

# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Oligonychus perseae* y *Oligonychus punicae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) EN HUERTOS DE AGUACATE

STEPHANIE GUZMAN VALENCIA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: "Estructura genética de poblaciones de *Oligonychus perseae* y *Oligonychus punicae* (Acari: Tetranychidae) en huertos de aguacate"  
Realizada por la alumna: Stephanie Guzman Valencia bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

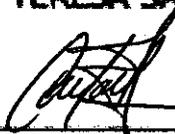
**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



\_\_\_\_\_  
DRA. MA. TERESA SANTILLÁN GALICIA

ASESOR



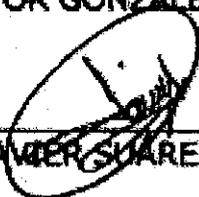
\_\_\_\_\_  
DR. ARIEL WILBERT GUZMÁN FRANCO

ASESOR



\_\_\_\_\_  
DR. HÉCTOR GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR



\_\_\_\_\_  
DR. JAVIER SUÁREZ ESPINOSA

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización y termino de mi postgrado

La realización de este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo destinado para el proyecto “Sistema de alerta fitosanitaria para trips, escamas armadas y ácaros en aguacate Hass en Michoacán” financiado por la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán, A. C. (APEAM).

A mi directora y consejera la Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia por haberme enseñado que la tenacidad es una virtud que rinde frutos. Gracias por el apoyo y la confianza depositada en mi persona.

A mis asesores de tesis, Dr. Ariel Wilbert Guzmán Franco, Dr. Héctor González Hernández y Dr. Javier Suárez Espinosa por el tiempo, apoyo, paciencia, consejos y motivación depositados en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de cubículo y laboratorio por la paciencia, ayuda y amistad brindada durante mi estadía en el Colegio de Postgraduados: M.C Delfina, Lulú, Santo, Lupita, Jorge, Jhony, Paulina, Fabián, Nuvia, Beto, Nicolás.

A Isis Jaimes, Alejandro por su amistad incondicional, consejos y tiempo compartido

A mi madre Paula, hermanas; Evelin y Patricia y mis pequeños tesoros: Liel y Benjamín por seguirme y apoyarme en todos los caminos que he emprendido

A mi compañero de vida Sergio González Páez por que detrás de mi siempre estas tu.

A Dios por permitirme creer y tener fé

**Para mi planeador del alma: Sergio**

# CONTENIDO

	Páginas
<b>CONTENIDO</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	4
2.1 Objetivo general .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
2.3 Hipótesis.....	4
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
3.1 Importancia del cultivo de aguacate .....	5
3.2 Variedades de aguacate.....	5
3.3 Importancia y daño de ácaros .....	6
3.4 Descripción.....	7
3.4.1 <i>Oligonychus punicae</i> .....	7
3.4.2 <i>Oligonychus perseae</i> .....	10
3.5 Variación genética y uso de técnicas de moleculares .....	10
3.5.1 Aloenzimas .....	12
3.5.2 PCR .....	12
3.5.3 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) .....	13
3.5.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism).....	13
	iii

3.5.5 Microsatélites .....	14
3.5.6 DALP (Direct amplification of length polymorphism) .....	14
3.5.7 Genes mitocondriales y nucleares ribosomales.....	15
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
4.1 Recolección del material biológico .....	16
4.2 Identificación morfológica .....	18
4.3 Identificación molecular .....	19
4.3.1 Extracción de ADN.....	19
4.3.2 Amplificación del gen COI.....	20
4.3.3 Limpieza y obtención de las secuencias de los productos de PCR .....	21
4.3.4 Análisis de los datos .....	21
4.4 Variación genética .....	22
4.4.1 Microsatélites .....	22
4.4.1.1 Análisis de los datos.....	24
4.4.2 Amplificación y secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2....	24
4.4.2.1 Análisis de los datos .....	25
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
5.1 Identificación morfológica .....	26
5.2 Identificación molecular .....	28
5.3 Variación genética .....	29
5.3.1 Microsatélites .....	29
5.3.2 Secuenciación de las regiones ITS1 eITS2 .....	31
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>

<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>39</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Localidades de recolecta de material biológico de ácaros en huertos de aguacate Hass .....	17
Cuadro 2. Lista de microsátélites utilizados para el estudio de variación genética .....	23
Cuadro 3. Huertos de aguacate muestreados en los estados de México y Michoacán.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Oligonychus</i> spp.....	9
Figura 2. Hojas de aguacate infestadas.....	18
Figura 3. Forma del edeago de <i>Oligonychus</i> .....	28
Figura 4. Reconstrucción filogenética de una fracción de la región COI de <i>O. punicae</i> y <i>O. perseae</i> utilizando el método máxima parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap .....	30
Figura 4. Reconstrucción filogenética por el método Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap de las muestras de <i>O. perseae</i> de Michoacán y del Estado de México.....	32
Figura 5. Reconstrucción filogenética por el método Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap de las muestras de <i>O. punicae</i> de Michoacán y del Estado de México.....	33

**Estructura genética de poblaciones de *Oligonychus perseae* y *Oligonychus punicae* (Acari: Tetranychidae) en huertos de aguacate**

**Stephanie Guzman Valencia, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2012**

**RESUMEN**

La identidad y estructura genética de poblaciones de *Oligonychus punicae* y *O. perseae* (Acari: Tetranychidae) fue estudiada en siete localidades productoras de aguacate *Persea americana* var. Hass. La identidad de los ácaros fue determinada morfológica y molecularmente mediante la secuenciación de una fracción del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI). La variación genética intraespecífica de diferentes poblaciones de ambas especies de ácaros fue estudiada mediante la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 del rADN. El análisis filogenético de las secuencias parciales del gen COI separó adecuadamente las dos especies de ácaros, confirmando los resultados de la identificación morfológica. El análisis de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 del rADN mostró una variación genética intraespecífica significativa. El efecto de la distancia geográfica, manejo agronómico y factores ecológicos que provocan esta variación es discutida.

Palabras claves: COI, ITS1, ITS2, estructura genética.

**Genetic structure of *Oligonychus perseae* and *Oligonychus punicae* (Acari: Tetranychidae) populations in orchards of avocado**

**Stephanie Guzman Valencia, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2012**

**ABSTRACT**

We determined the identity of *O. punicae* and *O. perseae* (Acari: Tetranychidae) using morphological and molecular methods. Molecular identification was based on the analysis of partial sequence information of the Cytochrome Oxidase I (COI) gen. Genetic variation amongst populations of the same species but collected in different locations were assessed using the sequence information of the ITS region of rADN. Morphological and genetic identification were consistent in properly separated both species. ITS sequence information revealed significant genetic variation amongst population from both species. The effect of geographical separation, dispersal behaviour and population density in the genetic variation found amongst populations of both species is discussed.

Key words: COI, ITS1, ITS2, genetic structure.

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) ha adquirido una gran importancia en el mercado internacional dejando de ser una fruta exótica para incorporarse a la dieta de muchos países. De esta forma, se ha incrementado la producción a nivel mundial en 550,000 ton durante los últimos 15 años (Téliz y Mora, 2007) generando empleos al demandar mano de obra, riegos, cuidado nutritivo y fitosanitario, cosecha, movilización, empaque, selección, transporte, mercado y ventas al mayoreo y menudeo (Téliz y Mora, 2007). La producción de aguacate en México ocupa el décimo noveno lugar en superficie sembrada y el estado de Michoacán es el mayor productor de este fruto con una superficie sembrada de variedad "Hass" que para el año 2010 fue de 108,683 ha y una producción de 1,092,344 ton (SIAP, 2011).

Desafortunadamente los huertos de aguacate están expuestos a factores que merman el rendimiento, como consecuencia existe una disminución considerable en las ganancias y un aumento en los costos de producción debido, principalmente, al control de plagas y enfermedades. Existe una gran variedad de insectos y ácaros que le confieren daño a los huertos de aguacate; entre éstos, de importancia económica están los provocados por los ácaros. Los ácaros más importantes que causan daño a la planta de aguacate pertenecen a las especies *Oligonychus punicae* Hirts y *O. perseae* Tuttle, Baker y Abbatiello (Acari: Tetranychidae) (APROAM, 2007; Helle y Sabelis, 1985). Los cuales al igual que

otros tetraníquidos, remueven los contenidos celulares de las hojas y el sobrante celular al coagularse forma masas necróticas (Jeppson *et al.*, 1975). El síntoma típico se describe como manchas irregulares cloróticas y que finalmente se tornan cafés (Aponte y McMurtry, 1997). *Oligonychus punicae* se localiza generalmente el haz de las hojas y *O. perseae* en el envés, pero en infestaciones severas las colonias pueden también ser encontradas sobre ramas verdes y frutos en desarrollo (Jeppson *et al.*, 1975). En altas infestaciones *O. perseae* puede causar del 7.5 al 10% de defoliación en el árbol, lo que llega a provocar quemaduras de sol en troncos y frutos lo que resulta en la caída del fruto y como consecuencia disminución del rendimiento por árbol (Kerguelen y Hoddle, 2000).

La forma más común de manejar a estas plagas es mediante la aplicación constante de acaricidas, originando que los ácaros se vuelvan resistentes a estos productos. Por lo que la proporción de genes involucrados en la resistencia y susceptibilidad en una población de ácaros variará de acuerdo a la presión ejercida por la aplicación de plaguicidas, lo cual se podría traducir en un cambio a nivel genético poblacional. Así mismo, otros factores ambientales como temperatura y gradiente altitudinal pueden influir en la variación genética y evolución de las poblaciones de una misma especie (Tsagkarakou *et al.*, 1998; Bailly *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2005).

La implementación de estrategias de manejo adecuadas deben considerar, además de la apropiada identificación del ácaro, estudios básicos de ecología que determinen si existen cambios a nivel genético entre poblaciones de una misma especie (Carew, 2003; Ben-David *et al.*, 2007). Por tal motivo, los objetivos de esta investigación fueron identificar tanto morfológica como molecularmente a *O. perseae* y *O. punicae* para determinar la estructura genética de poblaciones de estos ácaros recolectados de diferentes huertos de aguacate var. Hass de Michoacán y del Estado de México.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Determinar la estructura genética de poblaciones de *O. perseae* y *O. punicae* en diferentes zonas productoras de aguacate var. Hass en Michoacán y el Estado de México.

### 2.2 Objetivos específicos

Confirmar la identidad de individuos de *O. perseae* y *O. punicae* recolectados en huertos de aguacate var. Hass de siete localidades de Michoacán y Estado de México, mediante características morfológicas y técnicas moleculares.

Determinar la estructura genética de poblaciones de *O. perseae* y *O. punicae* provenientes de diferentes huertos de aguacate var. Hass de Michoacán y el Estado de México.

### 2.3 Hipótesis

Las poblaciones de *O. perseae* y *O. punicae* en aguacate var. Hass de las principales localidades productoras de Michoacán y el Estado de México son genéticamente diferentes.

### III. REVISION DE LITERATURA

#### 3.1 Importancia del cultivo de aguacate

A nivel internacional según datos de FAO (2010), México se encuentra en el primer lugar de producción de aguacate (Anexo 1 y 2). Datos proporcionados por SIAP (2011) indican que en México existen 142,146.10 ha sembradas, con un rendimiento aproximado de 9.99 ton/ha y un valor de producción de \$18.1 mil millones MN siendo Michoacán el estado con mayor superficie sembrada con 108,683 ha seguido de Jalisco, Nayarit y Estado de México (Anexo 3).

#### 3.2 Variedades de aguacate

*Persea americana* pertenece a la familia Lauraceae, este es un taxón muy variable con cerca de 50 géneros descritos y un número aproximado de 2500 a 3000 especies, distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales (Williams, 1976). El aguacate como la mayoría de los miembros de la familia Lauraceae es una especie diversa como consecuencia de los diferentes ambientes donde se desarrolla. El más conocido llamado *P. americana* se ha adaptado a una amplia gama de condiciones que se presentan en los diferentes continentes del mundo. Se reconocen tres razas principales dentro de la especie *P. americana*. La mexicana es la raza mas resistente al frio, la guatemalteca es la raza adaptada a crecer a elevadas altitudes y tiene la habilidad para sobrevivir

también en condiciones de frío. La antillana esta adaptada a condiciones tropicales, por lo tanto posee una baja tolerancia al frío (Knight, 1999).

Los cultivares adaptados a climas subtropicales son el Hass (cultivar más comercial en el mundo), Bacon (hibrido entre la raza Mexicana y Guatemalteca), Colín V-33 (originario de Ixtapan de la Sal, Estado de México), Reed Pinkerton Whitsell (hibrido entre la raza Mexicana y Hass), Gwen Whitsell (hibrido entre la raza Mexicana y Hass) y Lamb Hass.

Los cultivares adaptados a climas tropicales son Booth 8 (proviene de una semilla de polinización libre de un tipo Guatemalteco), Choquete (producto de la cruce entre Guatemalteco y Antillano) y Lula (proviene de la semilla de polinización libre de cv. Taft).

### **3.3 Importancia y daño de ácaros**

Los ácaros más importantes que causan daño a la planta de aguacate pertenecen a las especies *Oligonychus punicae* y *O. perseae* (Helle y Sabelis, 1985; APROAM, 2007;). Estos ácaros al igual que otros tetraníquidos, se alimentan del contenido celular de las plantas, por lo que los cloroplastos desaparecen y el material celular restante se coagula para formar una masa de color ámbar, lo que da origen a manchas rodeadas de un halo clorótico que al unirse forman una mancha irregular de color marrón (Jeppson *et al.*, 1975; Aponte y McMurtry, 1997).

Infestaciones elevadas provocan la disminución de hasta un 60% de cloroplastos, cambiando la tasa de transpiración provocando que las hojas se deshidraten y caigan. Los frutos quedan expuestos al sol, sufren quemazón, con lo que también se reduce la producción total de la planta (Jeppson *et al.*, 1975; Kerguelen y Hoddle, 2000).

### **3.4 Descripción**

#### **3.4.1 *Oligonychus punicae***

*Oligonychus punicae* conocido como el “ácaro café del aguacate” es considerada una plaga importante en huertos de aguacate, uvas y granadas en Asia, América (Vásquez *et al.*, 2008), Europa, África y Australia (Halliday, 2000). Este ácaro café se encuentra confinada en la parte superior de las hojas cerca de las nervaduras, se ubican en hojas maduras del árbol, pero en infestaciones grandes se encuentra en cualquier parte de ésta. En las hojas infestadas, se puede observar un bronceado a lo largo de la vena media y de las venas laterales. El bronceado puede extenderse a toda la lámina foliar de las hojas cuando la población aumenta, hasta causar defoliación de la planta (Jeppson *et al.*, 1975). La población se incrementa a principios del verano, lo cual continúa hasta finales de éste, seguido de un abrupto o repentino descenso durante la estación de otoño o principios de invierno. El decremento de la población esta asociado entre otros factores con la presencia de depredadores y competencia intraespecífica.

Las hembras tienen el cuerpo oval, de aproximadamente 0.5 mm de longitud; los machos son más pequeños que las hembras, la parte anterior del cuerpo es más ancha que la posterior. Todos los estados de desarrollo se caracterizan por ser de un color café-rojizo, aunque cabe mencionar que las larvas son de un color rojizo más claro (Jeppson *et al.*, 1975). Los huevos son globosos de color rojo claro, el cual se torna más oscuro cuando el embrión ha madurado. Su diámetro es de aproximadamente 0.130 mm. Generalmente están protegidos por la telaraña que producen las hembras (Helle y Sabelis, 1985).

El ciclo de vida de *Oligonychus punicae* consiste en cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, ninfa y adulto. El estado ninfal se divide en dos etapas, la posterior a la larva, protoninfa y la anterior al adulto, deutoninfa. Después de cada etapa activa de desarrollo tienen una etapa inactiva o de quiescencia denominada ninfocrisálida (Figura 1) (Jeppson *et al.*, 1975). En estas etapas, las ninfas sufren cambios fisiológicos internos, pero permanecen inmóviles y no se alimentan.

La duración de cada estado de desarrollo es variable, depende de las condiciones de humedad, temperatura y tipo de hospedante. Se ha observado en trabajos de laboratorio, por ejemplo, que el tiempo de desarrollo es variable dependiendo de la variedad de aguacate. Cerna *et al.* (2009) observaron que a 24°C, la duración del desarrollo de huevo a adulto en las variedades Hass y fuerte fue de 7.78 y 7.74 días, respectivamente. Mientras que en aguacate criollo, la duración se incrementó

a 9.54 días (Cerna *et al.*, 2009). Barbosa (1983) observó que el tiempo de desarrollo a 22°C fue de 15.74 días.

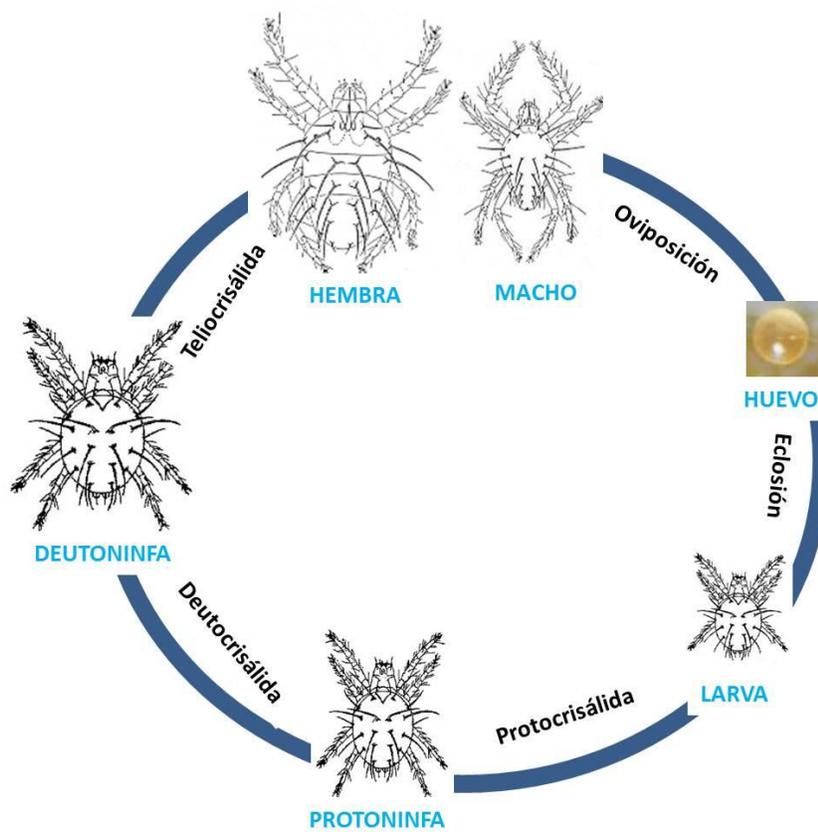


Figura 1. Ciclo de vida de *Oligonychus* spp.

### **3.4.2 *Oligonychus perseae***

La araña cristalina *O. perseae* se le encuentra en el envés de las hojas jóvenes, en pequeñas colonias cubiertas por una densa telaraña. En infestaciones altas, las colonias pueden también ser encontradas sobre ramas verdes y frutos en desarrollo (Jeppson *et al.*, 1975). Al incrementarse la población de estos ácaros, las manchas y áreas dañadas se fusionan y forman largas tiras necróticas a lo largo de la vena y la depresión en la hoja (Aponte y McMurtry, 1997).

El ciclo de vida de *O. perseae* es igual al descrito para *O. punicae*, pero todos los estados de desarrollo son cristalinos de un color verde claro.

### **3.5 Variación genética y uso de técnicas moleculares**

La estructura genética de poblaciones refleja el número de alelos intercambiados entre poblaciones, esto es consecuencia de la composición genética de los individuos. Este intercambio entre poblaciones homogeniza la frecuencia de alelos y determina los efectos relativos de la selección y deriva genética (Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Sabater-Muñoz *et al.* (2012) indican que la variación genética en plagas de importancia económica se determina en términos de especialización del hospedante, adaptación a diferentes sistemas de producción como el orgánico vs manejo integrado de plagas y relaciones filogenéticas.

Las técnicas moleculares hacia finales del siglo XX se han convertido en una herramienta potencial para realizar estudios de ADN a nivel individual. Estas herramientas proporcionan un método directo de medición y cuantificación de la variabilidad genética intra e interespecífica.

La aplicación de marcadores moleculares para el estudio de ácaros es muy reciente y se han utilizado para comprender la estructura de una población, las relaciones taxonómicas, así como la identificación de especies de difícil caracterización, en estudios a nivel individual, poblacional y de especie. Los estudios moleculares se han llevado a cabo principalmente con familias de ácaros fitófagos como Tetranychidae, Eriophyidae y Tenuipalpidae; con depredadores como Phytoseiidae; y con algunas familias de especies parásitas como Varroidae e Ixodidae (Navajas y Fenton, 2000).

Los métodos mas utilizados para determinar la variación genética intra e interespecífica en ácaros son Aloenzimas, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RAPD (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados), microsatélites, análisis de genes mitocondriales y nucleares, entre otros (Navajas y Fenton, 2000).

### **3.5.1 Aloenzimas**

Es una técnica muy efectiva para detectar polimorfismo genético a través del uso de la electroforesis. La mayoría de los estudios que utilizan esta técnica utilizan esterasas para detectar todo tipo de enzimas; es considerado un método sencillo y barato. Sin embargo, las desventajas que presenta este método es que se debe contar con gran cantidad de material biológico, ya que revelan solo una pequeña fracción de la variación genética y es bajo el número de locus detectados en animales pequeños.

En *Tetranychus urticae* Koch se han realizado estudios para conocer su estructura genética de poblaciones y en especies de la familia Phytoseiidae se han realizado estudios de dispersión (Tsagkarakou *et al.*, 1998; Navajas y Fenton, 2000).

### **3.5.2 PCR**

Este método utiliza la enzima ADN polimerasa la cual copia de forma exponencial un fragmento de una región de la molécula de ADN. Además utilizan primers u oligonucleótidos, los cuales delimitan la región que será amplificada (Brown, 2010) y finalmente se produzcan suficiente cantidades de ADN para su análisis posterior con los microsatélites, RAPD, DALP. Para realizar el PCR se requiere una maquina denominada termociclador para aplicar diversos ciclos de temperatura que incluye desnaturalización, alineación y extensión (Navajas y Fenton, 2000) y es un paso indispensable para el uso de las demás técnicas.

### **3.5.3 RAPD (Random amplified polymorphic DNA)**

Es una técnica que utiliza el mismo principio que el PCR, pero con la diferencia que ésta amplifica regiones específicas del genoma distribuidas al azar. Estas regiones después se separaron mediante un gel de agarosa y se obtiene un perfil electroforético. Varios fragmentos de ADN son usualmente amplificados y alguno de estos pueden estar presentes en diferentes proporciones en los individuos de una población (Black, 1993). Sin embargo, algunas veces la interpretación de datos se limita por la baja repetitividad de los resultados y con especies pequeñas la cantidad de ADN obtenida es reducida. Otra limitante que se observa es que estos marcadores son diseñados para visualizar dominancia, previendo identificación de heterocigosis. A pesar de sus desventajas es una técnica fácil y rápida que es exitosamente utilizada para el estudio de paternidad y pedigrí. Como ejemplos de esta técnica, se mencionan los trabajos realizados por Perrot-Minnot y Navajas (1995) quienes comprobaron que el material genético es transmitido de padres a hijos en especies pseudo-arrenotoquias de la familia Phytoseiidae.

### **3.5.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Esta técnica es usada para estudiar la variabilidad en el genoma en diferentes poblaciones de una misma especie, combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR (Navajas y Fenton, 2000).

### **3.5.5 Microsatélites**

Son fragmentos pequeños de ADN (100pb) diseñados de dos a seis pares de bases repetidas que se encuentran en conjunto. Durante la replicación del ADN, las unidades repetidas son añadidas o perdidas causando una evolución rápida de estas regiones (Navajas y Fenton, 2000). Estos marcadores poseen un número grande de alelos disponibles para el análisis de poblaciones. Éstos son considerados marcadores codominantes y polimórficos que pueden ser detectados mediante la medición del tamaño de los fragmentos amplificados por PCR; además de ser considerados como excelentes para el estudio de genética de poblaciones (Navajas *et al.*, 1998).

Aunque es una técnica costosa, es considerada como una técnica altamente polimórfica, comúnmente utilizada para mapeo de genes, exclusión de paternidad y estudios de diferenciación poblacional (Navajas *et al.*, 1998). La desventaja para estudios de la estructura genética de poblaciones en ácaros es que no se han desarrollado en muchas de éstas (Navajas y Fenton, 2000).

### **3.5.6 DALP (Direct amplification of length polymorphism)**

Esta técnica molecular involucra el uso de marcadores universales que pueden ser aplicables para el estudio genético de diferentes especies de plantas y animales (Desmarais *et al.*, 1998). Esta técnica combina la ventaja del polimorfismo y la reproductividad de resultados y es utilizada para estudios genéticos como

variabilidad genética en diferentes poblaciones. Las ventajas que presentan estos marcadores es que son de tipo codominante, además de la existencia de un número ilimitados de éstos, pero que se han utilizado principalmente para el mapeo de genes (Perrot-Minnot *et al.*, 2000).

### **3.5.7 Genes mitocondriales y nucleares ribosomales**

Al igual que las técnicas anteriores, existen diferentes regiones que han sido utilizadas para comparar taxones cercanamente relacionados, así como aquellas no cercanamente emparentadas. Los marcadores más utilizados son los pertenecientes a ADN mitocondrial y nuclear ribosomal y han ido en incremento en el estudio de la subclase Acari (Navajas *et al.*, 1996). El gen más utilizado para la reconstrucción filogenética entre taxones es el Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) (Daber *et al.*, 2010).

Por otro lado, los genes nucleares más frecuentemente utilizados en eucariontes son aquellos que codifican la región 18S, 5.8S y 28S. Entre estos genes se encuentra la región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) 1 y 2. El ITS1 se encuentra entre la región 18S y 5.8S seguida de la ITS2 la cual se encuentra entre la región 5.8S y 28S. Los ITS son herramientas utilizadas para distinguir entre taxones cercanamente relacionados. Los estudios realizados por Ben-David *et al.* (2007) mencionan el uso de ITS2 para la identificación de diferentes especies de la subfamilia Bryobiinae y Tetranychinae.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Recolección del material biológico

Los individuos de *O. punicae* y *O. perseae* fueron recolectados en junio y diciembre de 2011, de cinco huertas comerciales de aguacate Hass del estado de Michoacán y dos huertos en el Estado de México (Cuadro 1).

El muestreo fue aleatorio por conglomerados, el cual consistió en tomar cuatro hojas infestadas con *O. punicae* y *O. perseae* (Figura 2), de cada punto cardinal del dosel del árbol, por lo que el árbol se considero como la unidad de muestreo. El número de árboles donde se recolectaron a los ácaros varió en las diferentes localidades (Anexo 4) obteniendo un total de 80 árboles o unidades experimentales. Las hojas de cada árbol se colocaron dentro de bolsas Ziploc®, previamente etiquetadas, y se transportaron en hieleras de unicel para su revisión en el Colegio de Postgraduados campus Montecillos, en Texcoco, Edo. de México. Las hojas se exploraron con un microscopio estereoscópico y con un pincel fino se extrajeron sólo las hembras adultas de *O. punicae* y *O. perseae* para la identificación molecular. Las cuales se colocaron aproximadamente 20 hembras en tubos tipo Eppendorf de 1.5mL, posteriormente se pesaron en una balanza analítica para obtener entre 1 g de muestra y se almacenaron a -80°C para la extracción posterior del ADN. El ADN extraído de estas muestras también fue

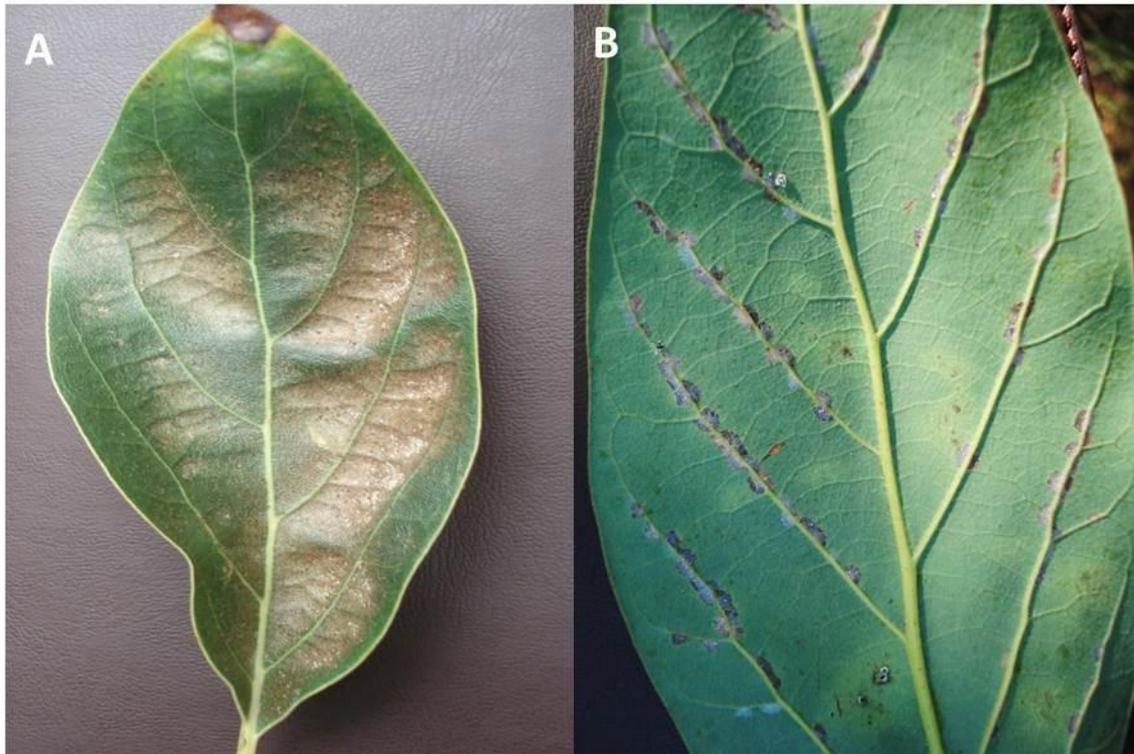
empleado para los estudios de variación genética mediante el análisis de secuencias de las regiones ITS1 e ITS2.

Para la identificación morfológica, se obtuvieron machos y hembras, los cuales se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL con alcohol al 70%.

**Cuadro 1. Localidades de recolecta de material biológico de ácaros en huertos de aguacate Hass.**

Coordenadas geográficas		Latitud (msnm)	Nombre del huerto	Municipio	Estado
Norte	Oeste				
19°22'41.1"	102°14'15.9"	2300	El Durazno	Nvo. Parangaricutiro	Michoacán
19°16'57.6"	102°16'18.3"	2049	La Vaina	Tancitaro	Michoacán
19°23'03.3"	101°51'23.3"	1553	La Mesa	Taretan	Michoacán
19°27'47.4"	102°05'02.3"	1909	Cherangueran	Uruapan	Michoacán
19°22'00.0"	101°39'19.5"	2398	Cuitzitan	Salvador Escalante	Michoacán
19°02'67.7"	99°58'57.2"	1966	Sánchez-Colin (CO)	Temascaltepec	México
19°02'65.6"	99°58'53.0"	2059	Sánchez-Colin (S)	Temascaltepec	México

**CO=huertos con manejo agronómico, S= huertos sin manejo agronómico.  
Datos de Michoacán proporcionados por APEAM A. C.**



**Figura 2. Hojas de aguacate infestadas. A) Aspecto del haz de una hoja madura infestada con *O. punicae*. B) Aspecto del envés de una hoja madura infestada con *O. perseae*.**

#### **4.2 Identificación morfológica**

Del total de unidades experimentales de donde se recolectaron a los ácaros (80 arboles), tanto de *O. punicae* como de *O. perseae*, se seleccionaron tres al azar, y de cada uno de éstos se tomaron tres parejas de adultos, los cuales se aclararon con ácido láctico durante 5 minutos a una temperatura de 60°C, posteriormente se montaron entre porta y cubre objetos con líquido de Hoyer (Krantz y Walter, 2009). Una vez realizadas las preparaciones se mantuvieron a una temperatura de 40°C durante 15 días. Posteriormente se limpiaron y se sellaron con pintura

anticorrosiva automotriz (Comex®). La identificación de las especies se hizo mediante el uso de claves taxonómicas para especie de Baker y Tuttle, (1994) y Bolland *et al.* (1998).

### **4.3 Identificación molecular**

Para esta sección, se seleccionaron hembras de las mismas unidades experimentales seleccionadas en la sección anterior. Se utilizaron de 1 g de los ácaros que se habían mantenido a -80 °C.

#### **4.3.1 Extracción de ADN**

Los ácaros contenidos en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL, se colocaron dentro de un recipiente que contenía nitrógeno líquido durante aproximadamente un minuto; posteriormente los ácaros se maceraron con un micropistilo (Daigger and Company Inc., Vermon Hills, 11, USA). El ADN de los ácaros fue extraído con CTAB (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 1% polivinilpirrolidona, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl) de acuerdo con el protocolo desarrollado por Weeks *et al.* (2000), pero con las siguientes modificaciones: se utilizaron 0.5µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich) con el buffer de extracción CTAB por muestra, se realizaron dos lavados de cloroformo y alcohol isoamílico a la misma proporción. Una vez que fue removido el sobrenadante, la pastilla fue secada a temperatura ambiente por 2.5 h, para posteriormente disolverlo en 60µl de TE 1X (Promega®).

### 4.3.2 Amplificación del gen COI

La amplificación del gen COI se realizó utilizando los oligonucleótidos universales LCO1490 (5'- GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2003). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20  $\mu$ L, la cual contenía 2  $\mu$ L de buffer 10X de PCR (Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 8.7), 0.3 mM de los oligonucleótidos, 0.2 mM de dNTP's, 0.5 U de *Taq* Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), 1.25 mM de  $\text{MgCl}_2$  (QIAGEN) y 2 $\mu$ l de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler™ (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). El programa consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 60 s, seguido por cinco ciclos de 94°C durante 60 s, 45°C durante 90 s y 72°C durante 90 s, 35 ciclos a 94°C durante 60 s; 60°C por 90 s y 72°C por 60 s y finalmente un etapa de extensión a 72°C durante 60 s. Los productos generados se visualizaron en un gel de agarosa (IBI scientific®) al 1% en buffer TAE 1X, el cual se tiñó con bromuro de etidio (10mg/ $\mu$ l), para visualizar los productos bajo luz UV en un fotodocumentador. En cada reacción de PCR y gel de agarosa se incluyó un testigo positivo (ADN extraído de 50 adultos de cada especie) y un testigo negativo compuesto por agua destilada estéril libre de ADNsas. Se usaron dos marcadores moleculares, el 100 bp Plus y el 50 bp (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany).

### **4.3.3 Limpieza y obtención de las secuencias de los productos de PCR**

Los productos de la amplificación se purificaron con el Kit Qiaquick PCR purification Kit 250 (Qiagen®, GmbH, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas se visualizaron en un gel de agarosa para determinar su concentración y posteriormente se enviaron a la compañía Macrogen Inc. en Corea del Sur para su secuenciación directa en ambas direcciones.

### **4.3.4 Análisis de datos**

Las secuencias fueron editadas y ensambladas mediante el programa Bioedit (Hall, 1999). Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa Clustal W implementadas en Mega versión 5.05. Se realizó el análisis de reconstrucción filogenética por el método de máxima parsimonia (MP) mediante el programa Mega versión 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). La robustez de los dendogramas generados fueron analizados con el método “Bootstrap” con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). El análisis de MP se obtuvo con el algoritmo de Close-Neighbor-Interchange con tres niveles de búsqueda, en la que los árboles iniciales se obtuvieron con la adición de secuencias aleatorias de 10 repeticiones. Para el análisis filogenético, se incluyeron tres secuencias de la especie *Uroobovella* sp. con los números de acceso JN992056, JN992096 y JN992071, los cuales sirvieron de grupo externo (outgroup) de referencia.

#### **4.4. Variación genética**

A pesar de haber seleccionado 80 unidades experimentales, no en todas se encontraron ácaros, y no en todas se encontraron ambas especies, por lo que el número de muestras varió para cada especie. En total se obtuvieron 25 muestras para *O. punicae* y 22 para *O. perseae*.

La extracción de ADN de estas muestras fue realizada mediante el procedimiento descrito anteriormente (sección 4.3.1.)

El estudio de la variación genética se realizó con dos metodologías, mediante la amplificación de microsatélites y la secuenciación de los espaciadores transcritos internos o regiones ITS (por sus siglas en inglés).

##### **4.4.1 Microsatélites**

Para el caso de *O. perseae* se utilizaron catorce pares de microsatélites (1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16) desarrollados previamente para *Tetranychus evansi* (Navajas *et al.*, 2002) (Cuadro 2). Las condiciones de PCR fueron mediante la técnica denominada Touch Down que consistió de un ciclo inicial a 95°C durante 120 s, seguido por 10 ciclos a 94°C durante 30 s, 66-57°C durante 30 s, 72°C durante 60 s, 36 ciclos de 94°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 60 s, un ciclo de 72°C durante 30 s, y un ciclo final de extensión de 72°C durante 300 s.

Para el caso particular de *O. punicae* se utilizaron sólo seis pares de microsatélites (1,6, 10, 14, 15, 16) (Cuadro 2), bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

**Cuadro 2. Lista de microsatélites utilizados para el estudio de diversidad genética**

<b>Taxón</b>	<b>Locus</b>	<b>Forward primer (5'-3')</b>	<b>Reverse primer (5'-3')</b>
1.-Tetranychus evansi	evaTC1-F5	CTTTCAGGTCAGGTATCATAAGTC	CTCTCGACCTCTTGATTCTCC
3.-Tetranychus evansi	evaTC1-A12	AGCATTTTAATGTTTCCTTTG	GTTTCACTTGTAATGGCTATG
4.-Tetranychus evansi	evaATCT1-H4	GCACAGTTGAGAACGGGCTAAG	CCTGTTTCTTTACTCATCCTGTCCC
5.-Tetranychus evansi	evaTC1-H4	CGATATAATTGTCAATGGTG	GTATCAAGTATATTCTATATGATG
6.-Tetranychus evansi	evaTC1-G12SA	GCTTGGCTTGAGACAGAAATTGC	CCAGACTCATTGACCGATAGATTG
8.-Tetranychus evansi	evaTC2-A8	GTATTTACACCTTTGCAGAG	GTTTGATTGAAAGACAAAAGCC
9.-Tetranychus evansi	evaTC1-A8	GTTGAATTTACGGTAAACATGA	GTTGAATTTACGGTAAACATGA
10.-Tetranychus evansi	evaTC3-D3	GTCGTCCGGGATTTTTCTG	GTTGCTTGTTAATGTTGTCCTG
11.-Tetranychus evansi	evaTC5-E3	CAAAACGGATCAACACAAGATG	CAGAAAATAACAGGAAGCTGAAG
12.-Tetranychus evansi	evaTC5-D2	CATGTTTCTCAGACTATTATGATGC	GAGGAAACTTAATAGCTTTGCTC
13.-Tetranychus evansi	evaTC1-G11SA	CTGAAGCTCTTCAATGGCAC	CAATCTTTTGCCTTTTGTCTC
14.-Tetranychus evansi	evaATCT2-G11	GGTTGACCGTGAAGAGAG	CAGAATGACAGTTACAATTGC
15.-Tetranychus evansi	evaTC2-A2	CAATTGATGGTTTCTGTTTGG	CATTATCGCTTCACTCATCGTC
16.-Tetranychus evansi	evaTG1-D9SA	GCCAATTGAAGGGTTACAGG	CATTCACAAGCAATGTTATTACCAG

Los diferentes patrones de bandeo se separaron por electroforesis en un gel de agarosa Metaphor (Lonza®) al 3%, en buffer TAE a 80 voltios durante 3.5 horas. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio (10mg/μl) para visualizar los productos bajo luz UV en un fotodocumentador. En cada reacción de PCR y gel de agarosa se incluyó un testigo positivo (muestra con una gran cantidad de ADN de ácaros) y un testigo negativo compuesto por agua destilada estéril libre de ADNsas, los cuales sirvieron para confirmar la validez de las reacciones y la ausencia de contaminación.

#### 4.4.1.1 Análisis de los datos

Se registro el patrón de bandeo manualmente para presencia (1) o ausencia (0) de una banda para producir datos binarios. Se tomaron en cuenta únicamente las bandas que fueran consistentes en al menos dos reacciones independientes.

#### 4.4.2 Amplificación y secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2

La región ITS1 se amplificó en todas las muestras con los oligonucleótidos 5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3' y el reverso 5'-CGTTCTTCATCGATTGGTA-3' (Hurtado *et al.*, 2008). La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 µL, la cual contenía 2.5 µL de buffer 10X de PCR (Tris-Cl, Kcal, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8.7), 0.5 µm de los oligonucleótidos, 250 µm de dNTP's, 1 U de *Taq* Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (QIAGEN) y 2µl de ADN. Las condiciones térmicas fueron con un ciclo inicial de 94°C 240 s, 35 ciclos de 92°C 60 s, 50°C 60 s y 72°C 30 s, y finalmente un ciclo de 72°C por 10 min.

La región ITS2 se amplificó con el oligonucleótido iniciador 5'-GTCACATCTGTCTGAGAGTTGAGA-3' y el oligonucleótido reverso degenerado 5'-GTARCCTCACCTRMTCTGAGATC-3' (Ben-David *et al.*, 2007). El volumen final de reacción fue de 27 µL, la cual contenía 3 µL de buffer 10X de PCR (Tris-Cl, Kcal, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8.7), 0.5 µm de los oligonucleótidos, 0.2 mM de dNTP's, 2 U de *Taq* Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), y 2µl de

ADN. Las condiciones térmicas de un ciclo inicial de 94°C durante 4 min, 35 ciclos de 94°C 30s, 51°C 40s y 72°C 40s finalmente un ciclo de 72°C por 10 min.

Los productos generados tanto en la amplificación de la ITS1 como la ITS2 se visualizaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio (10mg/μl) y visualizados con UV en un fotodocumentador. En cada reacción de PCR y gel de agarosa se incluyó un testigo positivo de la muestra con una gran cantidad de ADN de ácaros y un testigo negativo compuesto por agua destilada estéril libre de ADNsas, los cuales sirvieron para confirmar la validez de las reacciones y la ausencia de contaminación.

Se uso un marcador molecular de 100 bp Plus (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany).

#### **4.4.2.1 Análisis de los datos**

El método de secuenciación y análisis filogenético fue igual al descrito anteriormente para el fragmento COI, excepto que las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 fueron concatenadas para realizar el análisis filogenético.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Identificación morfológica

La identificación morfológica demostró la presencia de *O. punicae* y *O. perseae*; sin embargo, la presencia de estas dos especies no fue constante en todos los huertos (Cuadro 3.)

**Cuadro 3. Huertos de aguacate muestreados en los estados de México y Michoacán donde se muestra la presencia de *O. perseae* y *O. punicae*.**

Nombre del huerto	Estado	<i>O. perseae</i>	<i>O. punicae</i>
El Durazno (D)	Michoacán		*
La Vaina (V)	Michoacán	*	*
La Mesa (M)	Michoacán	*	*
Cherangueran (CH)	Michoacán	*	*
Cuitzitan (C)	Michoacán	*	
Sánchez-Colin (CO)	México	*	*
Sánchez-Colin (S)	México	*	*

Estos ácaros se caracterizaron por presentar quelíceros estiletiformes retractiles (estiloforo), estigmas en la base del gnatosoma, presencia de onicotriquias, palpos de cinco segmentos y sedas dobles en el tarso I, como todos los miembros de la familia Tetranychidae (Krantz y Walter, 2009). De acuerdo con la clave taxonómica para géneros de la Familia Tetranychidae existentes en México (Tuttle *et al.*, 1976), se observaron dos pares de sedas anales y un par de para-anales, un par de sedas dobles en el tarso I y empodio en forma de uña. Con estas características ubicamos a los individuos recolectados dentro del género *Oligonychus* sp. Para determinar la especie se observó el edeago de los machos y las estrías opistosomales. En *O. punicae* el edeago es curvado en ángulo recto, ensanchado hacia la base y acabado en punta (Figura 3A), las estrías opistosomales, entre  $e_1$  y  $f_1$ , son transversales.

*Oligonychus perseae* presenta estrías opistosomales, entre  $e_1$  y  $f_1$ , longitudinales. El edeago es curvado hacia abajo con una punta corta y afilada (Figura 3B).



**Figura 3. Forma del edeago de *Oligonychus*. A) *O. punicae*. B) *O. perseae*.**

## **5.2 Identificación molecular**

A pesar de haber extraído el ADN de 26 muestras de *O. punicae* y 22 de *O. perseae*, únicamente se lograron amplificaciones exitosas en 21 y 9 muestras de *O. punicae* y *O. perseae*, respectivamente. Las secuencias parciales de COI tuvieron una longitud entre 300 y 697 pb. El análisis filogenético de las secuencias generadas se agruparon en tres grupos (Figura 4). En el grupo 1 se conformaron todas las muestras de *O. punicae* de todos los huertos muestreados. En el grupo 2 se agruparon todas las secuencias de *O. perseae*. El grupo tres estuvo conformado únicamente por las tres secuencias de referencia o grupo externo.

Dentro del grupo 1, se observa la formación de dos subgrupos A1 y B1; el grupo A1 esta conformado únicamente por *O. punicae* recolectados de Michoacán, y el grupo B1 por los recolectados en el estado de México. Dentro del grupo 2 (*O. perseae*), también se encontró la formación de dos subgrupos A2 y B2; sin embargo, esta separación no tuvo una correlación con su origen geográfico como los subgrupos del grupo 1, ya que en cada subgrupo se encontraron ácaros recolectados en ambos estados.

### **5.3 Variación genética**

#### **5.3.1 Microsatélites**

De los 14 microsatélites probados en las especies en estudio, los fragmentos observados no fueron consistentes en su segunda reacción, por lo tanto no fueron tomados en cuenta como reacciones positivas. Además se observó que la muestra tomada como positiva (50 ácaros), en pocos casos se amplificó. Únicamente se observó amplificación con los microsatélites 6, 12, 14, 15 y 16 con tamaño aproximado de 150-250 pb.

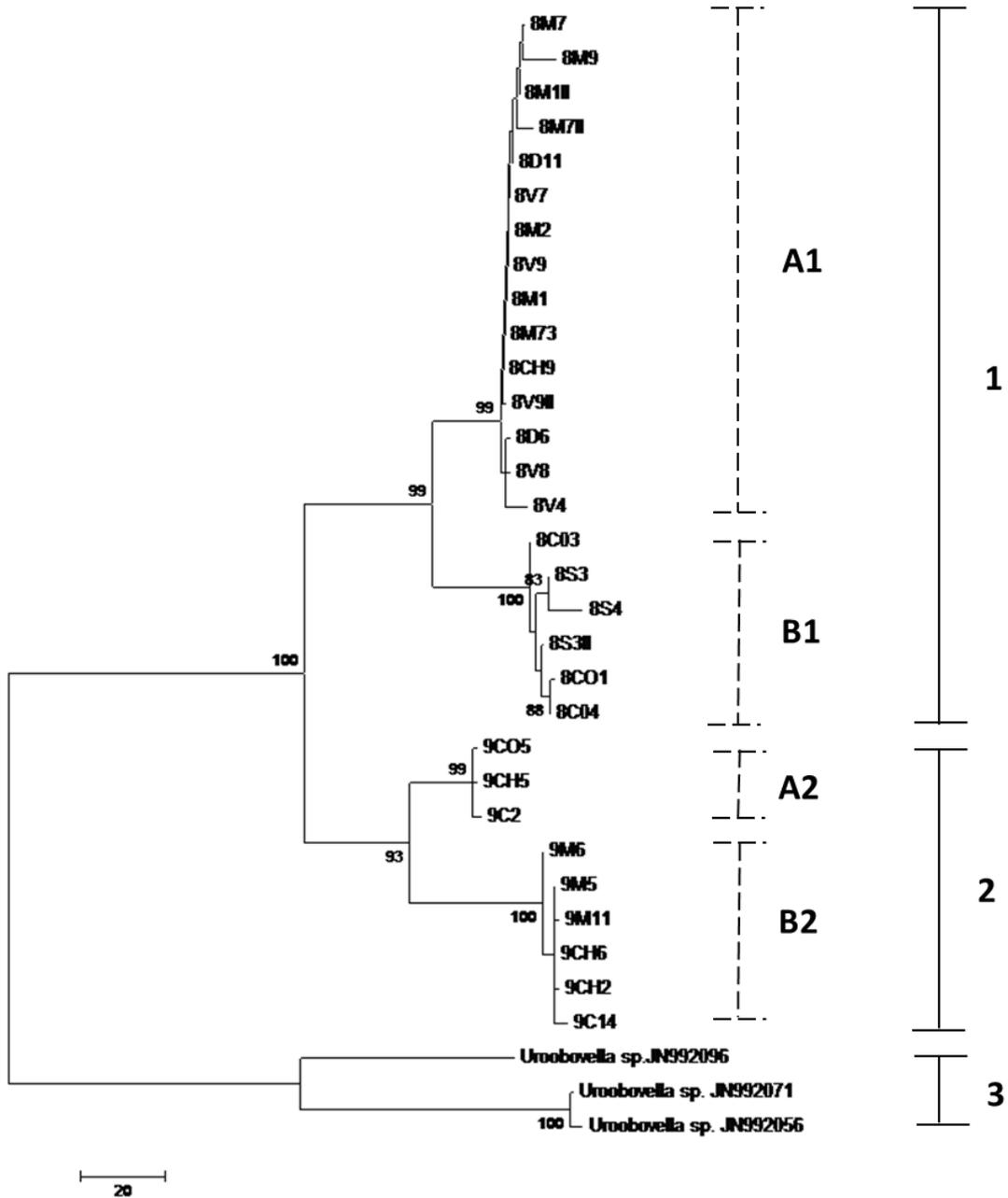


Figura 4. Reconstrucción filogenética de una fracción de la región COI de *O. punicae* y *O. perseae* utilizando el método máxima parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap. Muestras que inician con el número ocho son de *O. punicae* y muestras con el número nueve corresponden a *O. perseae*.

### 5.3.2 Secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2

Se obtuvo un total de 22 secuencias para *O. perseae*. Las secuencias tuvieron una longitud máxima de 889 pb. El análisis filogenético de las secuencias generadas para esta especie se agruparon en dos grupos (A y B) (Figura 5). En el grupo A se encuentran 16 poblaciones, las cuales a su vez se separan en dos grupos, el primero conformado por las seis poblaciones perteneciente al Estado de México y Michoacán, el segundo grupo por las poblaciones CO4, C13 y S2. El grupo B se encuentra formado por seis poblaciones (CH6, M5, M6, M8, CH7 y M11), todas del estado de Michoacán (Figura 5).

Para *O. punicae* se obtuvo un total de 26 secuencias con una longitud máxima de 1070 pb. El análisis filogenético de las secuencias generadas para esta especie se agruparon en tres grupos (A, B y C) (Figura 6). En el grupo A se encuentran agrupadas 16 poblaciones de cinco localidades del estado de Michoacán, el segundo grupo (B) está conformado por ocho poblaciones pertenecientes a dos localidades del Estado de México y finalmente el grupo C por dos poblaciones del estado de Michoacán (CH3 y M8) (Figura 6).

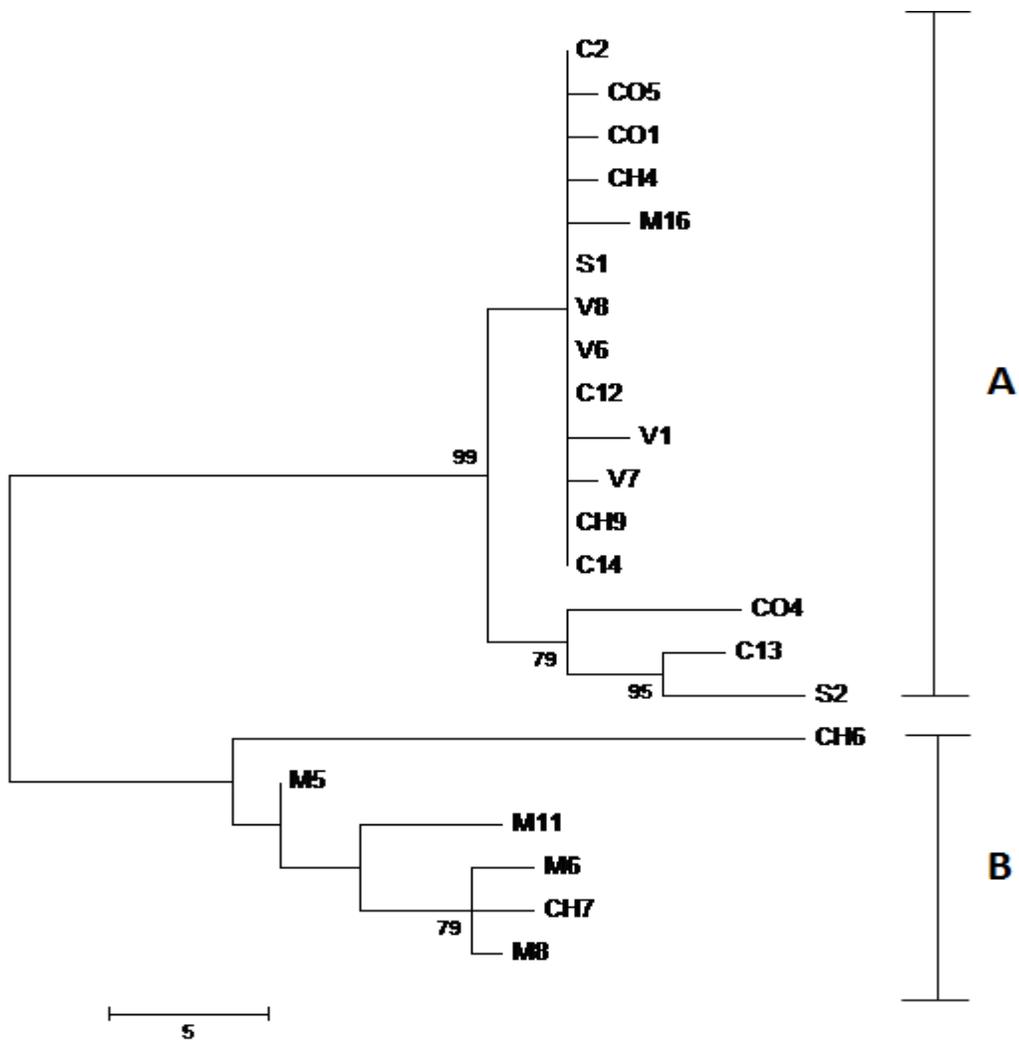


Figura 5. Reconstrucción filogenética por el método Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones Bootstrap de las muestras de *O. perseae* de Michoacán y del Estado de México.

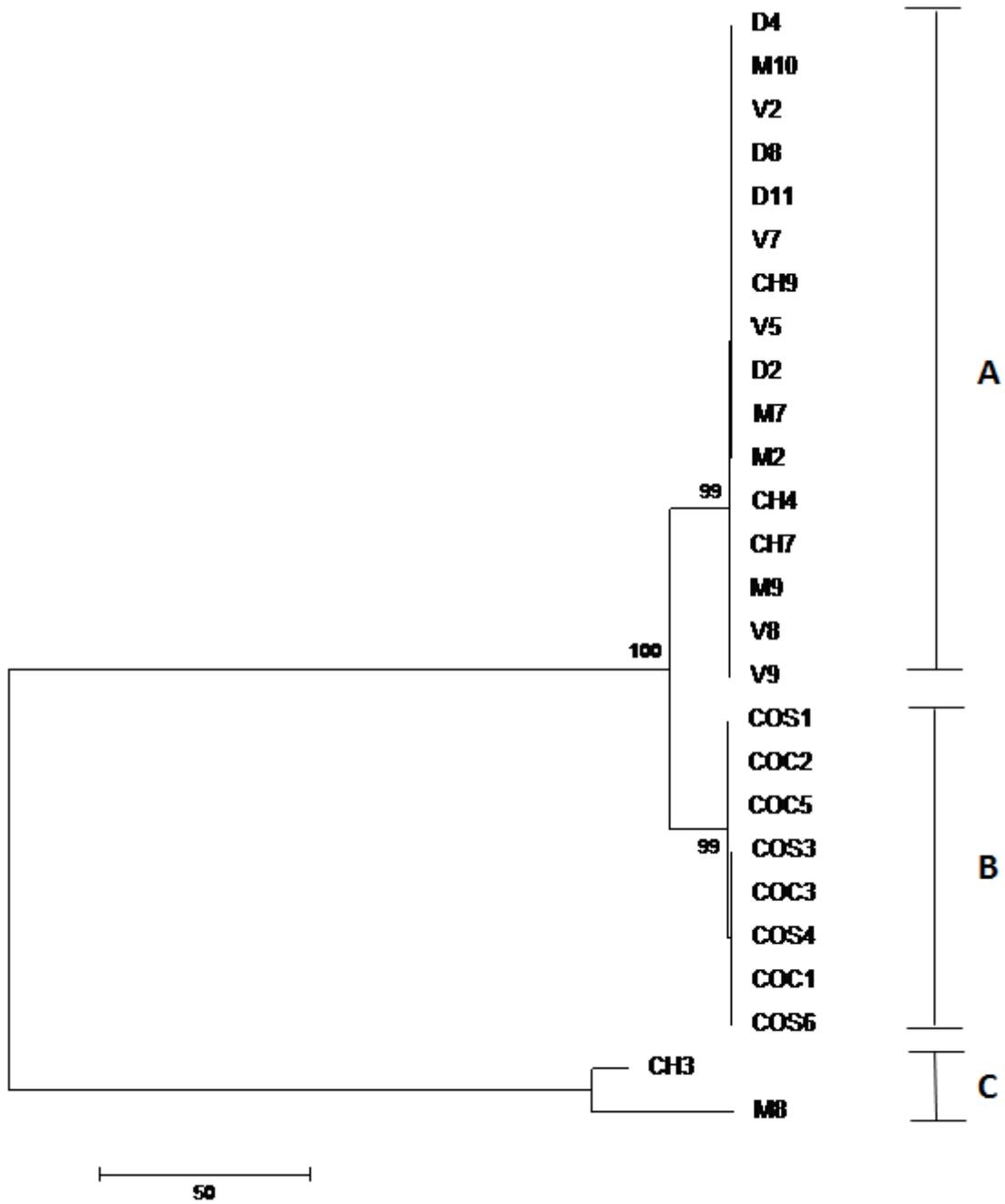


Figura 6. Reconstrucción filogenética por el método Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones Bootstrap de las muestras de *O. punicae* de Michoacán y del Estado de México.

## VI. DISCUSIÓN

*Oligonychus punicae* y *O. perseae* se caracterizan en su biología por producir síntomas muy característicos de infestación, por lo que son fácilmente distinguibles a nivel de campo. Sin embargo, cuando se diseña una estrategia de control de una plaga, es necesario que su identificación sea precisa, por lo que en la actualidad la identificación molecular ha permitido fortalecer la identificación que se realiza por medio de métodos tradicionales como son las claves taxonómicas.

El uso del gen citocromo oxidasa subunidad I, ha sido sugerido como el idóneo para confirmar la identificación morfológica de las especies de la familia Tetranychidae y Tenuipalpidae (Navajas *et al.*, 1996). Desafortunadamente no existen muchos trabajos de identificación molecular de *O. punicae* y *O. perseae* (Matsuda *et al.*, 2012); sin embargo, los resultados del presente trabajo, al amplificar el gen COI, mostraron una clara separación entre ambas especies, lo cual efectivamente fue confirmado con la identificación tradicional mediante claves taxonómicas.

El análisis para la reconstrucción filogenética específica de las muestras de *O. perseae* agrupa a todas las muestras de esta especie en un solo grupo y las muestras de *O. punicae* en otro grupo, haciendo la separación de las dos especies en estudio.

Para determinar si existía una variación genética intraespecífica en *O. punicae* y *O. perseae* se planteo, inicialmente, el uso de microsatélites por lo que se decidió utilizar aquellos diseñados para *Tetranychus evansi* (Navajas *et al.* 2002). Suponemos que las secuencias de estos microsatélites no están presentes en las especies que estudiamos porque no obtuvimos amplificaciones consistentes (datos no mostrados). Sin embargo, al emplear secuencias de las regiones ITS1 e ITS2, se encontró una alta variación genética. Estas regiones han sido usadas anteriormente con buenos resultados (Navajas *et al.*, 1998).

Para el caso de *O. perseae* (Figura 5), el análisis filogenético mostró evidencia de una variación genética importante entre las poblaciones recolectadas en los huertos Cherangueran y la Mesa (estado de Michoacán). Entre los factores que se han sugerido como causantes de variación genética esta la densidad poblacional; cuando la población es pequeña, se altera fácilmente la frecuencia de los alelos y la predominancia de las características genéticas entre los individuos de una población (Tsagkarakou *et al.* 1997; 1998). Por lo que se considera que este podría ser uno de los factores que produjo dicha variación en las muestras estudiadas, ya que cuando se recolectaron los ácaros del campo no en todas las

hojas se obtenían ácaros, esto sugiere que estas especies están en grupos pequeños y no en todo el árbol. Sin embargo, no podemos afirmar esto con certeza para *O. perseae* en ese sitio, por lo que sería importante estudiar más de cerca a esta población y determinar su dinámica poblacional e incluso su resistencia y/o susceptibilidad a acaricidas, para ver si tiene un comportamiento diferente que las demás poblaciones.

Con lo que respecta a *O. punicae* se observa que la distancia geográfica entre las poblaciones en huertos de aguacate de Michoacán y el Estado de México, si podría estar jugando un papel importante en la variación genética observada con la amplificación de la región ITS (Figura 6), ya que de manera general, las poblaciones del Estado de México y Michoacán fueron asignadas a grupos diferentes (Figura 6). La separación geográfica entre poblaciones de la misma especie ya ha sido reportada previamente como una fuente importante de variación genética, la distancia entre las muestras de Michoacán y el estado de México es de aproximadamente 180 km entre ambos sitios lo cual puede estar afectando negativamente el flujo de genes y por ende la estructura genética de las poblaciones (Balloux y Lugon-Moullin, 2002; Carbonnelle *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Es importante mencionar que esta variación genética implica la influencia de no únicamente factores externos como clima y actividad humana, si no también la misma plasticidad y capacidad reproductiva de una población puede tener un efecto sobre su estructura genética (Ben-David *et al.*, 2007).

Con esta misma especie observamos que dos huertas del estado de Michoacán (la Mesa y Cherangueran) se separaron del grupo en donde se conformaron las muestras recolectadas en este mismo estado como también se observó en las poblaciones de *O. perseae*. Probablemente, la existencia de barreras como cortinas de árboles y cerros en estas localidades impiden la libre dispersión de los ácaros manteniéndolos aislados (Tsagkarakou *et al.*, 1997; Li y Margolies, 1993).

Por otro lado, no debemos descartar la posibilidad de que el manejo del cultivo del aguacate es diferente en cada localidad dentro del mismo estado. Existe una gran probabilidad de que las poblaciones de ácaros estén sometidas constantemente a la aplicación de acaricidas lo que genera, con el tiempo, que las poblaciones cambien para resistir a éstos (Carbonnelle *et al.*, 2007).

Es evidente que la variación genética detectada puede ser producto de diversos factores como los anteriormente mencionados. Es difícil saber las causas más importantes para esta variación genética de las poblaciones estudiadas; sin embargo, es importante estudiar el efecto práctico de estas variaciones; es decir, al ser diferentes genéticamente es posible que haya diferencias en las tasas de reproducción de las diferentes poblaciones, los niveles de daño que ocasionan y su susceptibilidad a acaricidas convencionales (Carbonnelle *et al.*, 2007); por lo que se debe tomar en cuenta para el diseño de estrategias adecuadas de manejo.

## VII. CONCLUSIONES

La información genética del gen COI es confiable para la identificación específica de *O. punicae* y *O. perseae*, y es de gran utilidad cuando no se dispone de los estados de desarrollo de los individuos adecuados para la realización de una identificación morfológica.

Ambas especies presentan una variación genética intra-específica significativa.

La variación genética observada en las poblaciones de *O. perseae*, no estuvo influenciada por la distancia geográfica existente entre los lugares de donde se recolectaron los ácaros, pero si presentó una fuerte correlación con el tipo de manejo agronómico de los huertos de esta especie en el Estado de México.

La variación genética observada en las poblaciones de *O. punicae* pareciera estar influenciada por la separación geográfica de los diferentes lugares muestreados, siendo mas evidente la separación entre las poblaciones del estado de México y Michoacán.

En general, la variación genética intra-específica encontrada puede ser el resultado de la combinación de diversos factores como atmosféricos, actividad humana, factores específicos de algunos huertos, como la existencia de barreras físicas, manejo agronómico del cultivo, etc.

Finalmente, cabe mencionar que se acepta en parte la hipótesis planteada de que las poblaciones de *O. perseae* y *O. punicae* en aguacate var. Hass de las principales localidades productoras del estado de Michoacán y México son genéticamente diferentes.

## VIII. LITERATURA CITADA

[APROAM] Asociación de Productores de Aguacate de Uruapan, Michoacán. 2007. (En línea). Disponible en [www.aproam.com](http://www.aproam.com) (revisado el 8 de febrero de 2011).

[FAO]FAO'S Statistical Database. 2010 In: Food and Agriculture Organization of the United Nations). (En línea). Disponible en <http://faostat.fao.org> (revisado el 4 de febrero de 2011).

[SIAP] Servicio Nacional de Información Agroalimentaria y pesquera. 2011. In: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (En línea). Disponible en [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx) (revisado el 4 de febrero de 2011).

Aponte, O. & McMurtry, J. A. 1997. Damage on 'Hass' avocado leaves, webbing and nesting behaviour of *Oligonychus perseae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 21:265-272.

Bailly, X., Migeon, A. & Navajas, M. 2004. Analysis of microsatellite variation in the spider mite pest *Tetranychus turkestanii* (Acari: Tetranychidae) reveals population genetic structure and raises questions about related ecological factors. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 69-78.

Baker, E. W., & Tuttle, D. M. 1994. A guide to the spider mites (Tetranychidae) of the United States. Indira Publishing House, MI.

Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.

- Barbosa, G. A. M. 1983. Ciclo biológico de la araña roja del aguacate *Oligonychus punicae* (Hirts) en estudio de laboratorio. Tesis profesional. Chapingo. 52pp.
- Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U. & Morin, S. 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari:Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 41: 169-181.
- Black, W. C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology* 2: 1-6.
- Bolland, H. R., Gutierrez, J. & Flechtmann, C. H. W. 1998. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Bill Leiden. The Netherlands.
- Brown, T. A. 2010. The Polymerasa Chain Reaction. Pp:117-120. In *Gene cloning & ADN analysis an Introduction*. Ed. Sixth. Wiley-Blackwell. University of Manchester. Manchester:
- Carbonnelle, S., Hance, T., Migeon, A., Baret, P., Cros-Arteil, S. & Navajas, M. 2007. Microsatellite markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Experimental and Applied Acarology* 41:225-241.
- Carew, M. E., Goodisman, M. A. D. & Hoffmann, A. A. 2003. Species status and population genetic structure of grapevine eriophyoid mites. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 111:87-96
- Cerna, E., Badii, M. H., Ochoa, Y., Aguirre, U. L. A & Landeros, J. 2009. Tabla de vida de *Oligonychus punicae* Hirst (Acari: Tetranychidae) en hojas de aguacate (*Persea americana* Mill) variedad Hass, fuerte y criollo. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo* 25(2):133-140.

- Dabert, M., Witalinski, W., Kazmierski, A., Olszanowski, Z. & Dabert, J. 2010. Molecular phylogeny of acariform mites (Acari: Arachnida). Strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 222-241.
- Desmarais, E., Lanneluc, I. & Lagnel, J. 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*. 26: 1458–1465
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Halliday, R. B. 2000. Additions and corrections to Mites of Australia: a Checklist and bibliography. *Australian Journal of entomology* 39:233-235.
- Hebert, D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & De Waard, R. 2003. Biological identifications through ADN barcodes. *Proceeding of the royal Society London* 270: 313-321.
- Helle, W. & Sabelis, M. W. 1985. Spider mites: Their biology, natural enemies and control. *World Crop Pests Vol. 1A* Amsterdam: Elsevier

- Hurtado, M. A., Ansaloni, T., Cros-Arteil, S., Jacas, J. A. & Navajas, M. 2008. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Annals of Applied Biology* 153:167-174.
- Jeppson, L. R., Keifer, H. H. & Baker, E.W. 1975. Mites injurious to economic plants. Berkeley, CA: University of California Press
- Kerguelen, V. & Hoddle, M. S. 2000. Comparison of the susceptibility of several cultivars of avocado to the persea mite, *Oligonychus perseae* (Acari:Tetranychidae). *Scientia Horticulture* 84: 101-114.
- Knight, J. R. 1999. Genetic diversity in avocado. pp: 27-29. In: Arpaia M. L., Hofshi R. (Eds) Proceedings of avocado brainstorming. University of Florida, Homestead.
- Krantz, G. W & Walter, D. E. 2007. A manual of Acarology. Third edition. Texas Tech University Press. Texas, United State of America.
- Li, J, & Margolies, D. C. 1993. Effects of age, mite density, and host quality on aerial dispersal behavior in two-spotted spider mite. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 68: 79-86.
- Li, T., Xiao-Lin C & Xiao-Yue H. 2009. Population genetic structure of *Tetranychus urticae* and Its siblings Species *Tetranychus cinnabarius* (Acari: Tetranychidae) in China as Inferred from microsatellite data. *Annal of the Entomological Society of America*:102: 674-683.

- Matsuda, T., Hinomoto, N., Singh, N. R., & Gotoh, T. 2012. Molecular-Based identification and phylogeny of *Oligonychus* species (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 105(3):1043-1050.
- Navajas, J. M., Thistlewood, M. A. H., Lagnel, J. & Hughes, C. 1998. Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. *Insect Molecular Biology* 7: 249-256.
- Navajas, M. & Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology* 24: 751-774.
- Navajas, M., Fournier, D., Lagnel, J., Gutierrez & Boursot, P. 1996. Mitochondrial COI sequence in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Molecular Biology* 5(4): 281-285.
- Navajas, M., Perrot-Minnot, M. J., Lagnel, J. Migeon, A. Bourse, T. & Cornuet, J. M. 2002. Genetic structure of a greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-temporal analysis with microsatellite markers. *Insect Molecular Biology* 11:157–165.
- Nishimura, S., Hinomoto, N. & Takafuji, A. 2005. Gene flow and spatio-temporal genetic variation among sympatric populations of *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae) occurring on different host plants, as estimated by microsatellite gene diversity. *Experimental and Applied Acarology* 35: 59–71.
- Perrot-Minnot, M. J., & Navajas, M. 1995. Pseudo-arrhenotoky involves biparental inheritance of RAPD markers in males of the haplo-diploid mite *Typhlodromus pyri*. *Genome* 38:838-844.

- Perrot-Minnot, M.J., Lagnel, J., Desmarais, E. & Navajas, M. 2000. Isolation and characterization by direct amplification of length polymorphism (DALP) of codominant genetic marker with mendelian inheritance in *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* 24: 795–803.
- Sabater-Muñoz, B., Pascual-Ruiz, S., Gómez-Martínez, M. A., Jacas, J. A. & Hurtado, M. A. 2012. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Tetranychus urticae* and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economic importance. *Experimental and Applied Acarology* (Published online: 16 February 2012).
- Tamura, K., Paterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Téliz, O. D. & Mora, A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. México, Mundi-Prensa. p. 321.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Lagnel, J. & Pasteur, N. 1997. Population structure in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Crete based on multiple allozymes. *Heredity* 78:84-92.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Papaioannou-Souliotis, P. & Pasteur, N. 1998. Gene flow among *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in Greece. *Molecular Ecology* 6: 305-14.

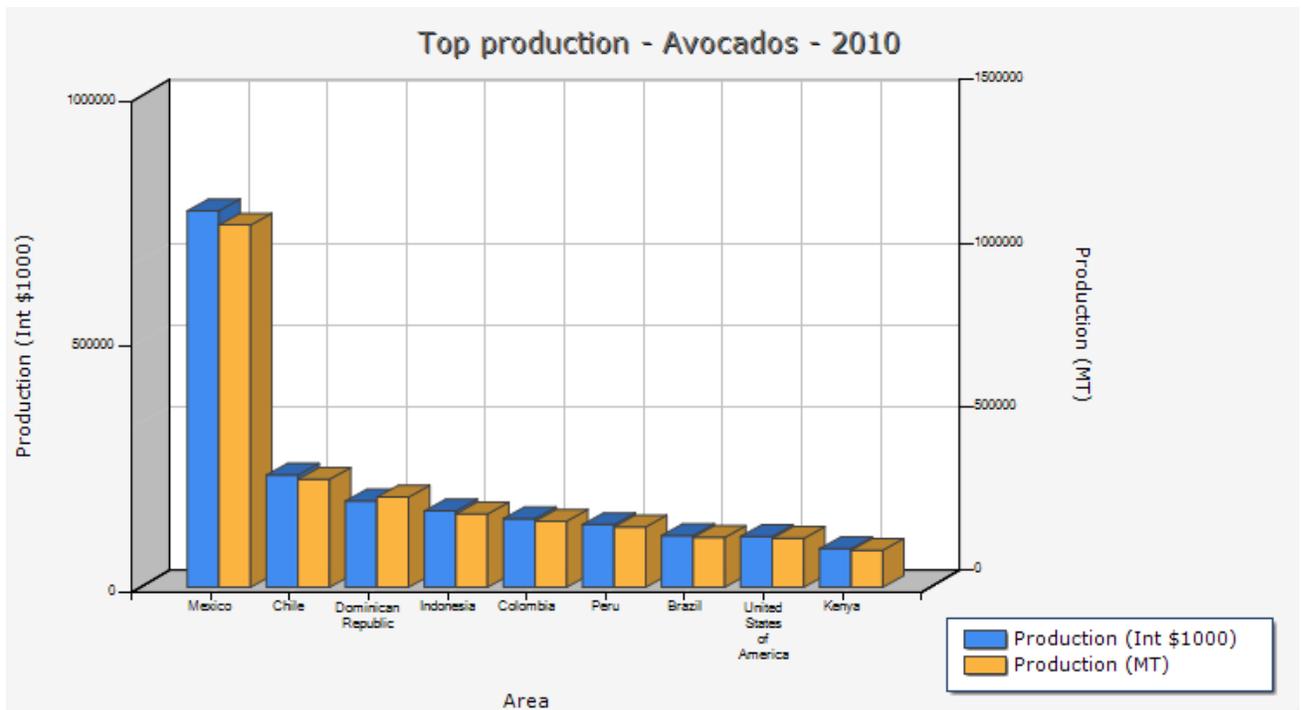
- Vásquez, C. O., Aponte, J. Morales, M. Sanabri G. G. 2008. Biological studies of *Oligonychus punicae* (Acari: Tetranychidae) on grapevine cultivar. *Experimental and Applied Acarology* 45: 59-69.
- Weeks, A. R., Van Opijnen, T. & Breeuwer, J. A. J. 2000. AFLP fingerprinting for assessing intraspecific variation and genome mapping in mites. *Experimental and Applied Acarology* 24: 775-793.
- Williams, O. L. 1976. Proceeding of the First International Tropical Fruit Short Course: The Avocado. The botany of the avocado and food and Agricultural Sciences, University of Florida: 9-15.

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Lista de países productores de aguacate datos de FAO (Food and Agriculture Organization) 2010

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1	Mexico	767203	*	1107140
2	Chile	228676	*	330000
3	Dominican Republic	175681	*	275569
4	Indonesia	155415	*	224278
5	Colombia	139887	*	201869
6	Peru	127761	*	184370
7	Brazil	105455	*	152181
8	United States of America	103458	*	149300
9	Kenya	78447	*	113206
10	China	73037	*	105400
11	Spain	71998	*	103900
12	Guatemala	63752	*	92000
13	South Africa	57189	*	82529
14	Rwanda	50932	*	73500
15	Israel	50692	*	73153
16	Venezuela (Bolivarian Republic of)	50516	*	72900
17	Democratic Republic of the Congo	46439	*	67016
18	Cameroon	38805	*	56000
19	Haiti	32846	*	47400
20	Australia	25847	*	37300

## Anexo 2. Producción mundial según FAO (Food and Agriculture Organization) 2010



### Anexo 3. Producción agrícola del aguacate en 2010 (SIAP, 2011)

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
AGUASCALIENTES	17	17	191.4	11.26	15,749.22	3,014.40
BAJA CALIFORNIA	31	24	55.8	2.32	12,258.06	684
BAJA CALIFORNIA SUR	117.5	110	633.13	5.76	12,056.55	7,633.37
CAMPECHE	59.75	59.75	509	8.52	4,261.85	2,169.28
CHIAPAS	1,412.40	767	7,308.71	9.53	15,866.66	115,964.78
COLIMA	240.4	60.55	613.47	10.13	7,926.73	4,862.81
DURANGO	1,144.00	707	2,239.24	3.17	20,458.03	45,810.43
GUANAJUATO	220	185	821	4.44	9,068.70	7,445.40
GUERRERO	2,466.11	1,943.00	13,408.94	6.9	7,247.86	97,186.13
HIDALGO	451	373	2,435.30	6.53	12,705.41	30,941.48
JALISCO	10,867.98	5,929.35	37,741.54	6.36	10,156.31	383,314.81
MEXICO	3,744.20	2,362.50	25,955.00	10.99	13,737.61	356,559.72
MICHOACAN	108,683.09	104,808.74	1,092,344.21	10.42	15,063.00	16,453,977.72
MORELOS	3,319.40	3,034.40	27,715.53	9.13	10,640.09	294,895.78
NAYARIT	4,140.45	2,919.61	25,707.22	8.8	5,901.92	151,721.95
NUEVO LEON	655.03	20.75	32.1	1.55	3,345.79	107.4
OAXACA	1,526.49	681.74	3,433.82	5.04	10,735.45	36,863.62
PUEBLA	1,689.50	1,432.50	6,965.19	4.86	8,079.69	56,276.58
QUERETARO	103.5	90	289.4	3.22	5,955.31	1,723.47
QUINTANA ROO	4	4	71.4	17.85	4,459.37	318.4
SAN LUIS POTOSI	11	11	59.52	5.41	10,067.74	599.23
SINALOA	22	4	24	6	12,000.00	288
SONORA	27	27	363.5	13.46	8,502.62	3,090.70
TABASCO	108	108	565.34	5.24	3,751.72	2,121.00
TAMAULIPAS	20.5	20.5	292	14.24	1,486.30	434
VERACRUZ	429	277	2,225.20	8.03	13,522.86	30,091.07
YUCATAN	561.8	546.5	11,714.20	21.44	3,785.49	44,343.97
ZACATECAS	74	74	426.3	5.76	9,300.40	3,964.76
	<b>142,146.10</b>	<b>126,597.89</b>	<b>1,264,141.46</b>	<b>9.99</b>	<b>14,346.82</b>	<b>18,136,404.25</b>

**Anexo 4. Árboles muestreados en los diferentes huertos del estado de Michoacán.**

---

**Huerta: La Vaina**

Árboles elegidos: 9

---

árbol	Latitud Norte (N)	Longitud Oeste (W)	Altura (m)	Símbolo
1	19°28'20.9"	102°27'18.6"	2082	V1
2	19°28'22.6"	102°27'17.1"	2087	V2
3	19°28'22.8"	102°27'17.0"	2088	V3
4	19°28'20.4"	102°27'15.7"	2085	V4
5	19°28'22.4"	102°27'14.9"	2091	V5
6	19°28'23.5"	102°27'13.6"	2097	V6
7	19°28'19.8"	102°27'14.5"	2089	V7
8	19°28'19.8"	102°27'14.5"	2089	V8
9	19°28'22.2"	102°27'15.7"	2085	V9

---

---

**Huerta: El Durazno**

Arboles elegidos: 15

---

1	19°38'04.2"	102°23'96.2"	2331	D1
2	19°38'04.3"	102°23'97.4"	2334	D2
3	19°38'04.8"	102°23'99.4"	2338	D3
4	19°38'05.0"	102°24'01.1"	2345	D4
5	19°38'05.1"	102°24'03.1"	2346	D5
6	19°38'07.6"	102°24'03.4"	2351	D6
7	19°38'09.0"	102°24'02.3"	2351	D7
8	19°38'09.2"	102°24'01.1"	2348	D8
9	19°38'09.2"	102°24'01.3"	2349	D9
10	19°38'05.3"	102°23'95.4"	2338	D10
11	19°38'05.2"	102°23'95.4"	2338	D11
12	19°38'08.7"	102°23'95.6"	2343	D12
13	19°38'09.2"	102°23'96.9"	2347	D13
14	19°38'11.0"	102°23'99.1"	2352	D14
15				D15

---

---

**Huerta: Cherangueran**

Arboles elegidos: 9

---

1	19°46'23.1"	102°08'43.0"	1937	CH1
2	19°46'30.4"	102°08'44.0"	1936	CH2
3	19°46'31.9"	102°08'44.4"	1938	CH3
4	19°46'28.6"	102°08'46.3"	1927	CH4
5	19°46'31.2"	102°08'47.3"	1930	CH5
6	19°46'28.1"	102°08'47.9"	1922	CH6
7	19°46'29.2"	102°08'50.4"	1921	CH7
8	19°46'29.1"	102°08'50.5"	1917	CH8
9	19°46'29.7"	102°08'51.7"	1919	CH9

---

---

**Huerta: La mesa**

Arboles elegidos: 20

---

1	19°38'45.4"	101°85'62.3"	1558	M1
2	19°38'46.0"	101°85'62.2"	1558	M2
3	19°38'47.0"	101°85'62.1"	1557	M3
4	19°38'47.7"	101°85'61.8"	1556	M4
5	19°38'43.3"	101°85'63.6"	1557	M5
6	19°38'45.0"	101°85'63.3"	1557	M6
7	19°38'46.5"	101°85'63.1"	1556	M7
8	19°38'49.9"	101°85'63.2"	1551	M8
9	19°38'43.5"	101°85'64.3"	1554	M9
10	19°38'44.3"	101°85'64.1"	1553	M10
11	19°38'45.1"	101°85'64.0"	1553	M11
12	19°38'47.5"	101°85'64.3"	1550	M12
13	19°38'43.8"	101°85'65.1"	1549	M13
14	19°38'45.7"	101°85'64.6"	1547	M14
15	19°38'47.5"	101°85'64.2"	1546	M15
16	19°38'50.2"	101°85'63.7"	1542	M16
17	19°38'47.7"	101°85'65.5"	1542	M17
18	19°38'49.0"	101°85'65.8"	1539	M18
19	19°38'49.1"	101°85'65.7"	1540	M19
20	19°38'45.9"	101°85'66.4"	1542	M20

---

---

**Huerta: Cuitzitan**

Arboles elegidos: 16

---

1	19°36'71.6"	101°65'60.1"	2429	C1
2	19°36'73.6"	101°65'55.6"	2429	C2
3	19°36'72.2"	101°65'57.2"	2428	C3
4	19°36'71.3"	101°65'59.5"	2429	C4
5	19°36'70.8"	101°65'58.9"	2429	C5
6	19°36'72.2"	101°65'55.6"	2428	C6
7	19°36'71.3"	101°65'55.8"	2428	C7
8	19°36'70.8"	101°65'57.2"	2428	C8
9	19°36'68.9"	101°65'56.0"	2428	C9
10	19°36'68.1"	101°65'56.2"	2426	C10
11	19°36'67.2"	101°65'56.3"	2427	C11
12	19°36'68.2"	101°65'53.7"	2427	C12
13	19°36'78.2"	101°65'51.5"	2426	C13
14	19°36'67.9"	101°65'52.4"	2427	C14
15	19°36'67.1"	101°65'54.8"	2426	C15
16	19°36'67.0"	101°65'52.7"	2426	C16

---

**Anexo 4. Árboles muestreados en los diferentes huertos del estado de México.**

---

**Huerta: Temascaltepec con manejo agronómico**

Árboles elegidos:5

---

1	19°02'67.7"	99°58'57.2"	1966	CO1
2	19°02'63.8"	99°58'55.8"	1992	CO2
3	19°02'61.9"	99°58'53.3"	2040	CO3
4	19°02'58.8"	99°58'50.9"	2041	CO4
5	19°02'61.3"	99°58'49.9"	2053	CO5

---



---

**Huerta: Temascaltepec sin manejo agronómico**

Árboles elegidos: 6

---

1	19°02'65.6"	99°58'53.0"	2059	S1
2	19°02'60.3"	99°58'83.0"	2053	S2
3	19°02'60.6"	99°58'84.6"	2053	S3
4	19°02'65.3"	99°58'84.7"	2057	S4
5	19°02'70.3"	99°58'83.6"	2066	S5
6	19°02'70.0"	99°58'81.9"	2066	S6

---