Técnicas moleculares para caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. Rev. Fitotecnia Mexicana. 24: 103-120.
- Wang, H.; Q. Meiging; A. Cutler J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids. Res. 21: 4153-4154.
- Weir B., J.; R. Pierre P.; R. Cchibbar N. 1996. Isolation of DNA for RAPD analysis from leaves of the Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt) and other horticultural crops. Canadian Journal of Plant Science. 1: 819-824.
- Weising, K.; H. Nybom; K. Wolff; G. Kahl. 2005. DNA finger printing in plant: principles, methods, and applications. Second edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Florida. 472 p.

## V. HUELLAS DE ADN DE VARIEDADES MEXICANAS DE HIGO (*Ficus carica* L.)<sup>1</sup>

### 5.1. Resumen

Recientemente, nosotros demostramos que en nuestro país el higo común (*Ficus carica* L.) presenta diversidad morfológica natural previamente desconocida. La caracterización morfológica de poblaciones de higo en igualdad de condiciones ambientales sugiere que la diversidad en las características del fruto se debe a diferencias genéticas. Para probar esta hipótesis, hicimos un análisis de huellas genéticas usando marcadores moleculares del tipo RAPDs, ISSRs y RFLPs. Los ISSRs y RFLPs mostraron polimorfismos que claramente distinguen entre sí a todas las poblaciones. Además, nuestros resultados muestran que el higo, como especie, tiene un gen homólogo al gen Fruitfull de *Arabidopsis thaliana* que determina el tamaño del fruto. Entre las poblaciones mexicanas de higo analizadas (Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza y Zacapala), se encontró variación genética en el gen Fruitfull que tiene correlación con la forma de los frutos, y distingue claramente a las seis poblaciones. Estos resultados demuestran que las poblaciones de higo descritas en este estudio son genéticamente diferentes entre sí, y sugerimos que sean consideradas como variedades naturales derivadas de, pero diferentes de la variedad española Black Mission.

**Palabras clave:** diversidad genética, variedades de higo, huellas de ADN, marcadores moleculares.

---

<sup>1</sup>M.T. García-Ruiz, V.M. Mendoza-Castillo, E. Valadez-Moctezuma and A. Muratalla-Lúa. 2013. Journal of Genetics and Molecular Research. 12 (3): 3931-3943.

## DNA FINGERPRINTING OF MEXICAN FIG (*Ficus carica* L.) VARIETIES<sup>2</sup>

### 5.2. Abstract

Recently, we demonstrated that in our country, the common fig (*Ficus carica* L.) presents natural morphological diversity previously unknown. Morphological characterization of fig populations in equality of environmental conditions suggests that the diversity in the characteristics of the fruit owes to genetic differences. To test this hypothesis we did DNA fingerprinting analysis using RAPDs, ISSRs and RFLPs molecular markers. ISSRs and RFLPs showed polymorphism that clearly distinguishes all the populations among them. In addition, our results show that the fig, as a species, has a homologous gene to the Fruitfull gene of *Arabidopsis thaliana* that determines the size of the fruit. Among the populations of Mexican figs analyzed (Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecamac, Tetela, Neza y Zacapala), genetic variation in the Fruitfull gene was found that has correlation with the form of the fruits and distinguishes clearly the six populations. These results demonstrate that the populations of fig described in this study are genetically different among them, and we suggest that they should be considered as natural varieties derived from, but different from the Spanish Black Mission variety.

**Key words:** genetic diversity, fig varieties, DNA fingerprinting, molecular markers.

---

<sup>2</sup>M.T. García-Ruiz, V.M. Mendoza-Castillo, E. Valadez-Moctezuma and A. Muratalla-Lúa. 2013. Journal of Genetics and Molecular Research. 12 (3): 3931-3943.

### 5.3. Introducción

El uso de marcadores moleculares ha facilitado la identificación de especies y variedades mediante análisis de huellas de ADN (Khadari *et al.*, 2003; Guasmi *et al.*, 2006; Jabbarzadeh *et al.*, 2010; Khaled *et al.*, 2010; Mallikarjuna *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2011; Palai y Rout, 2011; Sarwat, 2012). Actualmente se conocen al menos 40 tipos de marcadores (Sarwat, 2012; Semagn *et al.*, 2006). Los más utilizados en análisis de ADN en plantas son los RFLPs, RAPDs, ISSRs, AFLPs y Microsatélites (Microsatellite Primed PCR) (Semagn *et al.*, 2006; Sarwat, 2012).

Los RFLPs fueron utilizados por primera vez en 1975 para identificar secuencias polimórficas de ADN en Adenovirus (Grodzicker *et al.*, 1975). En 1980, este tipo de marcadores fueron utilizados en la identificación del genoma humano (Botstein *et al.*, 1980). Más tarde, fueron adaptados para la identificación del genoma de plantas (Helentjaris *et al.*, 1986; Weber y Helentjaris, 1989). Los RFLPs requieren de una o más enzimas de restricción para detectar diferencias entre fragmentos de ADN de la misma o diferente especie (Semagn *et al.*, 2006). El número y el tamaño de los fragmentos detectados es variable entre organismos, poblaciones y especies. Las diferencias detectadas en los sitios de restricción pueden deberse a mutaciones puntuales, inserciones o deleciones, translocación, inversión y/o duplicación del ADN (Helentjaris *et al.*, 1986; Weber y Helentjaris, 1989). Las enzimas de restricción, llamadas endocucleasas provienen de bacterias. Su función es identificar y cortar secuencias de ADN de cuatro, seis u ocho pares de bases. La decisión de utilizar un tipo de enzima u otro depende principalmente del número de cortes que se prevee en el ADN de interés (Semagn *et al.*, 2006). En higo, los RFLPs han sido utilizados para evaluar diversidad genética y diferenciar poblaciones de plantas (Khadari *et al.*, 2005).

Los RAPDs aparecieron en 1990 (Welsh y McClellan, 1990). Sus principales ventajas son que permiten analizar todo el genoma, no requieren conocimiento previo del genoma que se desea estudiar, son económicos y fáciles de manejar, son eficientes

en la estimación de la diversidad genética de poblaciones con variación amplia y análisis filogenéticos (Sarwat, 2012). Sin embargo, entre sus principales desventajas se encuentran la alta sensibilidad a alteraciones en el protocolo, reproducibilidad baja, y eficiencia media a baja en la identificación de variedades (Semagn *et al.*, 2006). En higo, los RAPDs han sido utilizados en estudios de genotipificación, diversidad genética de plantas silvestres o tipo Caprifig, estimación de diferencias genéticas, y selección de clones de interés e identificación de variedades (Galderisi *et al.*, 1999; Cabrita *et al.*, 2001; De Masi *et al.*, 2003; De Masi *et al.*, 2005; Dalkilic *et al.*, 2011).

Los ISSRs se dieron a conocer en 1994 (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Este tipo de marcadores detectan polimorfismo en mayor porcentaje que los RAPDs con cada primer o iniciador utilizado, amplifican secuencias de ADN altamente conservadas entre dos microsatélites que presentan la misma secuencia de bases, permiten identificar variación natural en plantas de diferentes especies como almendro, crisantemo, higo, rosa, etc, determinar diversidad y estabilidad genética, y diferenciar híbridos y variedades (Khadari *et al.*, 2003; Guasmi *et al.*, 2006; Semagn *et al.*, 2006; Jabbarzadeh *et al.*, 2010; Khaled *et al.*, 2010; Mallikarjuna *et al.*, 2010; Satwar, 2012). El polimorfismo detectado por los ISSRs indica que en esa región particular del ADN ocurrieron mutaciones. Las diferencias entre polimorfismos denotan cierto valor en distancias genéticas (Martins *et al.*, 2003). Todas estas ventajas han convertido a los ISSRs en una de las mejores técnicas moleculares para realizar estudios sobre huellas genéticas de ADN (Khaled *et al.*, 2010; Sarwat, 2012). En higo, los ISSRs han sido utilizados con propósitos de identificación varietal y determinación de relaciones filogenéticas entre variedades (Khadari *et al.*, 2003; Guasmi *et al.*, 2006; Mallikarjuna *et al.*, 2010).

Los AFLPs surgieron en 1995 (Vos *et al.*, 1995). Son una técnica poderosa que permite utilizar ADN de excelente calidad o parcialmente degradado para la digestión, siempre y cuando esté libre de enzimas de restricción e inhibidores de la PCR (Bleas *et al.*, 1998). Su principal desventaja con respecto a otro tipo de marcadores,

es que son de alto costo económico y requieren conocimiento previo de las secuencias que se van a amplificar (Valadez y Kahl, 2000). En higo, los AFLPs han sido utilizados con propósitos de diferenciación genética de clones (Cabrita *et al.*, 2001).

Los Microsatélites aparecieron en 1993 (Meyer *et al.*, 1993). Su principal ventaja es que permiten detectar polimorfismos a nivel intra e interespecífico. Sin embargo, en análisis de genotipificación, su uso está limitado solo a algunas especies (Semagn *et al.*, 2006). En higo, los microsatélites se han utilizado en análisis de la diversidad y relaciones genéticas de colecciones de bancos de germoplasma, y en la caracterización de especies y variedades (Giraldo *et al.*, 2005; Chatti *et al.*, 2007; Mallikarjuna *et al.*, 2010).

En México, no hay información acerca de la caracterización molecular o diversidad natural de higo. En este estudio, nosotros hicimos una caracterización morfológica de higo y la complementamos con un análisis genético basado en marcadores moleculares (combinación de RAPDs, ISSRs y RFLPs). Los resultados muestran con alta precisión las características morfológicas y genéticas de poblaciones de higo colectadas en el centro de México. Estos resultados muestran por primera vez que hay variación genética entre higos negros de diferentes partes de México. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los higos negros inicialmente derivados de Black Mission se han adaptado a condiciones ambientales locales en el centro de México, generando variedades claramente distintas que representan diversidad genética valuable y previamente no descrita.

### **5.3.1. Objetivo**

Caracterizar poblaciones de higo del centro de México, mediante huellas de ADN basadas en una combinación de RAPDs, ISSRs y RFLPs.

### **5.3.2. Hipótesis**

Ho: Las diferencias genéticas entre higos de distintas partes de México pueden ser detectadas mediante huellas de ADN tipo RAPDs, ISSRs y RFLPs.

Ha: El análisis de huellas de ADN tipo RAPDs, ISSRs y RFLPs, no permitirá detectar diferencias genéticas entre higos provenientes de distintas partes de México.

## **5.4. Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

El análisis con marcadores moleculares se hizo con ADN extraído de hojas jóvenes de higos de seis poblaciones del tipo común o partenocárpicas, recolectadas en diferentes estados del centro de México, en enero del 2011. Las seis poblaciones fueron caracterizadas morfológicamente en el Capítulo III de esta investigación.

### **Reproducción y cultivo de las plantas**

Plantas de higo de las poblaciones de interés reproducidas por estacas conforme a lo descrito en el Capítulo III de esta investigación, fueron cultivadas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 10) y de manejo agronómico.

### **Extracción de ADN**

En el Capítulo IV se muestra que las hojas jóvenes son la mayor fuente de ADN de higo. Con base en eso, entre enero y marzo del 2012, se extrajo el ADN de las hojas jóvenes colectadas del ápice de 12 plantas de cada una de las seis poblaciones de higo de interés. Las hojas fueron colectadas entre las 9:00 y 10:00 horas e inmediatamente fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Las hojas fueron

desinfectadas en una solución de Extrán (2 %) durante 5 min. Posteriormente, se obtuvieron cuatro muestras de 3 g de la mezcla de hojas de cada población. Las muestras fueron trituradas con nitrógeno líquido y la extracción del ADN fue realizada siguiendo el protocolo del CTAB al 4 % modificado por nosotros (Capítulo IV). La concentración y calidad del ADN fue determinada por espectrofotometría a 260 nm de longitud (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000), y la calidad del ADN también fue verificada en geles de agarosa al 1 % sumergidos en buffer de Tris-sodio Acetato-EDTA (TAE) 1X, utilizando 10 µl de Gene Ruler 100 pb Plus y 10 µl de 1 Kb Plus (Thermo Scientific), como marcadores de ADN de peso molecular estándar. La electroforesis fue realizada en un analizador genético (Clever scientific Ltd), por 45 min a 85 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz Uv, usando un fotodocumentador (Universal Hood II, Bio Rad). Las muestras de ADN fueron conservadas a 4 °C hasta su utilización.

**Cuadro 10.** Temperatura y humedad relativa prevalecientes en el invernadero, durante la producción de higos de diferentes poblaciones del centro de México, utilizados para el análisis de huellas de ADN.

<b>Condición ambiental</b>	<b>Enero</b>	<b>Febrero</b>	<b>Marzo</b>
<b>Temperatura (°C)</b>			
Mínima	4.56	5.26	3.62
Media	16.05	18.66	17.91
Máxima	40.17	41.97	44.72
<b>Humedad relativa (%)</b>			
Mínima	27.39	18.07	23.66
Media	78.99	61.99	67.99
Máxima	93.58	93.62	90.99

En agosto del 2012, las muestras de ADN fueron enviadas al Donald Danforth Plant Science Center, en Saint Louis, Missouri, USA, para llevar a cabo los análisis de huellas de ADN. Este análisis fue parte del proyecto de la estancia doctoral realizada

por la autora principal en Danforth. Una vez que las muestras fueron recibidas, la concentración y calidad del ADN fue determinada por espectrofotometría (Thermo Scientific Nanodrop 2000 C), y la calidad del ADN también fue verificada en geles de agarosa al 1 % sumergidos en buffer de Tris-sodio Acetato-EDTA (TAE) 1X, utilizando 10 µl de Gene Ruler 100 pb Plus y 10 µl de 1 Kb Plus (Thermo Scientific), como marcadores de ADN de peso molecular estándar. La electroforesis fue realizada en un analizador genético (Cleaver scientific Ltd), por 45 min a 85 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz Uv, usando un fotodocumentador (Universal Hood II, Bio Rad). Las muestras de ADN de las seis poblaciones fueron normalizadas a una concentración de 150 ng µL<sup>-1</sup> para su amplificación.

### **Selección y diseño de primers**

Primeramente fueron seleccionados 20 primers individuales de los RAPDs y 18 primers individuales de los ISSRs (Cuadro 11). Estos primers fueron probados en higo por Kadhari *et al.* (2004) y Khaled *et al.* (2010). Posteriormente fueron diseñados tres primers específicos: Fruitfull\_F131, Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_R3056 (Figura 8 B) a partir de la secuencia del ADNc del gen número ATG560910 (Fruitfull) de *Arabidopsis thaliana* (Figura 8 A), obtenida de la base de datos de *Arabidopsis* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Para esto, la secuencia del gen Fruitfull fue alineada con la secuencia de otras especies de plantas utilizando la herramienta BLAST del banco de genes ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Los primers específicos (Cuadro 11) fueron seleccionados a partir de secuencias altamente conservadas en diferentes especies de plantas (Figura 8 A).

**Cuadro 11.** Secuencias de los primers utilizados en el análisis de huellas de ADN de diferentes poblaciones de higos del centro de México.

No.	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tipo de primer
1	ROTH-H01	GGTCGGAGAA	RAPD
2	ROTH-H02	TCGGACGTGA	RAPD
3	ROTH-H03	AGACGTCCAC	RAPD
4	ROTH-H04	GGAAGTCGCC	RAPD
5	ROTH-H05	AGTCGTCCCC	RAPD
6	ROTH-H06	ACGCATCGCA	RAPD
7	ROTH-H07	CTGCATCGTG	RAPD
8	ROTH-H08	GAAACACCCC	RAPD
9	ROTH-H09	TGTAGCTGGG	RAPD
10	ROTH-H10	CCTACGTCAG	RAPD
11	ROTH-H11	CTTCCGCAGT	RAPD
12	ROTH-H12	ACGCGCATGT	RAPD
13	ROTH-H13	GACGCCACAC	RAPD
14	ROTH-H14	ACCAGGTTGG	RAPD
15	ROTH-H15	AATGGCGCAG	RAPD
16	ROTH-H16	TCTCAGCTGG	RAPD
17	ROTH-H17	CACTCTCCTC	RAPD
18	ROTH-H18	GAATCGGCCA	RAPD
19	ROTH-H19	CTGACCAGCC	RAPD
20	ROTH-H20	GGGAGACATC	RAPD
21	(CA) <sub>8</sub> CG	CACACACACACACACG	ISSR
22	(GACA) <sub>4</sub> GT	GACAGACAGACAGACAGT	ISSR
23	(GACA) <sub>4</sub> CG	GACAGACAGACAGACACG	ISSR
24	(CA) <sub>8</sub> TG	CACACACACACACATG	ISSR
25	(ACTG) <sub>4</sub>	ACTGACTGACTGACTG	ISSR
26	(AGAG) <sub>5</sub> C	AGAGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR
27	(TC) <sub>10</sub> A	TCTCTCTCTCTCTCTCTCA	ISSR

**Cuadro 11.** Secuencias de los primers utilizados en el análisis de huellas de ADN de diferentes poblaciones de higos del centro de México (continuación).

No.	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tipo de primer
28	(CT) <sub>10</sub> G	CTCTCTCTCTCTCTCTCTG	ISSR
29	(GACAC) <sub>4</sub>	GACACGACACGACACGACAC	ISSR
30	(AGAG) <sub>5</sub> T	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR
31	(AGAC) <sub>4</sub> GC	AGACAGACAGACAGACGC	ISSR
32	(CA) <sub>8</sub> AGC	CACACACACACACACAAGT	ISSR
33	(TCC) <sub>5</sub> AGCT	TCCTCCTCCTCCTCCAGCT	ISSR
34	(CA) <sub>7</sub>	CACACACACACACA	ISSR
35	(GACA) <sub>4</sub> GT	GACAGACAGACAGACAGT	ISSR
36	(GACA) <sub>4</sub> AC	GACAGACAGACAGACAAC	ISSR
37	(GTCGATGT)CCA	GTCGATGTCCA	ISSR
38	(GACGATGA)CCT	GACGATGACCT	ISSR
39	Fruitfull_F131	ATGGGAAGAGGTAGGG	RFLP (Gen específico)
40	Fruitfull_R1218	GATACTTGAACGCTATGAT	RFLP (Gen específico)
41	Fruitfull_R3056	GATTAAGGAGAGGGAGAAG	RFLP (Gen específico)

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR fue realizada con los 20 primers individuales de los RAPDs, 18 primers individuales de los ISSRs, y tres primers diseñados a partir del Fruitfull, utilizados en parejas: Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056, usando un termociclador (MaxyGene Gradient). Los componentes de la mezcla de PCR (25 µl) fueron: 300 ng de ADN genómico, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.25 mM de dNTPs, 0.4 µM de primer, 1X ThermoPol buffer y 1 unidad de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de termociclaje de la PCR para los RAPDs fueron: 95 °C por 5 min para la desnaturalización inicial del ADN, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 40 °C por 30 seg,

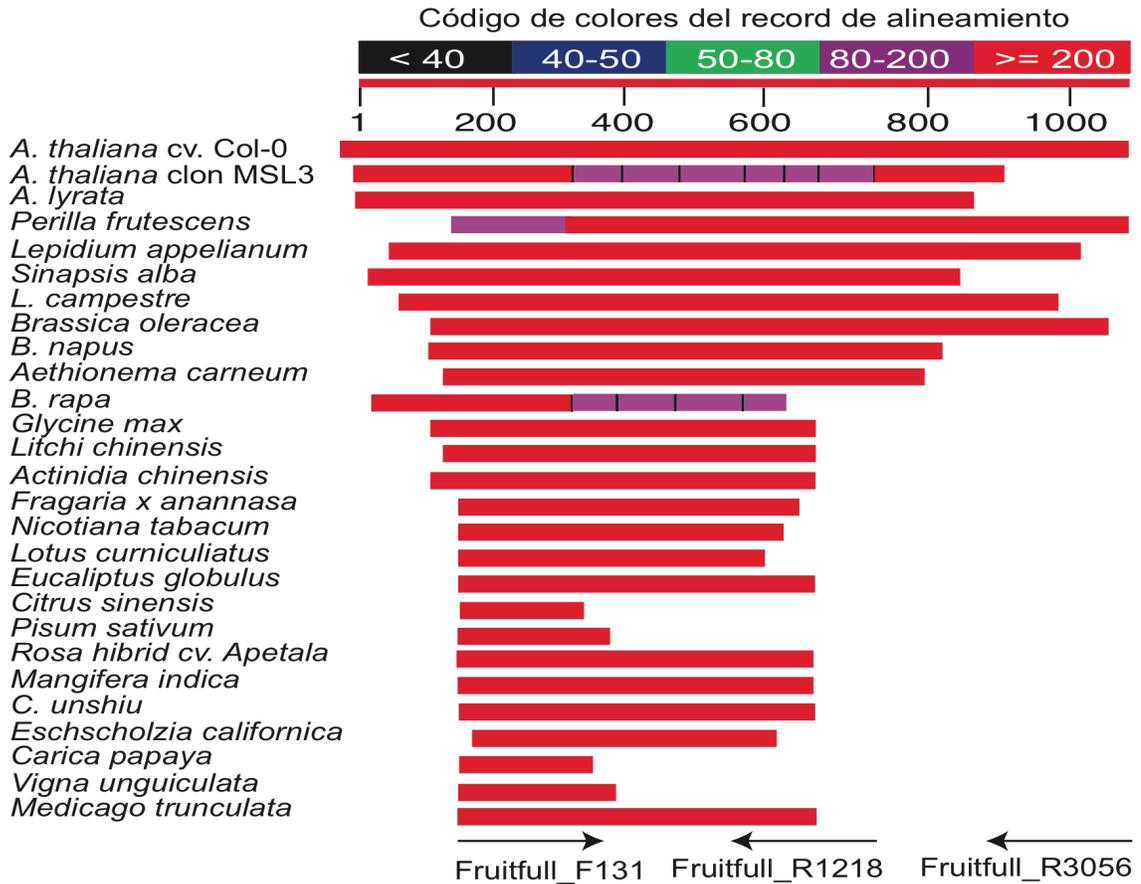
72 °C por 1 min y 40 seg y 72 °C por 10 min para la extensión final. Las condiciones de termociclaje de la PCR para los ISSRs fueron: 95 °C por 5 min para la desnaturalización inicial del ADN, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 42 °C por 45 seg, 68 °C por 1 min y 40 seg y 68 °C por 5 min para la extensión final. Las condiciones de termociclaje de la PCR para los primers derivados del Fruitfull fueron: 95 °C por 5 min para la desnaturalización inicial del ADN, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 40 °C por 45 seg, 68 °C por 3 min y 15 seg y 68 °C por 5 min para la extensión final.

Los productos de la PCR (25 µl) no digeridos, provenientes de los ISSRs y de los primers derivados del Fruitfull, fueron mezclados con 10 µl de bromofenol azul 6X. Posteriormente, 15 µl de la mezcla fueron cargados en geles de agarosa al 1% sumergidos en buffer de Tris-sodio Acetato-EDTA (TAE) 1X, utilizando 10 µl de Gene Ruler 100 pb Plus y 10 µl de 1 Kb Plus (Thermo Scientific), como marcadores de ADN de peso molecular estándar. La electroforesis fue realizada en un analizador genético (Cleaver scientific Ltd), por 45 min a 85 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz Uv, usando un fotodocumentador (Universal Hood II, Bio Rad).

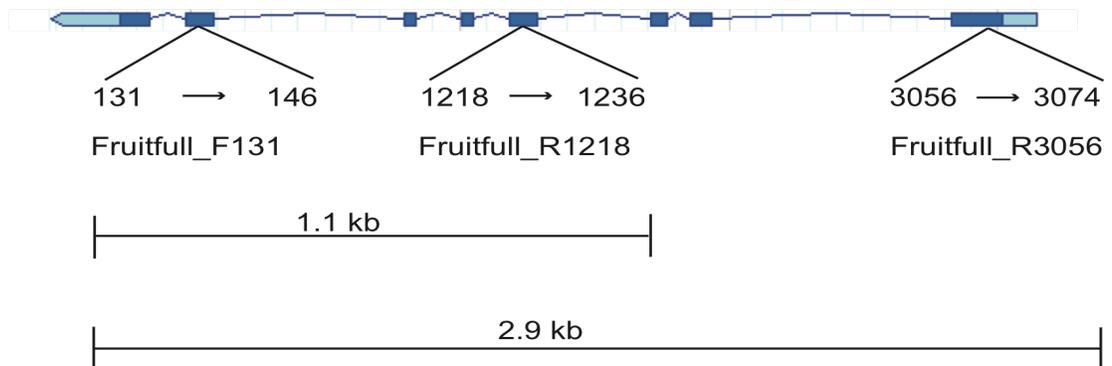
### **Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Los productos de la PCR (25 µl) no digeridos, provenientes de los ISSRs y de los primers derivados del Fruitfull, fueron sometidos a una digestión doble utilizando las enzimas de restricción BglII y BamHI, a 37 °C por 3 h. Los productos de la PCR digeridos fueron mezclados con 10 µl de bromofenol azul 6X. Posteriormente, 20 µl de la mezcla fueron cargados en geles de poliacrilamida al 6 % sumergidos en TBE buffer 0.5X, utilizando 10 µl de Gene Ruler 100 pb Plus y 10 µl de 1 Kb Plus (Thermo Scientific) como marcadores de ADN de peso molecular estándar. La electroforesis fue realizada en una cámara vertical (Dual T MVG-216-33, C. B. S. Scientific), por 150 min a 100 volts. Los geles fueron teñidos con Sybrgold (Invitrogen) y fotografiados bajo luz Uv, usando un fotodocumentador (Universal Hood II, Bio Rad).

**A** Alienamiento BLAST del gen Fruitfull de *Arabidopsis thaliana*



**B** Coordenadas de los primers



**Figura 8.** Diseño de primers utilizando la secuencia del ADNc del gen AT5G60910 (Fruitfull) de *A. thaliana*. A) Alinamiento BLAST de la secuencia del ADNc de *A. thaliana* con varias especies de plantas. B) Coordenadas de los primers utilizados basándose en la secuencia del ADN genómico del Fruitfull.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizaron tres repeticiones de cada población de higo con cada uno de los primers individuales de los RAPDs, ISSRs, y tres repeticiones para cada pareja de primers derivados del Fruitfull (Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056). El patrón de electroforesis obtenido después de la digestión con enzimas de restricción fue analizado en dos partes. Primeramente, fue estimado el tamaño de las bandas utilizando como referencia los marcadores de ADN de peso molecular estándar. Posteriormente, el patrón de bandas observado en los geles fue asignado a un sistema binario de 0 y 1. El 0 fue asignado cuando una banda estuvo ausente y el 1 fue asignado cuando una banda estuvo presente. El coeficiente de similitud de Nei y Li/Dice (Nei y Li, 1979) entre las poblaciones de higo fue determinado por análisis de clusters, mediante el método UPGMA (Unweighed pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), en el paquete para análisis de datos genéticos FreeTree (versión 0.9.1.50), considerando el método de remuestreo bootstrapping con 200 repeticiones. El árbol filogenético fue visualizado en el programa Tree View (versión 1.6.6). Las figuras fueron editadas en el programa Illustrator CS3 (versión 13.0) para computadora personal.

### **Variabes respuesta**

- **Número de bandas totales.** Fue cuantificado en el patrón de electroforesis de los geles de poliacrilamida obtenidos de cada primer individual de los RAPDs, ISSRs y de la pareja de primers del Fruitfull (Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056).
- **Número de bandas polimórficas.** Este número se obtuvo a partir del patrón de electroforesis de los geles de poliacrilamida obtenidos de cada primer individual de los RAPDs, ISSRs y de la pareja de primers del Fruitfull (Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056).

- **Polimorfismo (%).** El porcentaje de polimorfismo fue determinado con base en el número de bandas totales (NBT) y el número de bandas polimórficas (NBP) de ADN, observadas en el patrón de electroforesis de los geles de poliacrilamida obtenidos de cada primer individual y la pareja de primers derivados del Fruitfull (Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056), mediante la ecuación: Polimorfismo (%)= [(NBP \* 100)/NBT].

## 5.5. Resultados y Discusión

### Huellas de ADN de higo con RAPDs e ISSRs

Las poblaciones de higo descritas en este estudio mostraron características del fruto claramente distintas aún creciendo bajo las mismas condiciones ambientales de humedad y temperatura (Cuadro 6, 8,10, Figura 5) y de manejo agronómico, lo cual sugiere que las poblaciones de higo son genéticamente diferentes entre ellas. Para probar esta hipótesis, nosotros realizamos un análisis de huellas genéticas de ADN basado en una combinación de RAPDs, ISSRs y RFLPs (gen específico derivado del Fruitfull).

De 20 primers individuales de los RAPDs y 18 primers individuales del tipo ISSR, solo cuatro ISSRs (Cuadro 12) generaron productos de PCR abundantes y visibles en geles de agarosa al 1 % (Figura 9 A). Una banda prominente estuvo presente a 750 pares de bases (pb). Sin embargo, bandas menos abundantes estuvieron presentes entre 1 y 2 kilobases (Kb). Interesantemente, la digestión doble de los productos de PCR con las enzimas BglII-BamHI (RFLP) generó un patrón de electroforesis que permitió distinguir claramente las poblaciones de higo (Figura 9 B).

Un total de 14 bandas, 10 de ellas polimórficas (Cuadro 12), fueron observadas entre 75 pb y 1.5 Kb. La variedad Tetela presentó una banda distintiva en una posición superior a 1.5 Kb. Salvatierra presentó dos bandas distintivas a 90 y 150 pb. Ixmiquilpan presentó una banda distintiva a 150 pb. Zacapala careció de una banda

a 90 pb y otra banda a 1.4 Kb. Tecámac careció de una banda a 150 pb y presentó una banda distintiva a 1.0 Kb. Neza careció de tres bandas, una a 90 pb, otra a 150 pb y la otra a 1.0 Kb.

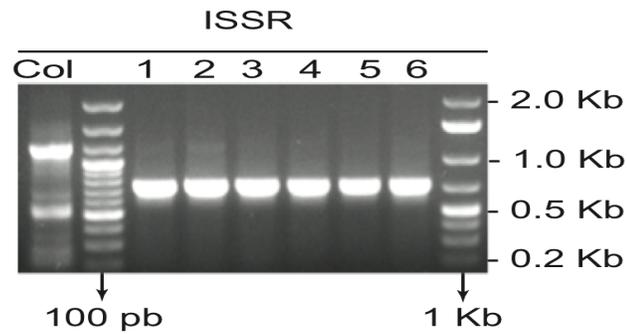
**Cuadro 12.** Número de bandas totales y polimórficas y polimorfismo de los primers que generaron bandas de ADN visibles para la diferenciación molecular de poblaciones de higos del centro de México.

No.	Nombre	Tipo de primer	T <sub>m</sub> <sup>X</sup> (°C)	A <sub>t</sub> <sup>Y</sup> (°C)	Número de bandas		PMF <sup>Z</sup> (%)
					Totales	Polimórficas	
25	(ACTG) <sub>4</sub>	ISSR	47	42	14	10	71.42
31	(AGAC) <sub>4</sub> GC	ISSR	54	49	24	12	50.00
32	(CA) <sub>8</sub> AGC	ISSR	53	48	17	7	41.18
35	(GACA) <sub>4</sub> GT	ISSR	51	46	18	15	83.33
39	Fruitfull_F131	RFLP	58	53	-	-	-
40	Fruitfull_R1218	RFLP	45	40	22*	5*	22.72*
41	Fruitfull_R3056	RFLP	48	43	26**	10**	38.46**

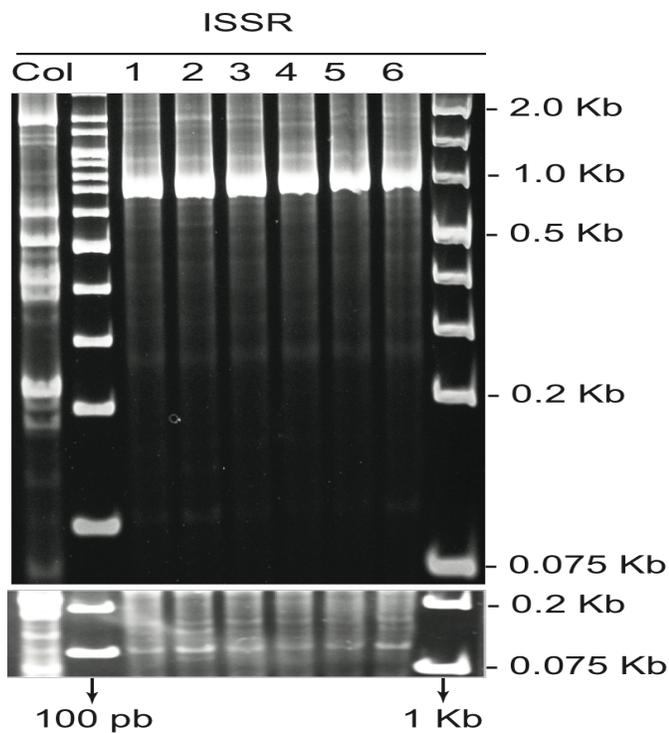
<sup>X</sup>Temperatura de fusión (°C), <sup>Y</sup>Temperatura de alineamiento (°C), <sup>Z</sup>Polimorfismo (%). \*Datos obtenidos de la pareja de primers Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218. \*\*Datos obtenidos de la pareja de primers Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056.

Utilizando el patrón de electroforesis de los geles de poliacrilamida, fue estimado el coeficiente de similaridad de Nei y LiDice (Nei y Li, 1979) entre las poblaciones de higo, mediante el método UPGMA. El análisis del cluster discriminó a todas las poblaciones evaluadas en este estudio. Con base en estos resultados, nosotros concluimos que las poblaciones descritas aquí (Ixmiquilpan, Neza, Salvatierra, Tecámac, Tetela y Zacapala) son genéticamente diferentes. Sin embargo, el árbol filogenético y el coeficiente de similaridad obtenido (Figura 10) no mostró correlación con las características del fruto (Figura 5).

### A Geles de agarosa

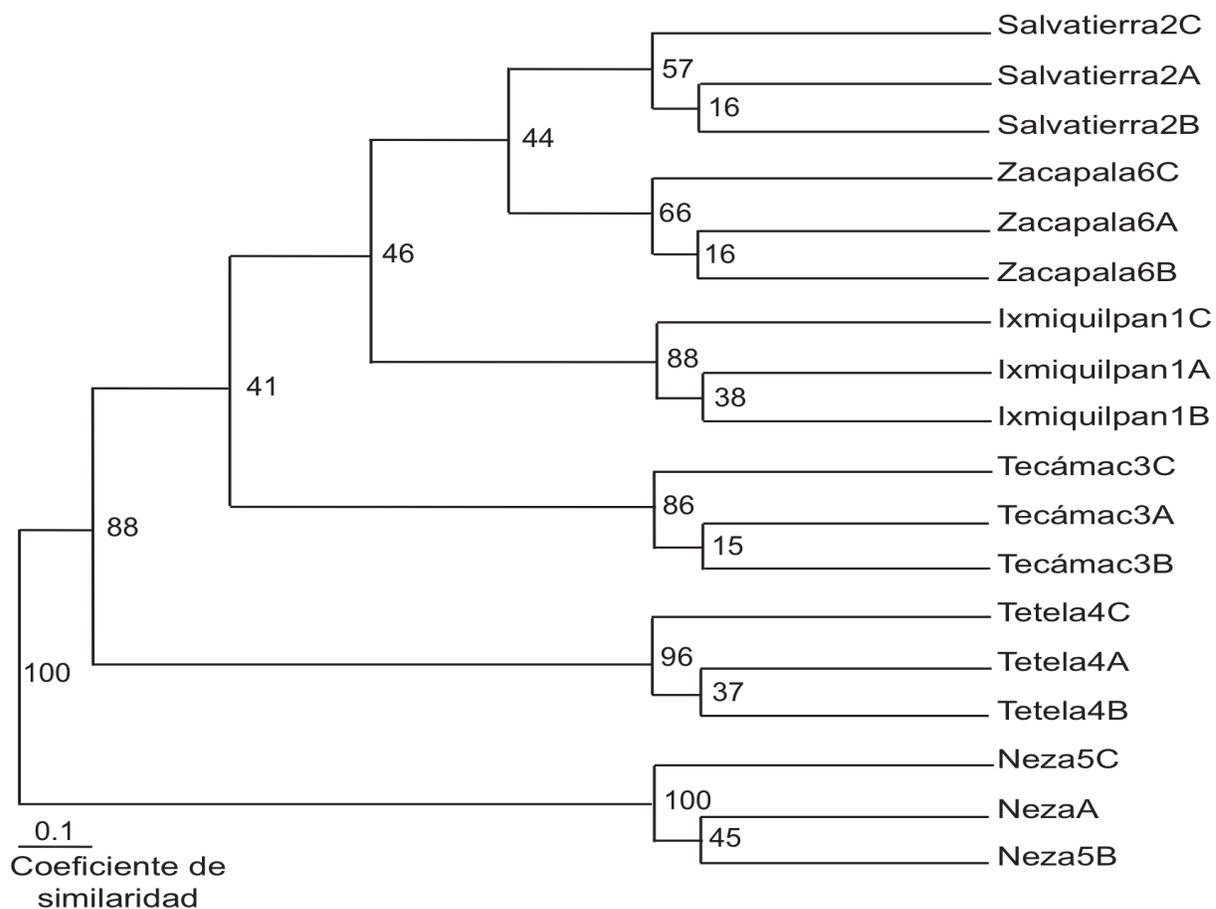


### B Geles de acrilamida



**Figura 9.** Huellas de ADN de diferentes poblaciones de higo del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), utilizando ISSRs. A. *thaliana* variedad Columbia (Col-0) fue incluida como testigo. A) Patrón de electroforesis de los productos de PCR corridos en geles de agarosa al 1 %. B) Patrón de electroforesis de los productos de PCR digeridos con las enzimas BglII-BamHI, corridos en geles de poliacrilamida al 6 %. Los marcadores de 100 pb y 1Kb fueron utilizados como marcadores de ADN de peso molecular estándar. El panel inferior de los geles de poliacrilamida muestra una exposición más larga del área entre 0.075 y 0.2 Kb.

Una explicación de la falta de correlación es que además de las características del fruto, las poblaciones descritas en este estudio posiblemente son diferentes en varias características como el contenido de azúcares, la firmeza, el sabor, el contenido de antocianinas y polifenoles, la resistencia a plagas o enfermedades, la resistencia a bajas temperaturas o a estrés hídrico. De acuerdo con esta hipótesis, nosotros hemos observado que el genotipo Ixmiquilpan presenta los frutos más firmes, mientras que Neza presenta los frutos más suaves. Tecámac ha mostrado mayor resistencia a estrés hídrico que las otras poblaciones, y Tetela ha mostrado la mayor sensibilidad a las bajas temperaturas.



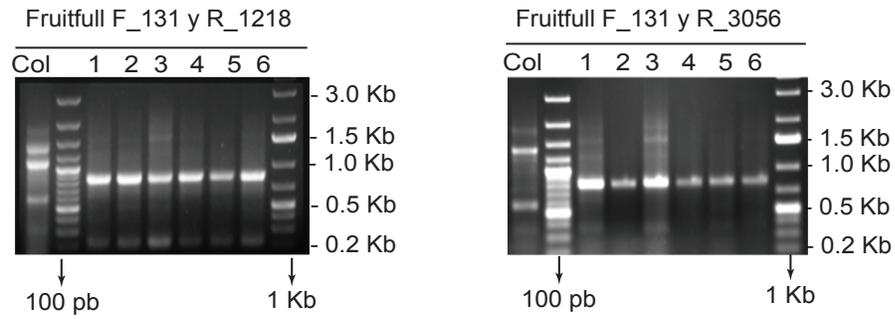
**Figura 10.** Árbol filogenético (200 remuestreos) de diferentes poblaciones de higo del centro de México, basado en los patrones de electroforesis de los geles de poliacrilamida de los ISSRs, con tres repeticiones (A, B y C) de cada población.

### **Huellas de ADN de higo con primers derivados del Fruitfull (RFLPs)**

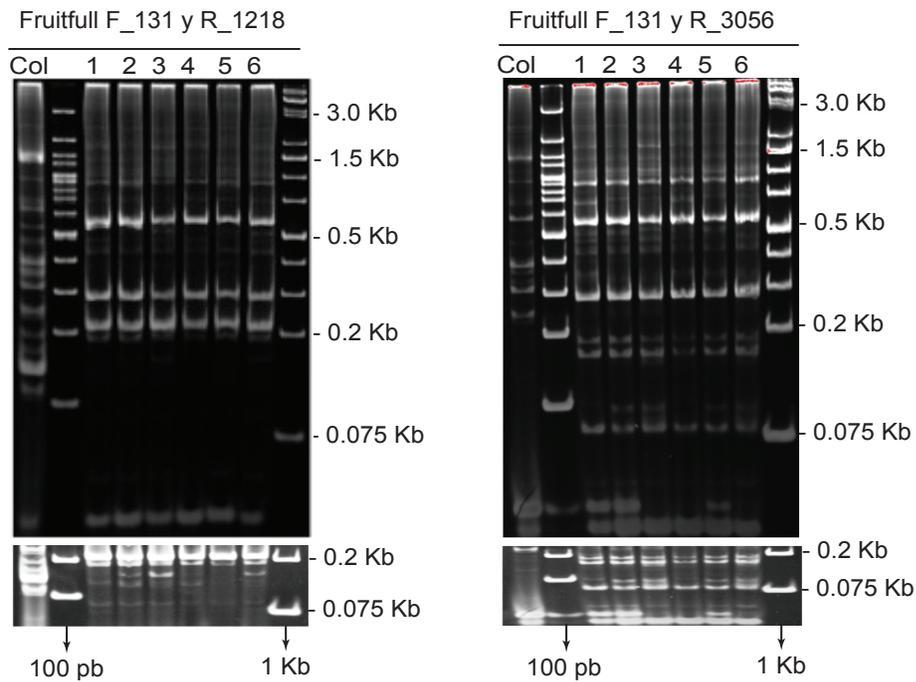
La principal diferencia entre las poblaciones de higo descritas en este estudio es la morfología del fruto (Figura 5). No existe información disponible a cerca de los genes que determinan las características en frutos de higo. Sin embargo, en la planta modelo *A. thaliana* se conocen 27 genes responsables de las características del desarrollo del fruto (Roeder y Yanofsky, 2006). Interesantemente, el gen responsable del tamaño del fruto (Fruitfull) está altamente conservado en algunas especies de plantas (Figura 8 A). Con base en este resultado, nosotros formulamos la hipótesis que el higo tiene un gen homólogo del Fruitfull. Para probar esta hipótesis, nosotros generamos un primer iniciador y dos primers reversos basados en la secuencia del Fruitfull (Figura 8 B). Estos primers fueron utilizados para la PCR del ADN genómico de los higos. En todas las poblaciones, estos primers produjeron un producto abundante de PCR de aproximadamente 900 pb (Figura 11 A). Sin embargo, fueron observadas bandas adicionales entre 200 y 500 pb y entre 2 y 3 Kb.

La digestión de los productos de PCR con las enzimas BgIII-BanHI, utilizando los primers Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 o Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056, generó varias bandas polimórficas (Cuadro 12) que permitieron distinguir claramente a todas las poblaciones. En el área entre 0.075 y 0.2 Kb, los productos de PCR digeridos utilizando la pareja de primers Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218, revelaron diferencias muy claras entre las poblaciones (Figura 11 B). Neza careció de dos bandas entre 100 y 150 pb. Ixmiquilpan careció de una banda a 150 pb y presentó una banda adicional a 75 pb. Tetela careció de una banda a 150 pb. Tecámac presentó dos bandas muy cercanas una de la otra a 150 pb. Salvatierra y Zacapala fueron muy similares. Sin embargo, estas dos poblaciones fueron diferenciadas claramente en la digestión de los productos de PCR generados al utilizar la pareja de primers Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056 (Figura 11 B). Salvatierra presentó una banda a 45 pb que estuvo ausente en Zacapala.

### A Geles de agarosa

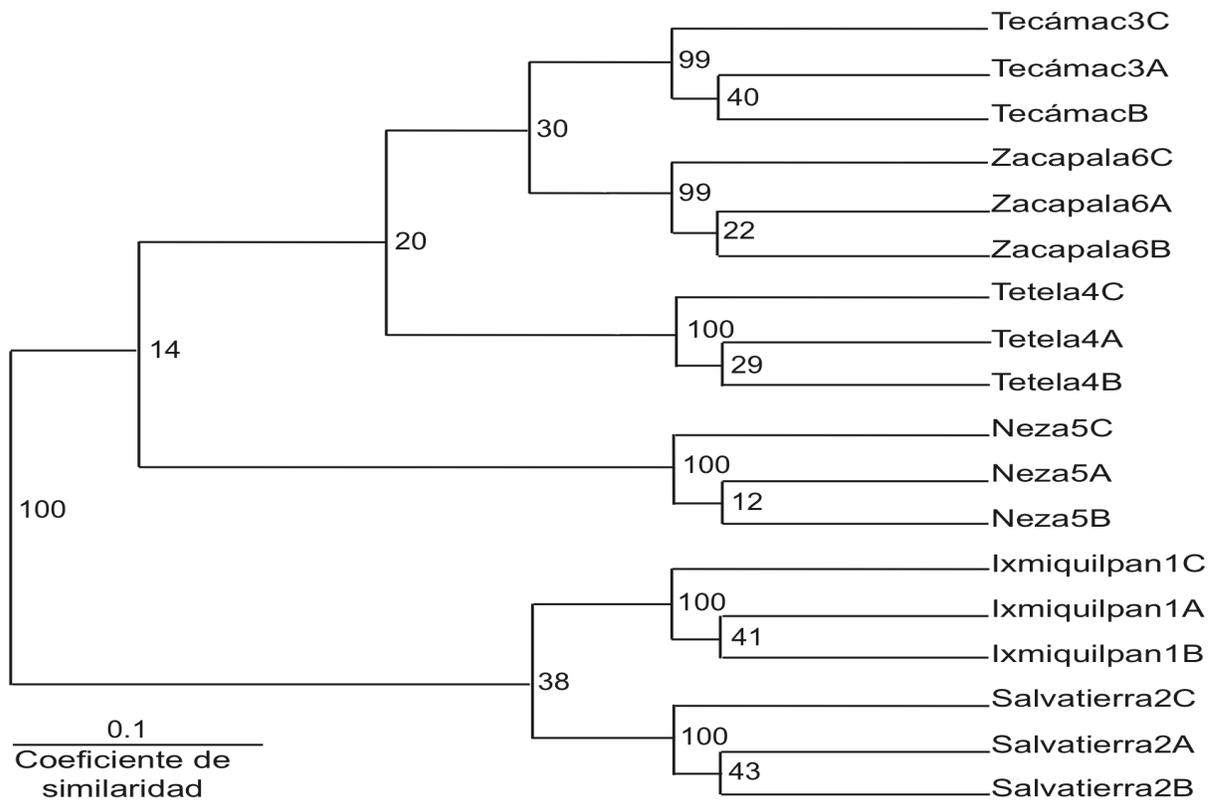


### B Geles de acrilamida



**Figura 11.** Huellas de ADN de diferentes poblaciones de higo del centro de México (1: Ixmiquilpan, 2: Salvatierra, 3: Tecámac, 4: Tetela, 5: Neza, 6: Zacapala), utilizando los primers específicos diseñados a partir del Fruitfull. A. *thaliana* variedad Columbia (Col-0) fue incluida como testigo. A) Patrón de electroforesis de los productos de PCR corridos en geles de agarosa al 1 %. B) Patrón de electroforesis de los productos de PCR digeridos con las enzimas BglII-BamHI, corridos en geles de poliacrilamida al 6 %. Los marcadores de 100 pb y 1Kb fueron utilizados como marcadores de ADN de peso molecular estándar. El panel inferior de los geles de poliacrilamida muestra una exposición más larga del área entre 0.075 y 0.2 Kb.

Con base en el patrón de electroforesis observado en los productos de PCR (primers Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_F131 y Fruitfull\_R3056), digeridos y corridos en geles de poliacrilamida, fue estimado el coeficiente de similaridad de Nei y LiDice (Nei y Li, 1979) entre las poblaciones de higo, mediante el método UPGMA. El análisis del cluster (Figura 12) discriminó a todas las poblaciones. Estos resultados confirman que las poblaciones de higo descritas en este estudio (Ixmiquilpan, Neza, Salvatierra, Tecámamac, Tetela y Zacapala) son genéticamente diferentes. Además, el árbol filogenético y la distancia genética obtenida (Figura 12) mostró una correlación muy alta con las características del fruto (Figura 5).



**Figura 12.** Árbol filogenético (200 remuestreos) de diferentes poblaciones de higo del centro de México, basado en los patrones de electroforesis de los geles de poliacrilamida de los primers específicos diseñados a partir del Fruitfull, con tres repeticiones (A, B y C) de cada población.

Los resultados de este estudio sugieren que el higo presenta un gen homólogo del gen Fruitfull que determina el tamaño del fruto y que las poblaciones de higos mexicanos descritas en este estudio han acumulado mutaciones en ese gen. Los higos negros en México se derivan de la variedad Black Mission. Sin embargo, después de cientos de años de introducción de la planta en nuestro país, el higo se ha adaptado a diferentes condiciones ambientales y ha fijado genéticamente tales adaptaciones. En este estudio, nosotros presentamos dos líneas de evidencias que muestran que las poblaciones de higo negro en México representan variedades claramente distintas entre ellos.

- 1) Huellas de ADN basadas en análisis de ISSRs.
- 2) Huellas de ADN basadas en análisis del Fruitfull (RFLPs).

Con este estudio, no podemos conocer la distancia genética que existe entre las poblaciones de higos mexicanos y la variedad Black Mission. Sin embargo, utilizando la metodología descrita aquí, esa distancia puede ser determinada. Adicionalmente, la misma metodología puede ser utilizada para caracterizar otras poblaciones de higo provenientes de cualquier lugar de México o del mundo. Esta metodología también puede adaptarse a cualquier otra especie de plantas.

## **5.6. Conclusiones**

- El higo presenta un gen homólogo del gen Fruitfull que determina el tamaño del fruto.
- Las huellas de ADN indican que las poblaciones mexicanas de higo identificadas en este estudio (Ixmiuilpan, Salvatierra, Tecamac, Tetela, Neza y Zacapala) son genéticamente diferentes entre ellas a nivel de genoma y a nivel específico del gen responsable del tamaño del fruto.

- La distancia genética que existe entre las variedades Mexicanas de higo y la variedad Black Mission puede ser determinada utilizando los primers Fruitfull\_F131, Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_R3056, diseñados en este estudio.

## 5.7. Literatura Citada

- Bleas, M. J.; S. A. De Grandis; H. Lee; J. Trevors. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 21: 99-114.
- Botstein, D.; R. L. White; M. Skolnick; R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Cabrita, L. F.; U. Aksoy; S. Hepaksoy; J. M. Leitao. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Sci. Hort.* 87: 261-273.
- California Fig Advisor Board (CFAB). 2011. Industri Overview. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en  
[<http://californiafigs.com/uploads/FIG%20FACTS%202011.pdf>]
- Chatti, K.; O. Saddoud; A. Salhi-Hannachi; M. Mars; M. Marrakchi; M. Trifi. 2007. Analysis of genetic diversity and relationships in a Tunisian fig (*Ficus carica*) germplasm collection by random amplified microsatellite polymorphisms. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 386-391.
- Condit, I. J. 1955. Fig Varieties: A Monograph. *Hilgardia.* 23 (11): 323-539.
- Dalkılıç, Z.; H. Osman M.; G. Gunver-Dalkılıç; H. Kocatas. 2011. Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology.* 10 (4): 519-526.

- De Masi, L.; M. Cipollaro; G. Di Bernardo; U. Galderisi; G. Galano; A. Cascino; G. Grassi; E. Pavone; A. Simeone. 2003. Clonal selection and molecular characterization by RAPD analysis of the fig (*Ficus carica* L.) Dottato and Bianco del Cilento cultivars in Italy. *Acta Hort.* 605: 65-68.
- De Masi, L.; D. Castaldo; G. Galano; P. Minasi; B. Laratta. 2005. Genotyping of fig (*Ficus carica* L) via RAPD markers. *J. Sci. Food Agric.* 85: 2235-2242.
- Galderisi, U.; M. Cipollaro; G. Di Bernardo; L. De Masi; G. Galano; A. Cascino. 1999. Identification of the edible fig 'Bianco del Cilento' by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Hort. Sci.* 34: 1263-1265.
- Giraldo, E.; M. A. Viruel; M. López-Corrales, J. I. Hormaza. 2005. Characterization and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80: 217-224.
- Grodzicker, T.; J. Williams; P. Sharp; J. Sambrook. 1975. Physical mapping of temperature sensitive *mutants of adenovirus*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 39: 439-446.
- Guasmi, F.; A. Ferchichi; L. Kadifjarés. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology.* 5 (15): 1370-1374.
- Hassan, H. A.; A. G. El-Homosany; H. Amina; M. A. Shaheen. 2011. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes (*Vitis vinifera* L.) Collection. *World Applied Sciences Journal.* 15 (10): 1369-1375.
- Helentjaris, T.; M. Slocum; S. Wright; A. Schaefer; J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 61:650-658.
- Jabbarzadeh, Z.; M. Khosh-khui; H. Salehi; A. Saberivand. 2010. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. *African Journal of Biotechnology.* 9 (37): 6091-6095.
- Khadari, B.; I. Hochu; S. Santoni; M. Ater; F. Kjellberg; A. Oukabli; J. P. Roger. 2003. Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. *Acta Hort.* 605: 69-75.

- Khadari, B.; C. Grout; S. Santoni; F. Kjellberg. 2005. Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: A study using mtDNA RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52: 97-109.
- Khaled, C.; B. Ghada; B. A. Ahmed; S. Olfa; M. Messaoud; T. Mokhtar; S. H. Amel. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochem Genet*. 48:789-806.
- Mallikarjuna, K. A.; E. Stover; D. Velasco; A. Koehmstedt. 2010. Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). *Genetic*. 138:681-694.
- Martins, M.; R. Teneiro; M. M. Oliveira. 2003. Genetic Relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell*. 22: 71:78.
- Meyer, W.; T. G. Mitchell; E. Z. Freedman; R. Vilgalys. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol*. 31: 2274-2280.
- Nei, M.; W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endo nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76 (10): 5269-5273.
- Palai, S. K.; G. R. Rout. 2011. Characterization of new variety of *Chrysanthemum* by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira*. 29: 613-617.
- Roeder, A. H. K.; M. F. Yanosfky. 2006. Fruit development in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* book, Number 4. American Society of Plant Biologist. Consultado en Mayo del 2012. Available at [[www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0075](http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0075)].
- Sarwat, M. 2012. ISSR: Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols: A reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. In: Nikolaus J. Sucher et al. (eds.) *Methods in Molecular Biology*. 862: 103-121.
- Semagn, K.; B. Jornstad; M. N. Ndjiandjop. 2006. An overview of molecular markers method for plants. *African Journal of Biotechnology*. 5 (25): 2540-2568.
- Storey, W. B.; J. E. Enderud; W. F. Saleeb; E. M. Nauer. 1977. *The Fig: its biology, history, culture and utilization*. Jurupa Mountains Cultural Center, Riverside, California. 94 p.

- Valadez Moctezuma, E.; G. Kahl. 2000. Huellas genómicas de ADN de plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. México, D. F. 147 p.
- Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. van de Lee; M. Hornes; A. Frijters; J. Plot; J. Peleman; M. Kuiper; M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Weber, D.; T. Helentjaris. 1989. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations. *Genetics.* 121: 583-590.
- Welsh, J.; M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Zietkiewicz, E.; A. Rafalski; D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 20:176-183.

## VI. VALOR NUTRITIVO Y NUTRACÉUTICO DE VARIEDADES MEXICANAS DE HIGO (*Ficus carica* L.)

### 6.1. Resumen

Los frutos de higo (*Ficus carica* L.) son nutritivos y saludables, no contienen grasa ni colesterol y aportan antioxidantes. La composición mineral y nutraceutica de los frutos de higo de las variedades mexicanas son completamente desconocidos. Nosotros cultivamos plantas de higo de la variedad Neza en condiciones de invernadero. En este estudio nosotros presentamos una evaluación del valor nutritivo y nutraceutico de los frutos de higo de la variedad Neza, basado en el contenido de minerales, fenoles y antocianinas totales, en diferentes épocas del año. Nuestros resultados muestran que el contenido de minerales, fenoles y antocianinas totales no varía en función de la época del año. De nueve elementos minerales analizados, los más abundantes fueron el K (1073.06), Ca (330.21), P (123.43), y Mg (121.22) en mg por 100 g de materia seca. Estos valores de Ca y K superan ampliamente a los frutos de papaya, naranja, plátano, cereza, chicozapote, ciruela, chirimoya, durazno, fresa, guanábana, guayaba, kiwi, limón, mandarina, mamey, mango, manzana, zarzamora, pitahaya, uva, pera y piña. El contenido medio de fenoles y antocianinas totales fue de 1,469.85 y 334.60 mg por 100 g de tejido fresco, respectivamente. Los análisis de HPLC demuestran que el higo contiene por lo menos 12 tipos de compuestos fenólicos. Nosotros reportamos por vez primera la presencia de luteína en frutos de higo. Los análisis bioquímicos de los higos mexicanos de la variedad Neza nos llevan a la conclusión de que los frutos de higo presentan el mismo valor nutritivo y nutraceutico en cualquier época de año.

**Palabras clave:** contenido mineral, fenoles, antocianinas, higo, compuestos fenólicos.

## NUTRITIVE AND NUTRACEUTICAL VALUE OF MEXICAN FIG (*Ficus carica* L.) VARIETIES

### 6.2. Abstract

The fig fruits (*Ficus carica* L.) are nourishing and healthy, they contain no fat or cholesterol and provide antioxidants. The mineral and nutraceutical composition of the Mexican fig fruit varieties are completely unknown. We grew Neza variety fig plants under greenhouse conditions. In this study we present an evaluation of the nutritional and nutraceutical value of the Neza fig fruits variety, based on the content of minerals, phenols and anthocyanins in different seasons of the year. Our results show that the content of minerals, phenols and anthocyanins does not vary through the seasons of the year. From nine mineral elements analyzed here, the most abundant minerals were K (1073.06), Ca (330.21), P (123.43) and Mg (121.22) in mg per 100 g of dry matter. These values of Ca and K are higher than the content of Ca and K in papaya, orange, banana, cherry, sapodilla, plum, custar apple, peach, strawberry, guanabana, guava, kiwi, lime, mandarin, mamey, mango, apple, blackberry, pitahaya, grape, pear, and pineapple. The average content of total phenols and anthocyanins was 1469.85 and 334.60 mg per 100 g of fresh tissue, respectively. This is the first time that the presence of lutein in fig fruits is detected. HPLC analysis showed that the fig contains at least 12 kinds of phenolic compounds. We reported here for the very first time the presence of lutein in fruits of fig. Biochemical analyses of the Mexican fig variety Neza lead us to the conclusion that fig fruits have the same nutritional and nutraceutical value at any time of the year.

**Key words:** mineral content, phenols, anthocyanin, fig fruits, phenolic compounds.

### 6.3. Introducción

El valor nutritivo de los frutos de higo se debe al contenido elevado de vitaminas, minerales, carbohidratos, proteínas y fibra dietética (Baccaunaud *et al.*, 1995; Ersoy *et al.*, 2007). Los compuestos más abundantes son la glucosa y la fructosa (3.49 y 2.54 mg por 100 g de materia seca, respectivamente) y los minerales como el calcio (162.0-295.86), magnesio (68.0-71.64), potasio (680.0-739.75), fósforo (67.0) sodio (10.0-28.95), hierro (2.03) y zinc (1.25) en mg por 100 g de materia seca (Aljane *et al.*, 2007; Ersoy *et al.*, 2007).

El valor nutracéutico de los frutos de higo se debe principalmente al contenido de compuestos fenólicos como los fenoles (1000 a 1100 mg kg<sup>-1</sup>) (Vinson, 1999) y antocianinas (162 mg kg<sup>-1</sup>) (Vinson, 1999; Aguilera *et al.*, 2009), y anticancerígenos como el benzaldehído (Slavin, 2006). Estos compuestos tienen importancia fisiológica, debido a que mejoran la calidad de vida del humano, mantienen niveles adecuados de salud, previenen enfermedades crónico degenerativas y actúan como antioxidantes, previniendo al organismo de daños por oxidación celular incluso a nivel de ADN (Vinson, 1999; Piga *et al.*, 2008; El Gharras, 2009).

La variedad española conocida como Black Mission es la que posee los contenidos más altos de antocianinas y la que presenta la capacidad antioxidante más elevada (36 %) de todos los tipos de higueras y colores del fruto (Solomon *et al.*, 2006). Sin embargo, el valor nutritivo y nutracéutico que presenten los frutos de higo al momento de la cosecha puede ser modificado por factores diversos, como las condiciones edafoclimáticas del cultivo, el sitio de cultivo, el tipo de higuera, la variedad, la edad de la planta, la etapa de desarrollo del fruto, la época de cosecha, y el manejo agronómico del cultivo (Baccaunaud *et al.*, 1995; Melgarejo, 2000; Piga *et al.*, 2003; Koyuncu, 2004; Ersoy *et al.*, 2008; El-Gharably *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2010).

Aun cuando el higo se consume en México y es un fruto muy apreciado, el valor nutritivo y nutracéutico de las variedades mexicanas de higo, son desconocidos. En estudios previos sobre la caracterización morfológica y genética de seis variedades mexicanas de higo, nosotros identificamos a la variedad Neza como la más sobresaliente en caracteres agronómicos. Esa caracterización fue complementada bioquímicamente, y aquí presentamos evidencias del contenido mineral y compuestos fenólicos de esta variedad en diferentes épocas del año.

### **6.3.1. Objetivo**

Determinar el valor nutritivo y nutracéutico de frutos de higo de la variedad Neza, con base en el contenido de minerales, fenoles y antocianinas.

### **6.3.2. Hipótesis**

Ho: El contenido de minerales, fenoles y antocianinas de los frutos de higo, varía con la época del año.

Ha: El contenido de minerales, fenoles y antocianinas de los frutos de higo, no varía con la época del año.

## **6.4. Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

De las seis variedades de higos mexicanos evaluadas en Capítulos previos (III y V) de esta investigación, la variedad Neza fue seleccionada para realizar estudios del valor nutritivo y nutracéutico, por presentar ésta característica agronómica

sobresaliente, como un alto potencial de rendimiento 120 ton ha<sup>-1</sup> y frutos de tamaño muy grande (100 g en promedio).

### **Reproducción y cultivo de las plantas**

Plantas de higo de la variedad Neza, reproducidas por estacas, conforme a lo descrito en el Capítulo III de esta investigación, fueron cultivadas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 13) y de manejo agronómico.

**Cuadro 13.** Temperatura y humedad relativa prevalientes en el invernadero, durante la producción de higos de la variedad Neza, utilizados para determinar el contenido de minerales, fenoles y antocianinas del fruto.

<b>Condición ambiental</b>	<b>Agosto</b>	<b>Septiembre</b>	<b>Octubre</b>
<b>Temperatura (°C)</b>			
Mínima	9.21	1.86	2.78
Media	18.77	18.26	17.50
Máxima	37.92	39.94	44.34
<b>Humedad relativa (%)</b>			
Mínima	30.58	25.37	15.68
Media	73.48	74.99	71.28
Máxima	92.46	92.95	92.42

### **Determinación del contenido de minerales, fenoles y antocianinas**

Entre agosto y octubre del 2011, cuando las plantas de higo producidas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 13) y de manejo agronómico se encontraban a la mitad del periodo de cosecha, se realizó la cuantificación del contenido de minerales, fenoles y antocianinas, en frutos completamente maduros de la variedad Neza. En cada fecha de cosecha, fueron seleccionados al azar 4 frutos provenientes del tercio medio de plantas individuales. Para asegurar que los frutos presentaran madurez homogénea al momento de la

cosecha, con base en la experiencia de la autora, fueron seleccionados higos con exocarpio completamente negro, suaves al tacto y con pedúnculo curvo. Los frutos fueron cosechados entre las 9:00 y 10:00 horas e inmediatamente fueron trasladados al laboratorio de Ciencias Ambientales del Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para la evaluación del contenido mineral; al laboratorio de Fisiología y Biofísica del Postgrado de Botánica, para determinar el contenido de fenoles y antocianinas totales; y al laboratorio de Fitoquímica, para realizar la identificación de los compuestos fenólicos.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

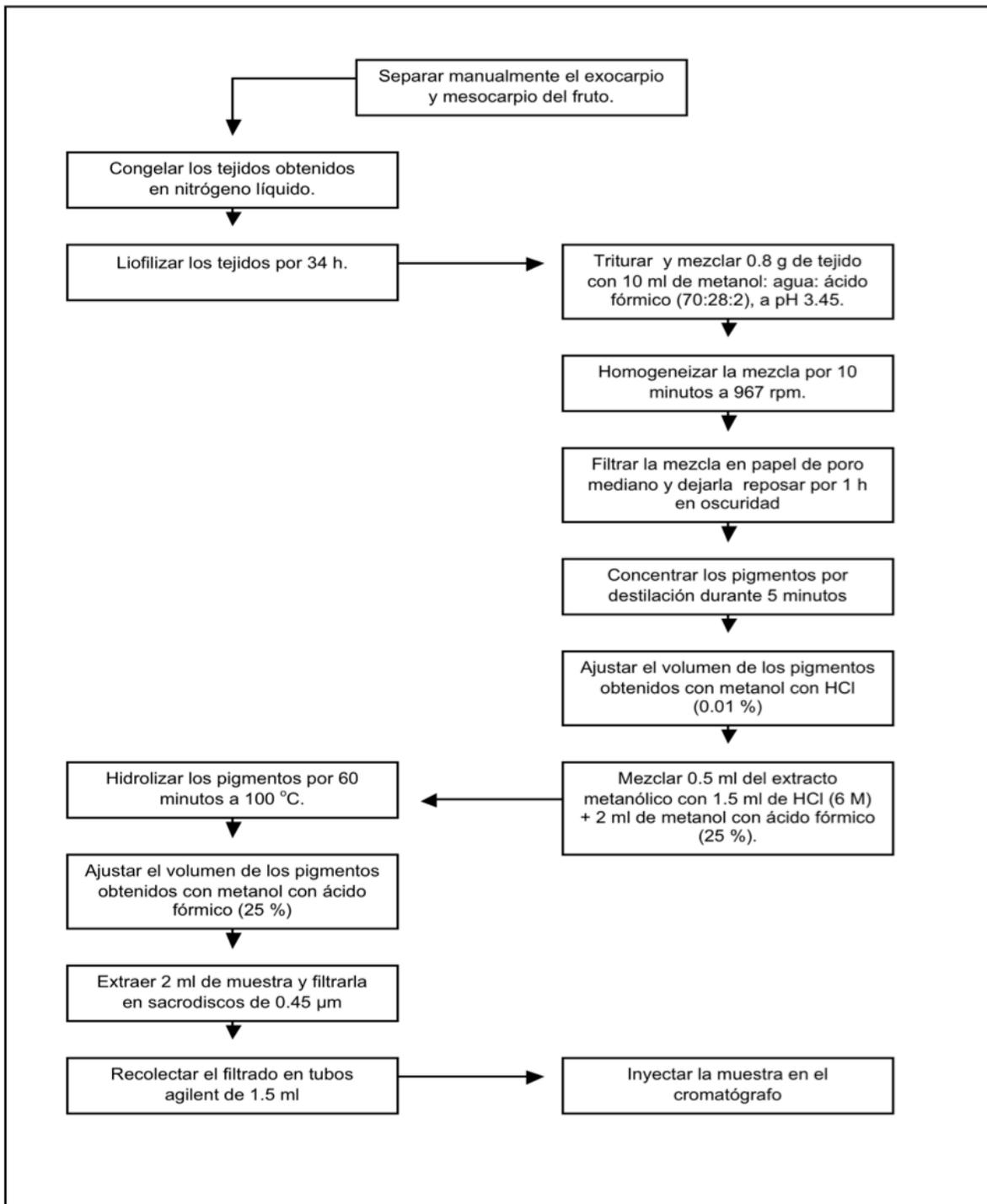
Para la cuantificación del contenido de minerales, fenoles y antocianinas de los frutos de higo, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos formados por la época de cosecha del fruto (1: 27 de agosto, 2: 20 de septiembre y 3: 29 de octubre), con 4 repeticiones cada uno. En ambos casos, los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett) en el paquete estadístico SAS. Se verificó que cumplieran con los supuestos básicos del análisis de varianza. Los datos se sometieron a análisis de varianza y pruebas de comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), en el paquete estadístico SAS para computadora personal (SAS, 1999-2000, versión 8.1). La representación gráfica de los datos se realizó en el programa SigmaPlot (versión 10.1) para computadora personal.

### **Variabes respuesta**

- **Contenido mineral.** Los frutos recién cosechados fueron sometidos a secado hasta peso constante, en un deshidratador eléctrico (Blue M, PoweroMatic 60) con aire circulante a 105 °C. Inmediatamente después, se enviaron al laboratorio de Ciencias Ambientales del Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, para la determinación del contenido mineral,

utilizando la técnica de diagnóstico en horno de microondas con HNO<sub>3</sub>. El contenido de cada elemento es expresado en mg 100 g de materia seca.

- **Fenoles totales.** Se cuantificaron con base en el método propuesto por Folin y Ciocalteu, modificado por Waterman y Mole (1994). Se trituraron 0.5 g de pulpa fresca con 5 ml de alcohol etílico al 80 %, durante 30 segundos, en un homogeneizador de tejidos. A 0.15 ml de sobrenadante se le agregaron 16.85 ml de agua desionizada y 1 ml de solución Folin y Ciocalteu. La mezcla se agitó y antes de que transcurrieran 8 minutos se le agregaron 2 ml de carbonato de sodio al 10 % y se dejó reposar por 2 h. Se tomó una alícuota de 0.1 ml y se aforó a 2 ml con alcohol etílico. La lectura de absorbancia se llevó a cabo a 760 nm en un espectrofotómetro. El desarrollo de color fue proporcional a la concentración de fenoles libres. Para calcular la concentración se utilizó una curva de calibración elaborada a partir de fenol. El resultado se expresó en miligramos por 100 gramos de tejido fresco.
- **Antocianinas totales.** Se cuantificaron con base en la metodología propuesta por Soto (2011). Se pesaron 4 g de tejido fresco y se maceraron con 10 ml de etanol acidificado (80:15 HCl). La muestra se dejó reposar durante 12 h. Después se decantó y se lavó con etanol hasta completar un volumen de 50 ml. Se centrifugó por 4 min a 20 °C a 3 rpm. Se tomó una alícuota de 0.2 ml y se aforó a 4 ml con etanol. La lectura se llevó a cabo en espectrofotómetro a 535 nm.
- **Identificación de compuestos fenólicos.** Se llevó a cabo por medio de HPLC, conforme a la metodología de Aguilera *et al.* (2009), con algunas modificaciones (Figura 13).



**Figura 13.** Secuencia de extracción e identificación de compuestos fenólicos de frutos de higo por medio de HPLC.

## 6.5. Resultados y Discusión

### Contenido de minerales

De la colección de germoplasma de seis variedades mexicanas de higo que establecimos en la Universidad Autónoma Chapingo, en el estado de México, seleccionamos a la variedad Neza por sus características morfológicas y genéticas sobresalientes, para evaluar su valor nutritivo y nutracéutico. Esta es la primera vez que se realiza un estudio de esta naturaleza en México. Las plantas fueron cultivadas en invernadero con aplicación de solución nutritiva a la largo del ciclo del cultivo. La cuantificación del contenido mineral de los frutos en diferentes épocas del año mostró que no hay variación en ninguno de los nueve elementos (Cuadro 14) evaluados en este estudio.

**Cuadro 14.** Composición mineral (mg por 100 g de materia seca) de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero en diferente época del año.

Elemento	Época del año			Media
	Agosto	Septiembre	Octubre	
Ca	362.32 a	307.39 a	320.93 a	330.21
K	1159.53 a	1056.86 a	1002.79 a	1073.06
Mg	124.31 a	132.80 a	106.54 a	121.22
Mn	0.83 a	0.80 a	0.75 a	0.79
P	116.89 a	137.80 a	115.61 a	123.43
Na	16.34 a	9.54 a	11.00 a	12.29
Fe	2.24 a	4.35 a	5.29 a	3.96
Cu	0.05 a	0.43 a	0.06 a	0.18
Zn	0.73 a	1.17 a	1.08 a	0.99

Valores seguidos por la misma letra dentro de hileras indican similitud estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).

El contenido mineral de frutos de higo de algunas variedades está disponible en la literatura (Hakerlerler *et al.*, 1998; USDA, 2005; Aljane *et al.*, 2007; INCAP, 2012). Los principales elementos que han sido identificados en los frutos frescos son el Ca, K, Mg, Mn, P, S, Na, Cu, Fe y Zn. Para *F. carica* L., en general, el contenido varía

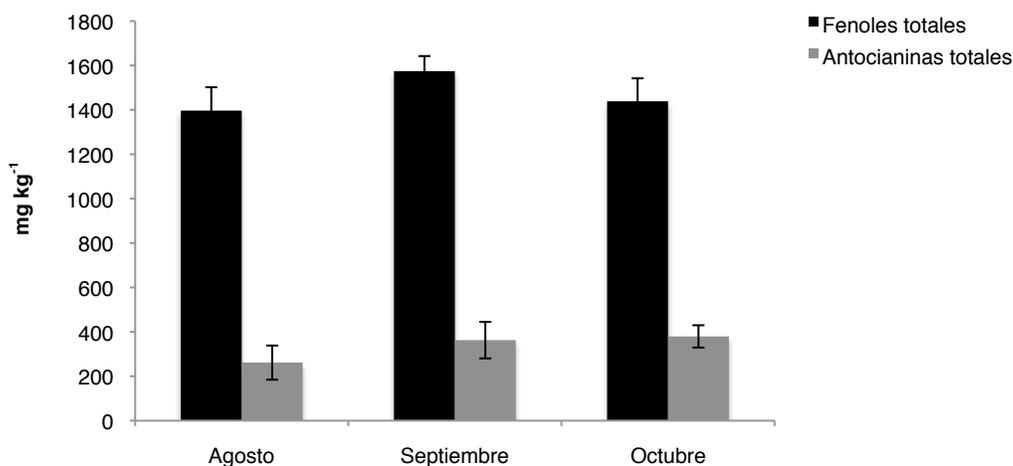
entre 0.51 y 680 (USDA, 2005) o entre 0.07 a 232 mg por 100 g de materia seca (INCAP, 2012).

Nosotros utilizamos el contenido mineral de la variedad Bursa Black como referencia para comparar a la variedad Neza evaluada en este estudio. Variación significativa fue observada en los contenidos de Ca (330.21 mg por 100 g de materia seca) y K (1073.06 mg por 100 g de materia seca), de la variedad Neza, que superan a los higos de la variedad Bursa Black en 82.87 y 74.46 %, respectivamente (Hakerlerler *et al.*, 1998). Las diferencias se atribuyen a que nuestros resultados provienen de plantas cultivadas en invernadero con fertirriego, mientras que la variedad Bursa Black fue producida en campo.

Los minerales más abundantes de los higos de la variedad Neza fueron el K, Ca, Mg y P, y los elementos más escasos fueron el Mg, Cu y Zn (Cuadro 14). El comportamiento constante de los minerales en las diferentes épocas del año se puede atribuir a que la fertilización se manejó de manera homogénea durante el ciclo del cultivo. Nuestros resultados demuestran que los higos mexicanos de la variedad Neza son fuente extraordinaria de minerales, cuyos contenidos de Ca y K superan ampliamente a los frutos de papaya (24 y 257), naranja (43 y 200), plátano (3 y 499), cereza (16 y 173), chicozapote (21 y 193), ciruela (6 y 157), chirimoya (8 y 269), durazno (10.6 y 272), fresa (16 y 153), guanábana (14 y 278), guayaba (28 y 284), kiwi (34 y 312), limón (24 y 138), mandarina (37 y 166), mamey (11 y 47), mango (12 y 178), manzana (13 y 240), zarzamora (29 y 162), pitahaya (10 y 0), uva (15 y 185), pera (6 y 119), y piña (13 y 108) mg por 100 g de materia seca (INCAP, 2012).

### **Contenido de fenoles y antocianinas totales**

El contenido de fenoles y antocianinas de los frutos de higo de la variedad Neza evaluados en este estudio también se mantuvo constante (Figura 14), lo cual indica que en invernadero se pueden producir frutos de higo de alto valor nutritivo y nutracéutico en cualquier época del año.



**Figura 14.** Contenido de fenoles y antocianinas totales de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero en diferentes épocas del año.

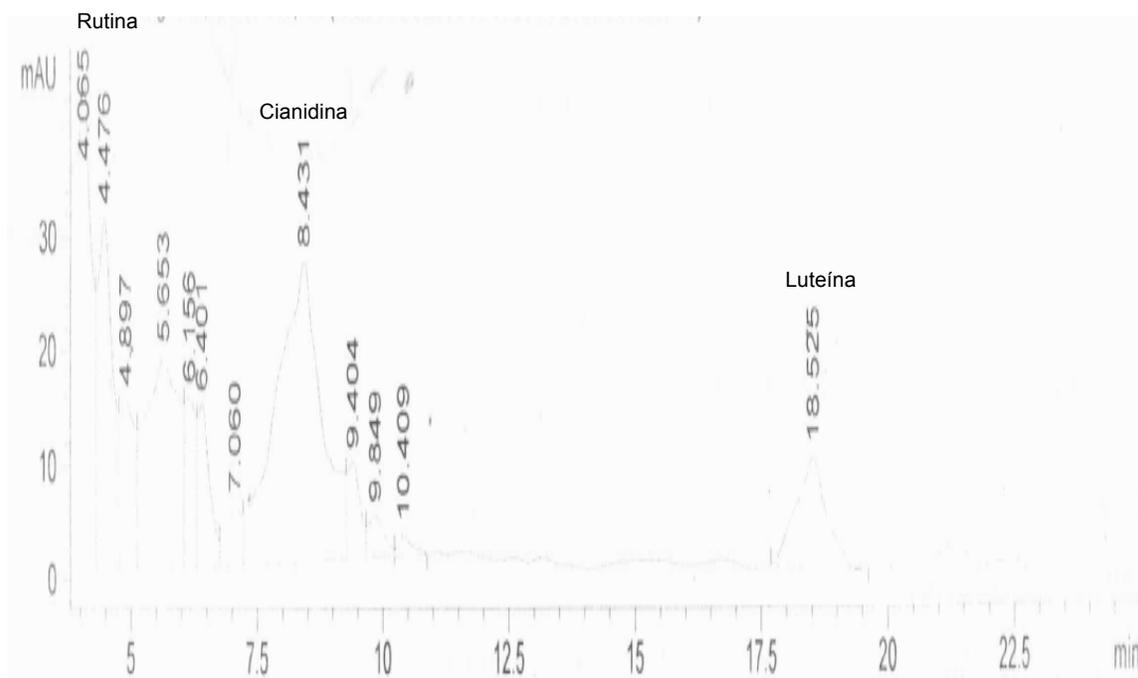
Las propiedades nutracéuticas del higo, atribuidas al contenido de fenoles y antocianinas, han sido poco estudiadas (Vinson, 1999; Piga *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2009; El Gharras, 2009). En la literatura solo está disponible la información para *Ficus carica* L. en general. Los fenoles totales varían de 1000 a 1100 mg kg<sup>-1</sup> (Vinson, 1999). En la variedad española conocida como Black Mission, el contenido de antocianinas es de 162 mg kg<sup>-1</sup> (Aguilera *et al.*, 2009). En este estudio, nosotros encontramos que los higos de la variedad Neza, presentan contenidos medios de fenoles totales de 1469.85 mg kg<sup>-1</sup> y antocianinas totales de 334.60 mg kg<sup>-1</sup>. La suma de fenoles y antocianinas es de 1,804.45 mg kg<sup>-1</sup>, superando ampliamente a la zarzamora (1,305 mg kg<sup>-1</sup>), el café (733 mg kg<sup>-1</sup>), y el vino rojo (800 mg kg<sup>-1</sup>), y mostrando valores dentro del rango del contenido de fenoles totales del arándano (250-5,000 mg kg<sup>-1</sup>) (El Gharras, 2009).

Es probable que las diferencias en el contenido de fenoles y antocianinas totales puedan deberse a variación genética, a las regiones de cultivo de las plantas, las condiciones ambientales y al método utilizado para la extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la

variedad de higo conocida como Neza es una fuente extraordinaria de antioxidantes naturales que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida del humano.

### Identificación de compuestos fenólicos

Los análisis de HPLC permitieron identificar por lo menos 12 tipos de compuestos fenólicos presentes en los frutos de higo de la variedad Neza (Figura 15). Esta es la primera vez que se reportan más de tres compuestos fenólicos en frutos de higo (Piga, *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a la falta de estándares de comparación, de los 12 compuestos, solamente tres pudieron ser identificados como rutina con un área de 22.33 %, cianidina con un área de 27.54 %, y luteína con un área de 6.61 %.



**Figura 15.** Compuestos fenólicos identificados en frutos de higo de la variedad Neza, producidos invernadero en diferentes épocas del año.

Los trabajos sobre identificación de compuestos fenólicos en frutos de higo son muy escasos (Piga, *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2009). Los compuestos identificados hasta antes de que realizáramos esta investigación eran la rutina, la cianidina y el ácido caféico (Piga, *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2009). Sin embargo, en este estudio nosotros encontramos que los higos mexicanos de la variedad Neza contienen un compuesto fenólico llamado luteína, el cual es importante porque previene la pérdida visual y protege los ojos y la piel de los efectos dañinos del sol.

La presencia de diferentes compuestos fenólicos en los higos de la variedad Neza pudiera deberse a la interacción de factores como las condiciones edafoclimáticas en que se llevó a cabo el cultivo, el tipo de higuera producida, la variedad, la edad de la planta y el manejo agronómico del cultivo.

## **6.6. Conclusiones**

- Los higos mexicanos de la variedad Neza presentan el mismo valor nutritivo y nutracéutico en cualquier época de año.
- Los minerales más abundantes de los frutos de higo de la variedad Neza son el potasio, calcio, fósforo y magnesio.
- Los higos de la variedad Neza son ricos en compuestos fenólicos, con mayor proporción de fenoles que antocianinas, resaltando uno, la luteína, que no había sido encontrado antes.

## 6.7. Literatura Citada

- Aguilera O., M.; M. G. Alanis G.; C. L. García D.; C. M., Hernández B. 2009. Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 25 (2): 151-158.
- Aljane, F.; I. Toumi; A. Ferchichi. 2007. HPLC determination of sugars and atomic absorption analysis of mineral salts in fresh figs of Tunisian cultivars. *African Journal of Biotechnology*. 6: 599-602.
- Baccaunaud, M.; J. Raynal; F. Baboulène. 1995. Maintaining quality after harvest. *Arboriculture Fruitière*. 489: 37-42.
- El-Gharably, A. M.; A. I. Nagib; E. M. Rizk. 2009. Evaluation of quality attributes for egyptian apricot and fig cultivar produced by osmodrying process. *Annals Agric. Sci*. 54 (2): 359-396.
- El Gharras, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 2512-2518.
- Ersoy, N.; S. Gözlekci; L. Kaynak; B. Dal; K. Yazıcı. 2008. Relationship among the shoot, leaf and fruit growth of some fig (*Ficus carica*) cultivars grown in Antalya conditions. *Acta Hort*. 798: 143-148.
- Hakerlerler, H.; N. Saatci; S. Hepaksoy; U. Aksoy. 1998. Fruit and leaf nutritional status of some fig clones and cultivars and relationships with some sugar fractions. *Acta Hort*. 480: 247-252.
- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). 2012. Tabla de composición de alimentos de Centro América. Serviprensa, S. A. 126 p.
- Koyuncu, M. A. 2004. Promising fig (*Ficus carica* L.) genetic resources from Birecik (Urfa) region of Turkey. *European Journal of Horticultural Science*. 69 (4): 153-158.
- Melgarejo M., P. 2000. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol I. Ediciones Madrid Vicente y Mundi-Prensa. Madrid, España. 378 p.
- Piga, A.; M. Agabbio; G. A. Farris. 2003. Dehydration performance of local fig cultivars. *Acta Horticulturae*. 605: 241-245.

- Piga, A.; A. Del Caro; I. Pinna. 2008. Osmo-dehydration of fig fruits with five sugars. *Acta Horticulturae*. 798: 313-318.
- Sen, F.; K. B. Meyvaci; F. Turanli; U. Aksoy U. 2010. Effects of short-term controlled atmosphere treatment at elevated temperature on dried fig fruit. *Journal of Stored Products Research*. 46: 28-33.
- Slavin, J. L. 2006. Figs: Past, Present and Future. *Nutrition Today*. 41 (4): 180-184.
- Solomon, A.; S. Golubowicz, S.; Z. Yablowicz, Z.; S. Grossman; M. Bergman; H. Gottlieb; A. Altman; Z. Kerem; M. A. Fleishman. 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food Chem*. 54 (20): 7717-7723.
- Soto H., M. 2011. Manual de Prácticas de Fotoquímica. Colegio de Postgraduados.
- USDA. 2005. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en [[http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi bin/list_nut_edit.pl)].
- Vinson, J. A. 1999. The functional food properties of fig. *Cereal foods world*. 44 (2): 82-97.
- Waterman, P. G., S. Mole. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. *Ecological Methods and Concepts*. Volume 1 of *Methods in Ecology*. Blackwell Scientific. 238 p.

## VII. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DEL DETERIORO POSTCOSECHA DE HIGO (*Ficus carica* L.)

### 7.1. Resumen

El fruto de higo (*Ficus carica* L.) es atacado por diversas clases de microorganismos que generan pérdidas postcosecha hasta del 50 %. El control de microorganismos se realiza con productos químicos que restringen la comercialización del fruto por los efectos nocivos en la salud de los consumidores. En México, se desconoce la clase de microorganismos causantes de las pérdidas postcosecha de higo y su control. Nosotros planteamos la hipótesis de que los frutos de higo son atacados por diversas clases de microorganismos. Para probar esta hipótesis, nosotros cultivamos plantas de higo de la variedad Neza en condiciones de invernadero. Aquí presentamos un estudio de la efectividad de diferentes compuestos seguros sobre el control de microorganismos causantes de las pérdidas postcosecha del fruto. Nuestros resultados muestran que los frutos de higo únicamente fueron atacados por hongos. No se detectó la presencia de bacterias ni levaduras en los frutos. La principal causa de las pérdidas postcosecha de los frutos de higo fueron hongos de cinco géneros distintos: *Cladosporium sphaerosperum*, *Fusarium equiseti*, *Hiphopichia burtonii*, *Penicillium citrinum* y *Rhizopus niger*. Cabe resaltar que *Hyphopichia burtonii* es identificado por primera vez en frutos de higo en este estudio. El análisis de efectividad mostró claramente que de los tres compuestos seguros evaluados, el cloruro de calcio al 1 % fue altamente efectivo en el control de la mayoría de los patógenos identificados en este estudio. Estos resultados nos llevan a la conclusión de que los compuestos seguros son una buena alternativa para el control de microorganismos, disminución de las pérdidas postcosecha y extensión de la vida útil de los frutos de higo.

**Palabras clave:** compuestos seguros, variedades de higo, pérdidas postcosecha, hongos.

## IDENTIFICATION AND CONTROL OF FUNGI CAUSING FRUIT POSTHARVEST DECAY IN MEXICAN FIG (*Ficus carica* L.)

### 7.2. Abstract

The fig (*Ficus carica* L.) fruit is attacked by diverse classes of microorganisms that generate a postharvest decay up to 50 %. The control of microorganisms is realized with chemical products that restrict the commercialization of the fruit due to harmful effects in the health of the consumers. In Mexico, the kind of microorganisms that causes fig postharvest decay and their control are unknown. We propose the hypothesis that the fig fruits are attacked by diverse kinds of microorganisms. To prove this hypothesis, we cultivate plants of Neza fig variety under greenhouse conditions. Here we present a study of the efficiency of different safe compounds on the control of microorganisms that cause fig fruit postharvest decay. Our results showed that the fig fruits were attacked only by fungi. There was detected neither the presence of bacteria nor yeasts in the fruits. The principal reason of the fig postharvest decay was fungi of five different kinds: *Cladosporium sphaerosperum*, *Fusarium equiseti*, *Hiphopichia burtonii*, *Penicillium citrinum* and *Rhizopus niger*. It is important to mention that *Hyphopichia burtonii* is identified by the very first time in fig fruits in this study. The analysis of efficiency showed clearly that from three safe compounds evaluated, the 1 % chloride of calcium was highly effective in the control of the majority of the pathogens identified in this study. These results lead us to the conclusion that the safe compounds are a good alternative for controlling microorganisms, reducing postharvest decay and extending shelf life of the fig fruits.

**Key words:** safe compounds, fig varieties, postharvest decay, fungi.

### 7.3. Introducción

El higo es un fruto climatérico altamente perecedero (Kader, 2002), cuya vida de anaquel a temperatura ambiente no supera los dos días (Venditti *et al.*, 2005). En estado maduro, se dificulta el manejo del fruto y su distribución hacia los centros de consumo, debido principalmente a que la suavidad propicia daños mecánicos que demeritan la calidad por rompimiento de la piel. En general, un fruto de higo de calidad adecuada para el consumo debe presentar un contenido mínimo de sólidos solubles de 14.0 % y estar libre de contaminantes físicos y biológicos (Kader, 2002).

El higo se cultiva en más de 48 países a nivel mundial, con una producción que supera el millón de toneladas anuales (FAO, 2010). Sin embargo, en postcosecha el fruto es atacado por diversas clases de microorganismos, principalmente hongos toxigénicos como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Isman y Biyik, 2009), y por cantidades elevadas de bacterias ( $2.20\text{-}2.73\text{ cfu g}^{-1}$ ) y de levaduras ( $26.5\text{ cfu g}^{-1}$ ) (Demirbuker *et al.*, 2004), que provocan cambios bioquímicos y fisiológicos como la pérdida de peso, modificación del color y sabor, ablandamiento excesivo e incremento de la producción de etileno. Como consecuencia, la vida de anaquel de la infrutescencia es de sólo dos días (Venditti *et al.*, 2005).

El control de patógenos en higo se realiza con productos químicos que generan efectos residuales, lo que restringe la comercialización del fruto por los efectos nocivos en la salud de los consumidores (Sen *et al.*, 2009). En contraste, otros productos denominados “compuestos seguros” no causan efectos negativos en la salud (Venditti *et al.*, 2005), por lo que podrían ser una alternativa para el control de microorganismos y extensión de la vida útil del fruto de higo.

El carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y el ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), de 0.5 a 3 %, han demostrado ser eficaces en el control de *Botrytis cinerea*. El bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 0.5 %, el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 3 % y ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) al 1 %, ayudan a disminuir las pérdidas postcosecha en chabacano, granada, kiwi y

nararanja, además de que incrementan significativamente la firmeza del fruto (Antunes *et al.*, 2007). El agua caliente mezclada con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 2.5 %, no permite un buen control de microorganismos en frutos de higo (Demirbuker *et al.*, 2004).

En México, la producción de higo se lleva a cabo a campo abierto en condiciones de secano. Sin embargo, la época de cosecha se presenta durante los meses de junio y julio, lo cual coincide con la época de lluvias (SIAP, 2010). Por esta razón, el fruto presenta coloraciones desuniformes y es altamente susceptible a sufrir pudriciones y ablandamiento excesivo, que demeritan su calidad y causan pérdidas postcosecha hasta del 50 %. Esto ocurre principalmente porque el ostiolo favorece la entrada de agua y microorganismos al interior del fruto, que son difíciles de controlar (Melgarejo, 2000).

Con la producción en invernadero, los frutos de higo se protegen de las bajas temperaturas, la lluvia y el granizo, por lo que la cosecha de higo se puede extender hasta por ocho meses, obteniendo hasta  $120 \text{ ton ha}^{-1}$  (Mendoza, 2009). Sin embargo, se ha observado contaminación con diversas clases de microorganismos que demeritan la calidad, disminuyen la vida de anaquel, y generan pérdidas postcosecha de un 20 a 30 %.

La variedad mexicana de higo conocida como Neza presenta un alto potencial de rendimiento en cultivo bajo invernadero. Sin embargo, se desconocen las causas del deterioro postcosecha de los frutos de higo y su control. Aquí reportamos la identificación de por lo menos cinco clases de microorganismos causantes del deterioro postcosecha del fruto de higo y su control con diferentes compuestos seguros, que permiten obtener frutos de calidad adecuada para su comercialización, además de prolongar la vida de anaquel de los frutos y disminuir las pérdidas postcosecha.

### **7.3.1. Objetivo**

Identificar las causas del deterioro postcosecha de frutos de higo de la variedad Neza y su control, basado en un análisis de efectividad de diferentes “compuestos seguros”.

### **7.3.2. Hipótesis**

Ho: El deterioro postcosecha de los frutos de higo es causado por diversas clases de microorganismos.

Ha: El deterioro postcosecha de los frutos de higo no es causado por diversas clases de microorganismos.

## **7.4. Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

De las seis variedades de higos mexicanos evaluadas en Capítulos previos (III, V y VI) de esta investigación, la variedad Neza fue seleccionada para realizar estudios, sobre las causas del deterioro postcosecha del fruto, por presentar características agronómicas sobresalientes, como un alto potencial de rendimiento  $120 \text{ ton ha}^{-1}$  y frutos de tamaño muy grande (100 g en promedio) y contenido elevado de minerales, fenoles y antocianinas en cualquier época del año.

### **Reproducción y cultivo de las plantas**

Plantas de higo de la variedad Neza, reproducidas por estacas, conforme a lo descrito en el Capítulo III de esta investigación, fueron cultivadas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales (Cuadro 15) y de manejo agronómico.

**Cuadro 15.** Temperatura y humedad relativa prevalientes en el invernadero, durante la producción de higos de la variedad Neza, utilizados para identificar las causas del deterioro postcosecha del fruto.

Condición ambiental	Agosto	Septiembre	Octubre
<b>Temperatura (°C)</b>			
Mínima	9.21	1.86	2.78
Media	18.77	18.26	17.50
Máxima	37.92	39.94	44.34
<b>Humedad relativa (%)</b>			
Mínima	30.58	25.37	15.68
Media	73.48	74.99	71.28
Máxima	92.46	92.95	92.42

### **Identificación de microorganismos causantes del deterioro postcosecha de higo**

En septiembre del 2011, los frutos maduros recién cosechados del tercio medio de plantas individuales fueron sumergidos en soluciones de agua, ácido acético en agua al 1 % (v:v), bicarbonato de sodio en agua al 1 % (p:v) y cloruro de calcio al 1 % en agua (p:v) por dos minutos y se dejaron secar durante una hora. Inmediatamente después, los frutos fueron incubados en una cámara húmeda durante tres días a 24 ( $\pm$  0.6) °C, conforme a las especificaciones de Rondón (1974). Con base en la coloración del micelio desarrollado, se cuantificó el porcentaje de frutos infestados y el número de colonias desarrolladas en el exocarpio y el mesocarpio. Posteriormente, se aislaron muestras de cada colonia de los frutos infestados y se inocularon en cajas Petri con medio de cultivo selectivo para hongos (PDA). Para la identificación de géneros, los cultivos se incubaron durante cinco días a 23 ( $\pm$  1.8) °C, aplicando la metodología de Oztekin *et al.* (2006). Inmediatamente después, se realizaron preparaciones con glicerol para diferenciar las estructuras de los microorganismos bajo observación al microscopio electrónico, apoyándose en las claves de Barnett (Barnett y Hunter, 1987). Para la identificación de especies, entre

octubre del 2011 y marzo del 2012, las colonias de microorganismos se dejaron crecer hasta invadir completamente la caja Petri, conforme a Oztekin *et al.* (2006). Las cepas se aislaron y se transfirieron a un medio de cultivo nuevo para su purificación y conservación en aceite mineral estéril hasta su utilización. Finalmente, en febrero del 2012, las cepas fueron enviadas a la empresa conocida como Mycrogen, para la extracción de ADN y secuenciación. En mayo del 2012, durante la estancia doctoral realizada en el Donald Danforth Plant Science Center de Saint Louis Missouri, se realizó la identificación de las especies de microorganismos, con base en las secuencias enviadas por la empresa, utilizando la herramienta BLAST del banco de genes ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Para la identificación de los microorganismos causantes de las pérdidas postcosecha de los frutos de higo, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos conformados por el tipo de fungistático utilizado: 1 (testigo), 2 (ácido acético en agua al 1 %, v:v), 3 (bicarbonato de sodio en agua al 1 %, p:v) y 4 (cloruro de calcio al 1 % en agua, p:v). Cada tratamiento constó de 20 repeticiones. La unidad experimental fue un fruto. Para la efectividad fungistática de los compuestos seguros, se utilizó un diseño experimental factorial con dos factores (A y B). El primer factor A estuvo conformado por los compuestos seguros (Bloques): 1 (testigo), 2 (ácido acético en agua al 1 %, v:v), 3 (bicarbonato de sodio en agua al 1 %, p:v) y 4 (cloruro de calcio al 1 % en agua, p:v), mientras que el segundo factor B lo conformaron los tratamientos, dados por las colonias de hongos identificados: 1 (*Cladosporium* spp.), 2 (*Fusarium* spp.), 3 (*Hyphopichia* spp.), 4 (*Penicillium* spp.) y 5 (*Rhizopus* spp.). Cada tratamiento constó de 20 repeticiones. En ambos casos, los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett) en el paquete estadístico SAS. Se verificó que cumplieran con los supuestos básicos del análisis de varianza. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), en el paquete estadístico SAS (SAS, 1999-2000, versión 8.1). La representación

gráfica de los datos se realizó en el programa SigmaPlot (versión 10.1) para computadora personal.

### **Variables respuesta**

- **Infestación de frutos (%).** Se determinó con base en el número de frutos totales evaluados (NFT) y el número de frutos infestados (NFI) con algún tipo de microorganismo, mediante la ecuación: Infestación de frutos (%)=  $[(NFI * 100)/NFT]$ .
- **Número de colonias desarrolladas.** Fue determinado con base en la coloración del micelio desarrollado, aplicando la metodología de Rondón (1974).
- **Género de microorganismos desarrollados.** Fue determinado por observación de las estructuras de los microorganismos bajo microscopio electrónico, apoyándose en las claves de Barnett (Barnett y Hunter, 1987).
- **Especie de microorganismos desarrollados.** Fue determinada por análisis de secuenciación de ADN obtenido a partir de las cepas de los microorganismos conservados en aceite mineral.
- **Efectividad fungistática (%).** Fue determinada con base en el número de frutos totales evaluados (NFT) y el número de frutos infestados (NFI) con algún tipo de microorganismo después de aplicar los tratamientos fungistáticos, mediante la ecuación: Efectividad (%)=  $[(NFI * 100) NFT]$ .

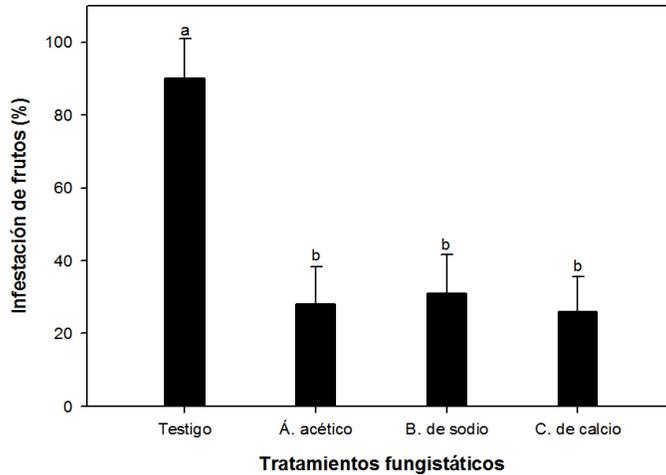
## 7.5. Resultados y Discusión

### **Identificación de los microorganismos causantes del deterioro postcosecha de higo**

En México se desconocen las causas que ocasionan pérdidas postcosecha de hasta el 30 % en el cultivo del higo. Sin embargo, este es el principal problema postcosecha por el que la vida de anaquel del fruto se reduce a tan solo dos días (Venditti *et al.*, 2005). Nosotros planteamos la hipótesis de que los frutos de higo son atacados por diversas clases de microorganismos que demeritan su calidad. Para probar esta hipótesis, cultivamos las plantas de higo de la variedad Neza en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales y de manejo agronómico, y realizamos un estudio de efectividad de diferentes compuestos seguros.

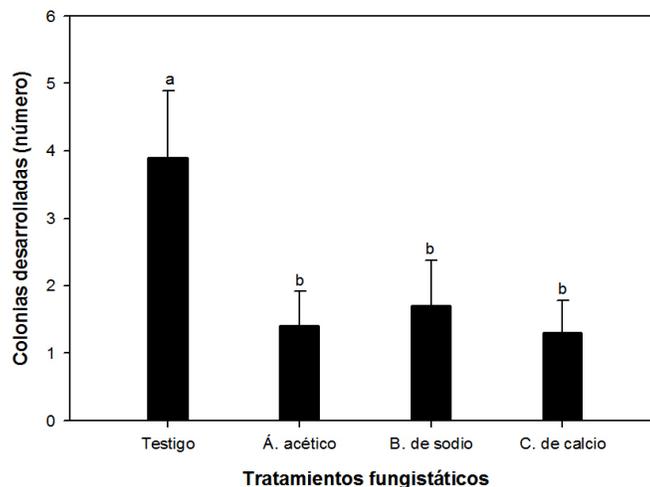
La incubación a  $24 (\pm 0.6) ^\circ\text{C}$  mostró que la infestación de los frutos de higo de la variedad Neza encontrada en este estudio, estuvo constituida únicamente por hongos. Estos resultados pueden ser explicados porque los frutos de higo fueron cultivados en invernadero, y cuando las plantas están protegidas y crecen en un microambiente, disminuye la posibilidad de contaminación con patógenos externos. Además de hongos, los frutos de higo son atacados por bacterias, coliformes y levaduras, que demeritan la calidad y disminuyen la vida de anaquel de los higos (El-Gharably *et al.*, 2009; Demirbaker *et al.* 2004; Isman y Biyik, 2008; Oztekin *et al.*, 2006; Venditti, *et al.*, 2005; Yelsicimen y Ozdemir, 2008). Sin embargo, es éste estudio nosotros no detectamos la presencia de bacterias ni levaduras en los frutos de higo evaluados.

El porcentaje de infestación de los frutos fue mayor en el testigo. Los tratamientos fungistáticos a base de ácido acético, bicarbonato de sodio y cloruro de calcio al 1 %, redujeron significativamente el porcentaje de infestación de los frutos. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre ellos (Figura 16).



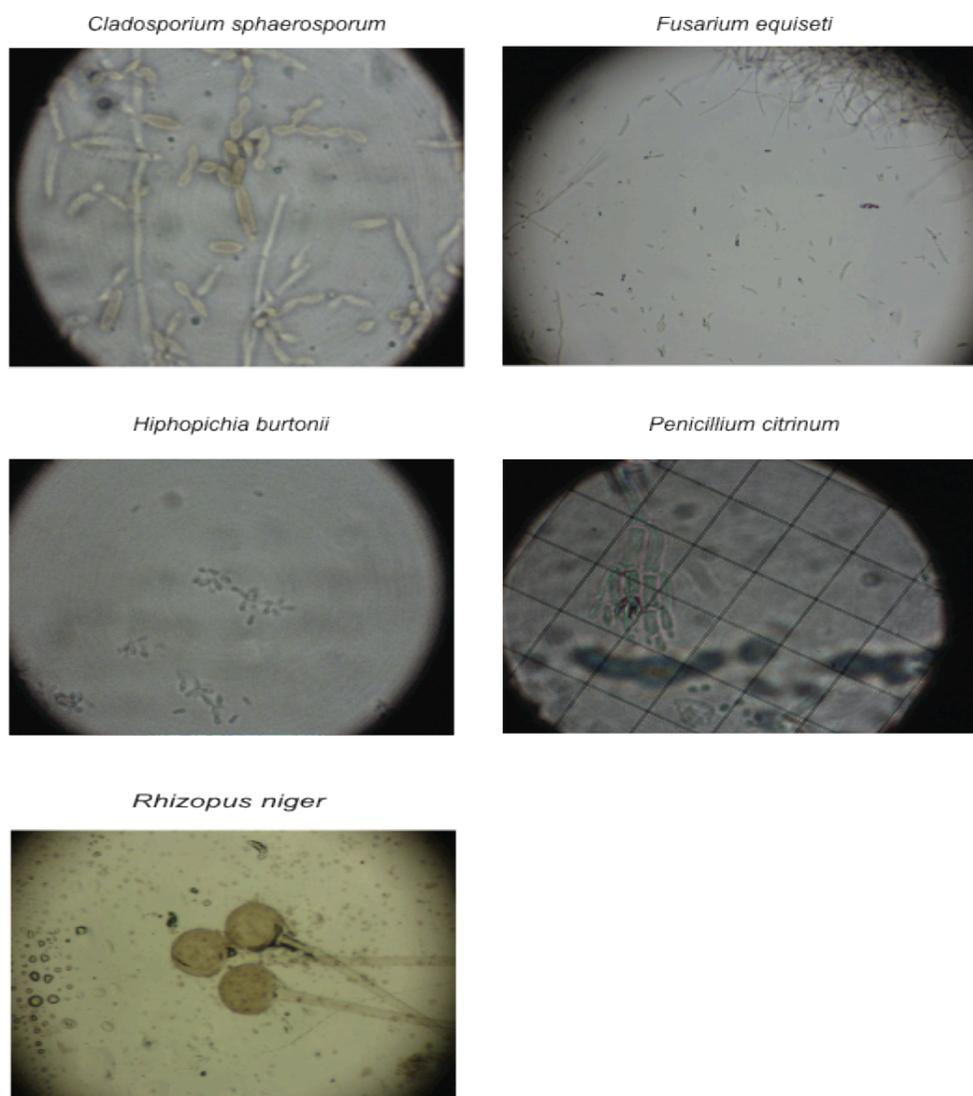
**Figura 16.** Infestación (%) de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero, tratados con diferentes compuestos seguros al 1 %. Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ).

El número de colonias desarrolladas varió de una a cinco, observándose el mayor número en el testigo. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas en el número de colonias desarrolladas entre los tratamientos fungistáticos (Figura 17). Los cinco géneros identificados pertenecen al grupo de los hongos imperfectos, que se caracterizan por desarrollar un micelio no cenocítico y septado con conidios (Barnett y Hunter, 1987).



**Figura 17.** Colonias de hongos desarrolladas en frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero, tratados con diferentes compuestos seguros al 1 %. Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ).

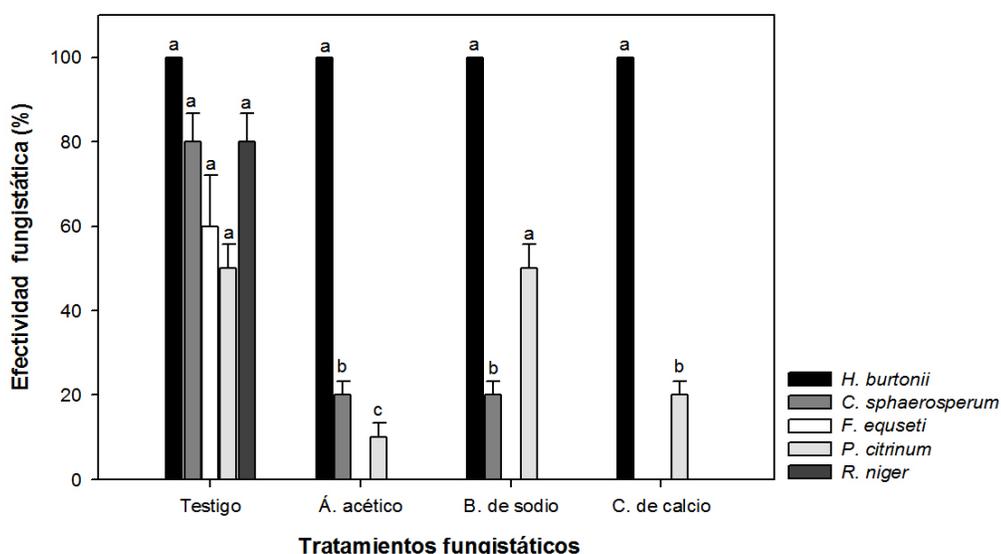
El cultivo de los microorganismos y los análisis de secuenciación de ADN indicaron que las cinco colonias de hongos desarrolladas en los higos de la variedad Neza pertenecen a los géneros y especies: *Cladosporium sphaerosporum*, *Fusarium equiseti*, *Hiphopichia burtonii*, *Penicillium citrimun*, y *Rhizopus niger* (Figura 18). Interesantemente, *C. sphaerosporum*, *F. equiseti* y *R. niger*, fueron identificados en el exocarpio de los frutos, mientras que *H. Burtonii* y *P. citrimun*, fueron identificados en el mesocarpio de los frutos. Es importante resaltar que esta es la primera vez que se reporta la presencia de *Hiphopichia burtonii* en frutos de higo.



**Figura 18.** Hongos causantes del deterioro postcosecha de frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero.

Uno de los hongos toxigénicos que más atacan a los frutos de higo de la variedad Craxiou de Porcu y Rampelina es *Botrytis cinerea* (Venditti *et al.*, 2005). En esta investigación este tipo de patógeno no fue detectado, lo cual es bueno, pues indica que la producción de fruta bajo cubierta es menos atacada por microorganismos dañinos a la salud humana.

El análisis de efectividad fungistática mostró variación en el control (Figura 19) de los diferentes tipos de hongos identificados en este estudio. Interesantemente, ninguno de los compuestos seguros evaluados fue efectivo en el control de *H. burtonii*. Sin embargo, el cloruro de calcio mostró una efectividad del 100% en la inhibición del crecimiento de la mayoría de los patógenos.



**Figura 19.** Efectividad fungistática de diferentes compuestos seguros (1 %) aplicados en frutos de higo de la variedad Neza, producidos en invernadero. Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ,  $n=20$ ).

La nula eficiencia de los compuestos seguros evaluados en este estudio para el control de *H. burtonii* y *P. citrinum* pudiera deberse a que son patógenos que se desarrollan en el interior del fruto, y por lo tanto el contacto con las soluciones

fungistáticas es muy bajo. En contraste, cuando los frutos son tratados con los compuestos seguros, quedan en contacto directo con la piel del fruto, que es donde se encuentra la mayor cantidad de esporas.

El uso del cloruro de calcio se aplica en frutos porque es completamente soluble en agua. En concentraciones de 0.5 a 6 % es totalmente inocuo, es fuente de calcio (Espinoza *et al.*, 2006), no causa efectos dañinos en la salud de los consumidores ni en el medio ambiente, y no altera la calidad organoléptica de los frutos (Venditti *et al.*, 2005). Nosotros recomendamos su uso como tratamiento previo para prevenir la contaminación del fruto con microorganismos durante su almacenamiento y conservación.

## 6.6. Conclusiones

- La principal causa del deterioro postcosecha de los frutos de higo de la variedad Neza son los hongos identificados como *C. sphaerosperum*, *F. equiseti*, *H. burtonii*, *P. citrinum* y *R. niger*. No se detectó la presencia de *Botrytis cinerea* en este estudio.
- Los compuestos seguros son una alternativa para el control de microorganismos, disminución de las pérdidas postcosecha y extensión de la vida útil de los frutos de higo.
- El cloruro de calcio al 1 % es un compuesto altamente efectivo para controlar la mayoría de géneros de hongos causantes del deterioro postcosecha de los frutos de higo de la variedad Neza.

## 6.7. Literatura Citada

- Antunes, D.; G. Miguel; A. Neves. 2007. Innovative postharvest techniques for sustainable handling of horticultural products. Proceedings of the 3rd IASME/WSEAS International Conference on energy, environment, ecosystems and sustainable development (EEESD '07), Agios Nikolaos, Crete Island, Greece, 24-26 July. pp. 93-97.
- Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 ed. Nueva York, US, MacMillan Publishig Company. 286 p.
- Demirbucker, D.; S. Simsek; A. Yemenicioglu. 2004. Potential application of hot rehydration alone or in combination with hydrogen peroxide to control pectin methylesterase activity and microbial load in cold-stored intermediate-moisture sun-dried Figs. JFS: Food Chemistry and Toxicology. 69 (3): 170-178.
- El-Gharably, A. M.; A. I. Nagib; E. M. Rizk. 2009. Evaluation of quality attributes for egyptian apricot and fig cultivar produced by osmodrying process. Annals Agric. Sci. 54 (2): 359-396.
- Espinoza E., A.; G. Landaeta C.; J. R. Méndez N.; A. Núñez C. 2006. Efecto del cloruro de calcio sobre la deshidratación osmótica a vacío en mitades de duraznos (*Prunus persica*) en soluciones de sacarosa. UDO Agrícola 6: 121-127.
- FAO. 2010. Statistical yearbook. Agricultural production. Consultado en Marzo del 2012. Disponible en [<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>].
- Isman, B.; H. Biyik. 2009. The aflatoxin contamination of fig fruits in Aydin city (Turkey). Journal of Food Safety. 29: 318-330.
- Kader, A. A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. Third Edition. University of California. 535 p.
- Melgarejo M., P. 2000. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol I. Ediciones Madrid Vicente y Mundi-Prensa. Madrid, España. 378 p.

- Mendoza C., V. M. 2009. Producción intensiva de higo (*Ficus carica* L.) bajo invernadero. Tesis de Maestría. Postgrado de Recurso Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. 66p.
- Oztekin, S.; B. Zorlugenc; F. Kiroglu Z. 2006. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*. 75: 396–399.
- Rondón J., A. J. 1974. Nueva enfermedad fungosa del higo (*Ficus carica* L.) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 25: 487-494.
- Sen, F.; Sen, F.; U. Aksoy; M. Emekci; A. G. Ferizli. 2009. Effects of the post-harvest application of methyl bromide alternatives on storage pests and quality of dried fig. *Turk J Agric For*. 33: 403-412.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 1980-2011. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. México, D. F. Consultado en Mayo del 2012. Disponible en  
[[www.siap.gob.mx/index.option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351)].
- Venditti, T.; M. G. Molinu; A. Dore; G. D'hallewin; P. Fiori; M. Tedde; M. Agabbio. 2005. Treatments with GRAS compounds to keep fig fruit (*Ficus carica* L.) quality during cold storage. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 70(3): 39-343.
- Yesilcimen, M.; A. M. Ozdemir. 2008. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology*. 25: 386-391.

## VIII. DISCUSIONES GENERALES

La guía técnica internacional del IPGRI (2003) resultó ser de gran utilidad en la caracterización morfológica de frutos de higos negros colectados en el centro de México. La caracterización morfológica de especies y variedades debe ser realizada con plantas que crecen bajo un mismo ambiente (Gallegos *et al.*, 2005). Por esta razón, nuestras plantas fueron cultivadas en invernadero bajo las mismas condiciones ambientales y de manejo agronómico. Bajo estas condiciones, nosotros pudimos detectar características claramente distintas que permitieron describir a cada una de las poblaciones de higo evaluadas. De un total de diez atributos cuantitativos y cuatro atributos cualitativos evaluados en este estudio, solo cuatro fueron los que marcaron las principales diferencias entre poblaciones: el tamaño o peso del fruto, la forma del fruto, el color de la pulpa, y la longitud del cuello del fruto.

Es ampliamente conocido que el clima juega un papel muy importante en la expresión de las características morfológicas de las plantas (Storey, 1977). Sin embargo, con los resultados de la caracterización morfológica de frutos de higo cultivados en invernadero, nosotros corroboramos que las poblaciones de higo identificadas en este estudio (Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza y Zacapala), expresan características morfológicas claramente distintas que no se deben únicamente al ambiente en el que crecieron las plantas. Con base en estas observaciones, nosotros formulamos la hipótesis de que las diferencias morfológicas entre frutos de higos negros del centro de México se deben también a diferencias genéticas. Para probar esta hipótesis, nos dimos a la tarea de estandarizar primeramente un protocolo para la extracción de ADN de higo, para posteriormente realizar una caracterización molecular.

Con las modificaciones al protocolo del CTAB de Weising *et al.* (2005), realizadas en este estudio, se obtuvo ADN en concentración y calidad óptimas (Weir, 1996; Doulis *et al.*, 2000) para poder llevar a cabo un análisis con marcadores moleculares, mediante análisis de huellas de ADN tipo RAPDs, ISSRs, y RFLPs. Con estas

modificaciones el ADN obtenido de las hojas jóvenes y maduras estuvo libre de contaminantes como polisacáridos o proteínas, y presentaron un patrón de bandas claramente visibles en geles de agarosa. En cambio, el ADN de frutos jóvenes y maduros presentó un patrón de bandas difusas en geles de agarosa.

Nuestros resultados muestran que las poblaciones mexicanas de higo en el centro de México son genéticamente distintas. Esa variabilidad es indicada por la distribución amplia de los agrupamientos observados en los árboles filogenéticos generados con las huellas de ADN tipo ISSRs y RFLPs obtenidas en este estudio. Aún cuando se asume que las seis poblaciones de higo se derivaron inicialmente de la variedad Black Mission, cada una presenta caracteres genómicos claramente distintos que les permiten mantenerse en agrupamientos independientes entre sí en los árboles conformados.

Los resultados de la caracterización morfológica se complementan con la caracterización molecular de las seis poblaciones de higo evaluados en este estudio. Esta información nos permite concluir que todas las poblaciones son diferentes entre ellas, por lo que con esta investigación establecemos las bases para la futura caracterización agronómica y el registro de variedades de higo ante la UPOV. Hasta la fecha, en nuestro país no existe registro de variedades de higo. Solo se cuenta con el banco de germoplasma de higo establecido por nosotros en la Universidad Autónoma Chapingo, por lo que la variabilidad morfológica y genética observada entre las poblaciones de higo de diferentes partes de México ha comenzado a ser reconocida y valorada.

Los RAPDs son una herramienta utilizada ampliamente en el análisis de huellas de ADN (Becerra y Paredes, 2000). Diversos investigadores han logrado amplificar ADN de higos silvestres o tipo Caprifig a partir de indicadores tipo RAPDs (Galderisi *et al.*, 1999; Cabrita *et al.*, 2001; De Masi *et al.*, 2003; De Masi *et al.*, 2005; Dalkilic *et al.*, 2011). Sin embargo, en este caso nosotros utilizamos ADN de higos del tipo común o partenocárpico, y los resultados no fueron satisfactorios. Es probable que los

iniciadores RAPDs utilizados no hayan generado información porque no encontraron complementariedad en el genoma de higo. Es ampliamente conocido que los iniciadores RAPDs generan información a partir de cualquier sitio donde encuentran el complemento de la secuencia utilizada (Semagn *et al.*, 2006). Sin embargo, se debe considerar que los iniciadores no fueron diseñados específicamente para higo y por ende, la amplificación del ADN de las seis poblaciones de higo fue nula.

Los análisis de huellas de ADN tipo ISSRs y RFLPs visualizadas en geles de poliacrilamida resultaron altamente eficientes en la diferenciación de poblaciones de higo. Los ISSRs y los RFLPs proporcionan información diferente, y no es posible hacer que los resultados obtenidos con ambas técnicas coincidan, debido principalmente a la naturaleza de cada técnica (Khadari *et al.*, 2005; Semagn *et al.*, 2006; Khaled *et al.*, 2010; Mallikarjuna *et al.*, 2010; Satwar, 2012). Nosotros corroboramos que los ISSRs son más eficientes en la detección de polimorfismos entre poblaciones. Esos polimorfismos indican diferencias a nivel de genoma (Martins *et al.*, 2003), las cuales pudimos identificar con base en el tamaño de las bandas observadas en los patrones de electroforesis generadas en los geles de poliacrilamida.

Los RFLPs permitieron diferenciar las seis poblaciones de higo evaluadas en este estudio, con base en el gen que controla el tamaño del fruto (Fruitfull) y que fue identificado por primera vez en la planta modelo *A. thaliana* (Roeder y Yanofsky, 2006). Estos resultados son de gran importancia porque demuestran por primera vez que, a nivel de especie, el higo tiene un gen homólogo del Fruitfull. Además, los higos mexicanos derivados, inicialmente de la variedad española Black Mission, presentan diferencias genéticas específicamente en el gen homólogo del Fruitfull. Interesantemente, la diferenciación de las poblaciones de higo realizada con base en el árbol filogenético obtenido de los perfiles electroforéticos obtenidos con los RFLPs, está altamente correlacionada con las características morfológicas del fruto.

Las huellas de ADN de higo de las poblaciones mexicanas (Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza y Zacapala), obtenidas a partir de los ISSRs y los RFLPs, se obtuvieron bajo las mismas condiciones electroforéticas, digestión enzimática y revelado de los productos amplificados, por lo que los resultados obtenidos pueden ser comparados. Al analizar los árboles filogenéticos generados con cada tipo de iniciadores, se observa que la agrupación de las poblaciones es distinta. Sin embargo, los ISSRs indican variación en zonas desconocidas del genoma, que pueden ser responsables de un sin número de características. En cambio, los RFLPs muestran variación a nivel del gen que controla el tamaño del fruto, lo que los hace ser más específicos. Por esta razón, nosotros consideramos que los análisis de huellas de ADN tipo RFLPs conforman una base sólida para la búsqueda de caracteres cuantitativos que puedan ser de utilidad en el mejoramiento de higo y, probablemente, de otras especies cultivadas.

Los resultados de esta investigación representan tres líneas de evidencias que muestran que las poblaciones de higos negros en México pertenecen a variedades claramente distintas:

- 1) Características morfológicas del fruto (Figura 5).
- 2) Huellas de ADN and a nivel genómico basadas en análisis de ISSRs (Figura 9).
- 3) Huellas de ADN a nivel específico de un gen basadas en análisis del Fruitfull (RFLPs) (Figura 11).

Sabemos que México no es el centro de origen del higo. Sin embargo, nuestros resultados muestran claramente que nuestro país es una fuente de diversidad genética del higo muy importante. Dicha diversidad es todavía desconocida en su mayoría, pero la metodología y los parámetros establecidos en esta investigación pueden ser utilizados para la caracterización morfológica y molecular de variedades de higo en otros estados de la República Mexicana, así como para conocer la

distancia genética que existe entre las variedades de higos mexicanos y la variedad Black Mission.

Es importante recalcar que la metodología desarrollada en esta investigación para identificar al gen responsable del tamaño del fruto en higo (Fuitfull), ya fue aplicada por la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma y estudiantes del Postgrado en Biotecnología del Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo, para la caracterización genética de accesiones de nopal, chile, frijol, garbanzo y biznaga. Interesantemente, la metodología funcionó adecuadamente, permitiendo diferenciar a las accesiones evaluadas, además de encontrar que estas cinco especies también presentan el gen llamado Fruitfull. Estas evidencias nos llevan a concluir que la metodología desarrollada para la caracterización genética de variedades mexicanas de higo, puede extenderse a cualquier otra especie de plantas.

Los análisis del contenido mineral y de fenoles y antocianinas totales de la variedad Neza, mostraron que los frutos de higo son muy nutritivos, independientemente de la época del año en que se cosechen. En esta investigación se realizó una caracterización inicial de la composición mineral de los higos de la variedad Neza, encontrando que los frutos son fuente de calcio y potasio, principalmente. Sin embargo, aún queda mucho por hacer, ya que el valor nutritivo de los frutos se debe a la presencia de vitaminas, minerales, carbohidratos, proteínas y fibra dietética (Baccaunaud *et al.*, 1995; Ersoy *et al.*, 2007). Nosotros solo evaluamos el contenido mineral, por lo que los demás componentes siguen siendo desconocidos hasta el momento.

El elevado contenido de fenoles y antocianinas (1804.45 mg por 100 g de tejido fresco), nos permitió corroborar que los higos de la variedad Neza son fuente extraordinaria de 12 antioxidantes naturales como la rutina, cianidina y luteína. Sin embargo, aún falta identificar y cuantificar la concentración de los otros nueve compuestos fenólicos detectados en los análisis de HPLC.

La caracterización morfológica, genética y bioquímica realizada en este estudio, nos permitió tener una descripción más completa de la variedad de higo conocida como Neza. Sin embargo, en este estudio se incluyeron seis variedades de higos mexicanos, por lo que la línea de investigación sobre la caracterización bioquímica puede ser extendida también a las variedades identificadas como Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela y Zacapala.

El estudio de efectividad fungistática de los compuestos seguros como el ácido acético, bicarbonato de sodio y cloruro de calcio al 1 %, fue suficiente para controlar al 100 % las poblaciones de *F. equiseti* y *R. niger*. Sin embargo el cloruro de calcio fue el único compuesto eficaz en el control del 100 % de las poblaciones *C. esphaerosperum*. Con el ácido acético se logró un control del 90 % de las poblaciones de *P. citrinum*, pero ningún compuesto fue efectivo en el control de *H. burtonii*. Con base en estas evidencias, sugerimos que en estudios futuros se incremente la concentración de los compuestos seguros, para lograr un mayor control en las poblaciones de los microorganismos causantes del deterioro postcosecha de los frutos de higo.

### 8.1. Literatura Citada

- Becerra, V. V.; M. Paredes C. 2000. Uso de marcadores Bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica. 60 (83): 270-281.
- Cabrita, L. F.; U. Aksoy; S. Hepaksoy; J. M. Leitao. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. Sci. Hort. 87: 261-273.
- Dalkılıç, Z.; H. Osman M.; G. Gunver-Dalkılıç; H. Kocatas. 2011. Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. African Journal of Biotechnology. 10 (4): 519-526.

- De Masi, L.; M. Cipollaro; G. Di Bernardo; U. Galderisi; G. Galano; A. Cascino; G. Grassi; E. Pavone; A. Simeone. 2003. Clonal selection and molecular characterization by RAPD analysis of the fig (*Ficus carica* L.) Dottato and Bianco del Cilento cultivars in Italy. *Acta Hort.* 605: 65-68.
- De Masi, L.; D. Castaldo; G. Galano; P. Minasi; B. Laratta. 2005. Genotyping of fig (*Ficus carica* L.) via RAPD markers. *J. Sci. Food Agric.* 85: 2235-2242.
- Doulis, A. G.; A. L. Harfouche; F. A. Aravanopoulos. 2000. Rapid high quality DNA isolation from cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the RAPD marker technique. *Plant Molecular Biology Reporter.* 17: 1-14.
- Galderisi, U.; M. Cipollaro; G. Di Bernardo; L. De Masi; G. Galano; A. Cascino. 1999. Identification of the edible fig 'Bianco del Cilento' by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Hort. Sci.* 34: 1263-1265.
- Gallegos V., C.; A. F. Barrientos Priego; J. Cervantes H.; 2005. Manual gráfico para la descripción de nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-SAGARPA. Universidad Autónoma Chapingo. 116 p.
- IPGRI. 2003. Descriptors for Fig. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, and International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies, Paris, France. 52 p.
- Khadari, B; C. Grout; S. Santoni; F. Kjellberg. 2005. Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: A study using mtDNA RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 52: 97-109.
- Khaled, C.; B. Ghada; B. A. Ahmed; S. Olfa; M. Messaoud; T. Mokhtar; S. H. Amel. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochem Genet.* 48:789-806.
- Mallikarjuna, K. A.; E. Stover; D. Velasco; A. Koehmstedt. 2010. Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). *Genetic.* 138:681-694.
- Martins, M.; R. Teneiro; M. M. Oliveira. 2003. Genetic Relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell.* 22: 71:78.

- Roeder, A. H. K.; M. F. Yanosfky. 2006. Fruit development in *Arabidopsis*. The Arabidopsis book, Number 4. American Society of Plant Biologist. Consultado den Mayo del 2012. Disponible en [<http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0075>].
- Sarwat, M. 2012. ISSR: Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols: A reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. In: Nikolaus J. Sucher et al. (eds.) Methods in Molecular Biology. 862: 103-121.
- Semagn, K.; B. Jornstad; M. N. Ndjiandjop. 2006. An overview of molecular markers method for plants. African Journal of Biotechnology. 5 (25): 2540-2568.
- Storey, W. B.; J. E. Enderud; W. F. Saleeb; E. M. Nauer. 1977. The Fig: its biology, history, culture and utilization. Jurupa Mountains Cultural Center, Riverside, California. 94 p.
- Weir B., J.; R. Pierre P.; R. Cchibbar N. 1996. Isolation of DNA for RAPD analysis from leaves of the Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt) and other horticultural crops. Canadian Journal of Plant Science. 1: 819-824.
- Weising, K.; H. Nybom; K. Wolff; G. Kahl. 2005. DNA finger printing in plant: principles, methods, and applications. Second edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Florida. 472 p.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

- Los higos negros se han adaptado a condiciones ambientales locales en el centro de México, fijando genéticamente tales adaptaciones, por lo que se han generado variedades claramente distintas que representan diversidad morfológica valuable.
- Las principales diferencias morfológicas entre las variedades mexicanas de higo identificadas en este estudio como Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza y Zacapala, son el tamaño o peso del fruto, el color de la pulpa, la longitud del cuello y la forma del pedúnculo.
- Con la caracterización morfológica de los higos negros identificados en este estudio, establecemos las bases para la futura caracterización agronómica y molecular de variedades mexicanas de higo.
- ADN de higo de buena calidad y cantidad se pudo extraer con el método del CTAB al 4 %.
- La edad y el tipo de órgano utilizado para la extracción de ADN de higo influyen en la concentración y calidad del ADN obtenido.
- Las hojas jóvenes de las plantas de higo son el órgano más recomendado para la extracción de ADN por su concentración y calidad óptimas para su amplificación y análisis de huellas de ADN.
- El higo presenta un gen homólogo del gen Fruitfull de *A. thaliana* que determina el tamaño del fruto.

- Las huellas de ADN indican que las poblaciones mexicanas de higo identificadas en este estudio (Ixmiquilpan, Salvatierra, Tecámac, Tetela, Neza y Zacapala) son genéticamente diferentes entre ellas a nivel genoma y a nivel específico del gen responsable del tamaño del fruto.
- La distancia genética que existe entre las variedades mexicanas de higo y la variedad Black Mission puede ser determinada utilizando los primers Fruitfull\_F131, Fruitfull\_R1218 y Fruitfull\_R3056, diseñados en este estudio.
- Los higos mexicanos de la variedad Neza presentan el mismo valor nutritivo y nutracéutico en cualquier época de año.
- Los minerales más abundantes de los frutos de higo de la variedad Neza son el potasio, calcio, fósforo y magnesio.
- Los higos de la variedad Neza son ricos en compuestos fenólicos, con mayor proporción de fenoles que antocianinas.
- La principal causa del deterioro postcosecha de los frutos de higo de la variedad Neza son los hongos identificados como *C. sphaerosperum*, *F. equiseti*, *H. burtonii*, *P. citrinum* y *R. niger*. No se detectó la presencia de *Botrytis cinerea* en este estudio.
- Los compuestos seguros son una alternativa para el control de microorganismos, disminución de las pérdidas postcosecha y extensión de la vida útil de los frutos de higo.
- El cloruro de calcio al 1 % es un compuesto altamente efectivo para controlar la mayoría de géneros de hongos causantes del deterioro de los frutos de higo de la variedad Neza.