

VARIACIÓN DE LA REGIÓN RIBOSÓMICA NUCLEAR EN *Crataegus* L. DEL CENTRO Y SUR DE MÉXICO¹

Carlos Alberto Núñez-Colín², Ernestina Valadez-Moctezuma³, Alejandro Facundo Barrientos-Priego³,
Fernando González-Andrés⁴, Raúl Nieto-Ángel³

RESUMEN

Variación de la región ribosómica nuclear en *Crataegus* L. del centro y sur de México. Este estudio fue realizado en la Universidad Autónoma Chapingo y concluido en octubre de 2008 y tuvo como objetivo determinar las relaciones genéticas entre especies de *Crataegus* del centro y sur de México. La variación en las secuencias de la región ribosómica nuclear fue baja en todas las accesiones de germoplasma de *Crataegus* mexicanos, y el filograma sólo mostró separación de las especies usadas como controles positivos, pero no mostró una clara separación de grupos de especies. Sin embargo, todas las accesiones tuvieron un mismo patrón de sustitución de nucleótidos y muy bajos valores en la distancia de composición de nucleótidos; por lo que las especies mexicanas de *Crataegus* mostraron alta relación genética, pero falta evidencia para concluir que son variantes de una misma especie taxonómica. *C. nelsoni* y *C. stipulosa* pueden ser una fuente de genes para *C. mexicana* porque ambas especies, originarias de Chiapas, tienen la más estrecha relación con esta especie, que es la que presenta las mejores características agronómicas.

Palabras clave: ITS-1, ITS-2 y 5.8S rDNA, secuenciación de ADN, Tejocote, Rosaceae Sub-tribu *Pyrinae*.

ABSTRACT

Variation of the nuclear ribosomal region in *Crataegus* L. from central and southern Mexico. This study was conducted at the Universidad Autónoma de Chapingo and concluded in October 2008, to determine the genetic relationships among species of *Crataegus* from central and southern Mexico. The variation in the sequences of the nuclear ribosomal region was low in all accessions of germplasm of Mexican *Crataegus*, and the phylogram only showed separation of the species used as positive controls, but did not show a clear separation of groups of species. However, all accessions had the same pattern of nucleotide substitution and very low values of the distance of nucleotide composition; thus, Mexican *Crataegus* species have high genetic relationship among them, but there is a lack of evidence to conclude that they are variants of the same taxonomic species. *C. nelsoni* and *C. stipulosa* could be a source of genes for *C. mexicana* because both species, from Chiapas, have the closest relationship with this species, which has the best agronomic characteristics.

Key words: ITS-1, ITS-2 and 5.8S rDNA, DNA sequencing, Tejocote, Rosaceae Sub-tribe *Pyrinae*.



¹ Recibido: 5 agosto, 2010. Aceptado: 16 de mayo, 2011. Parte de los resultados del proyecto número 53 de la Red de Frutales del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos. SINAREFI, México.

² Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 6.5 Carretera Celaya – San Miguel de Allende. Apartado Postal 112. Celaya, 38010, Guanajuato, México. lit007a@gmail.com

³ Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México – Texcoco, Chapingo, 56230, Estado de México, México. Autor para correspondencia: nestty56@yahoo.com.mx

⁴ Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, E. S. T. Ingeniería Agraria, Universidad de León. Av. Portugal 41, León, 24071, Castilla y León, España.

INTRODUCCIÓN

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae subtribu *Pyrinae* (Campbell *et al.* 2007). Está constituido por aproximadamente 140 especies a nivel mundial divididas en cuarenta series, de las cuales dos terceras partes se encuentran en Norteamérica y el resto en Europa y Asia (Phipps *et al.* 2003).

Crataegus L. es el más grande y taxonómicamente complejo de los géneros de plantas arbóreas de Norteamérica (Phipps *et al.* 2003). La taxonomía de este género en México no es clara debido a que sólo se han propuesto dos tratados botánicos al respecto. El primero fue hecho a principios del siglo veinte por Eggleston (1909), y el más reciente, que sólo incluye el norte y algunas regiones del centro de México, fue propuesto por J. B. Phipps (1997). No existe una clasificación completa de este género en México, ya que falta colecta e identificación principalmente para los estados de Morelos, Guerrero, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Núñez-Colín 2008).

Se ha reportado que en el centro y sur de México fueron encontrados un complejo de especies relacionadas con *C. mexicana* DC (*C. mexicana sensu lato*), incluyendo especies pertenecientes a la serie *Mexicanae* (Loud.) Rehder (Phipps 1997), como lo son *C. stipulosa* (Kunth) Steud descrita por Eggleston con ese nombre y *C. nelsoni* Eggl. (Phipps *et al.* 1990), aunque se incluye también a *C. gracilior* Phipps perteneciente a la serie *Crus-galli* (Loud.) Rehder.

Núñez-Colín *et al.* (2008) demostraron que genotipos originarios de Chiapas, que fueron identificados principalmente como *C. stipulosa* (Kunth) Steud. y *C. nelsoni* Eggl. usando las claves de Eggleston (1909), fueron morfológicamente diferentes a los genotipos del centro de México, que fueron identificados principalmente como *C. mexicana* DC y *C. gracilior* Phipps mediante las claves de Phipps (1997).

Recientemente, usando marcadores moleculares se trató de clarificar la complicada taxonomía del género *Crataegus* (Lo *et al.* 2007), pero en su estudio incluyeron muy pocas especies mexicanas. En este sentido, el ejemplar de *C. mexicana* DC utilizado en el estudio de Lo *et al.* (2007) fue obtenido de un genotipo propagado en Estados Unidos que puede no ser representativo de los genotipos de esta especie mexicana.

Por otro lado, los beneficios económicos actuales obtenidos de la mejora de la producción, calidad de los cultivos y la reducción del riesgo de la pérdida de las cosechas es muy importante; en este sentido, los silvestres

relativos, como ancestros de los cultivos modernos, proveen genes útiles a los cultivos de importancia mundial en programas de mejoramiento genético (Zagaja 1988). En el caso específico del tejocote (*Crataegus* spp.) es un cultivo sin mejoramiento genético formal (Núñez-Colín *et al.* 2009); sin embargo, ha venido adquiriendo una alta relevancia comercial entre la población latina de los Estados Unidos (Karp 2010) por lo que siguiendo un mejoramiento genético formal pueden mejorarse la calidad nutrimental del fruto y hacerlo más atractivo y competitivo no sólo en Estados Unidos sino en México y Centroamérica donde también es cultivado y consumido (Núñez-Colín 2009, Núñez-Colín *et al.* 2008)

La presente investigación tuvo como objetivo determinar las relaciones genéticas entre especies de *Crataegus* del centro y sur de México y para verificar el postulado de que el complejo *C. mexicana sensu lato* es abundante en el centro y sur de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del ensayo

Se trabajó en el laboratorio de marcadores moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo entre enero de 2006 y octubre de 2008.

Material vegetal

Se usó el ADN de 21 accesiones del banco de germoplasma de tejocote (*Crataegus* spp.) de la Universidad Autónoma Chapingo y que fueron identificadas como seis diferentes especies (Cuadro 1). Una de ellas fue identificada como *C. pinnatifida* Bunge (de origen Chino), la cual fue donada por el Dr. Leszek S. Jankiewicz del Research Institute of Pomology, Skierniewice, Polonia. Además se incluyeron accesiones mexicanas de *C. mexicana* DC (4), *C. gracilior* Phipps (4), *C. stipulosa* (Kunth) Steud. (6), *C. nelsoni* Eggl. (3) y tres accesiones que no pudieron ser identificadas (dos de Chiapas y una de Puebla y que basados en los comentarios del Dr. J. B. Phipps⁵ pudieran ser nuevas especies) y también se incluyó ADN de manzana 'ro-

⁵ Phipps, JB. 2009. Identificación de Ejemplares de Herbario de *Crataegus* mexicanos. London, Canadá. University of West Ontario. Comunicación personal.

Cuadro 1. Datos de pasaporte de accesiones de *Crataegus* del Banco de germoplasma de Tejocote (*Crataegus* spp.) de la Universidad Autónoma Chapingo colectados en el 2007 y la manzana ‘royal gala’ (*Malus x domestica* Borkh.) usada como control positivo. México. 2008.

Número de accesión	Código	Lugar de recolección	Identidad taxonómica	Colector y año de la colecta original
5	RNU05	Rancho Nuevo, Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	Borys, 1982
11	HUE13	Huejotzingo, Puebla	<i>C. mexicana</i>	Nieto, 1989
17	RNU07	Rancho Nuevo, Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	Borys, 1982
25	CALP6	Calpan, Puebla	<i>C. sp. *</i>	Nieto y Borys, 1983
26	CALP3	Calpan, Puebla	<i>C. gracilior</i>	Nieto y Borys, 1983
34	SNTP2	San Nicolás Tlaminas, Mexico	<i>C. gracilior</i>	Nieto y Borys, 1982
36	SPI03	San Pablo Ixayoc, Mexico	<i>C. mexicana</i>	Nieto y Borys, 1982
54	HUE05	Huejotzingo, Puebla	<i>C. mexicana</i>	Nieto y Borys, 1983
55	HUE06	Huejotzingo, Puebla	<i>C. gracilior</i>	Nieto y Borys, 1983
59	CAN02	Candelaria, Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	Nieto y Barrientos, 1989
70	CAN06	Candelaria, Chiapas	<i>C. nelsoni</i>	Nieto y Barrientos, 1989
71	SJY01	San José Yashitinin, Chiapas	<i>C. sp. *</i>	Nieto y Barrientos, 1989
72	SJY02	San José Yashitinin, Chiapas	<i>C. sp. *</i>	Nieto y Barrientos, 1989
81	SCC07	San Cristóbal de las Casas, Chiapas	<i>C. nelsoni</i>	Nieto y Barrientos, 1989
82	SCC08	San Cristóbal de las Casas, Chiapas	<i>C. nelsoni</i>	Nieto y Barrientos, 1989
83	SCC09	San Cristóbal de las Casas, Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	Nieto y Barrientos, 1989
86	HUE10	Huejotzingo, Puebla	<i>C. mexicana</i>	Nieto y Barrientos, 1988
88	SCC12	San Cristóbal de las Casas, Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	Nieto y Barrientos, 1989
89	SCC13	San Cristóbal de las Casas, Chiapas	<i>C. stipulosa</i>	Nieto y Barrientos, 1989
91	XAM02	Xamimilulco, Puebla	<i>C. gracilior</i>	Nieto y Barrientos, 1988
CP	CP	Polonia (Donación)	<i>C. pinnatifida</i>	Jankiewicz, 2000
MZ		Toluca, México	<i>M. x domestica</i>	Núñez-Colín, 2007

* Estas accesiones no pudieron ser identificadas mediante las claves de Phipps (1997) ni las de Eggleston (1909).

yal gala’ (*Malus x domestica* Borkh.) como control positivo.

Procedimientos de extracción de ADN, PCR y Secuenciación

Se extrajo ADN genómico total de hojas jóvenes deshidratadas con sílica gel con base en el protocolo de CTAB propuesto por Weising *et al.* (2005). Se usaron los iniciadores ITS4 e ITS5 para amplificar la región ribosómica nuclear, que comprende el ITS1, el gen 5.8S rDNA y el ITS 2 (White *et al.* 1990); la decisión sobre utilizar ITS y no otros genes conservados fue

debido a que se ha demostrado que esta secuencia nuclear es una de las más útiles para hacer filogenia en la subtribu *Pyrinae* (Campbell *et al.* 2007) así como del género *Crataegus* (Lo *et al.* 2007). Además, se utilizó la mezcla de reacción de PCR y las condiciones de termociclaje propuestas por Lo *et al.* (2007).

Los productos de PCR fueron visualizados en gels de agarosa (1%) y purificados con filtros de sílice y diferentes soluciones comerciales de alcoholes y sales. Después, estos productos fueron secuenciados en Seúl, Corea por la empresa Macrogen, y las secuencias fueron leídas y analizadas en ambos sentidos (5’ y 3’) con el programa BioEdit version 7.0.5.3 (Hall 1999).

Análisis estadísticos

Se realizaron para todas las secuencias un alineamiento múltiple usando el modelo Clustal X. Una vez alineadas se obtuvieron las frecuencias de nucleótidos para cada accesión. Se obtuvo una clasificación filogenética utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987); el filograma obtenido fue validado utilizando el método Bootstrap con 1000 remuestrados (Efron 1979).

Se obtuvo la prueba de homogeneidad de los patrones de sustitución entre secuencias y el índice de disparidad por medio de la distancia de composición. La prueba de homogeneidad de los patrones de sustitución entre las secuencias es un índice de disparidad (una distancia genética), que es evaluada por medio de una prueba de hipótesis para conocer si las secuencias evaluadas tienen un mismo patrón de sustitución. Si la hipótesis no es rechazada, entonces esas dos secuencias tienen el mismo patrón aunque puede existir un cierto grado de diferencias o sesgo en la composición de bases (Tamura *et al.* 2007a, Tamura *et al.* 2007b). La distancia de composición es una medida para conocer las diferencias en la composición de nucleótidos entre dos diferentes secuencias (Tamura *et al.* 2007a). Todos los análisis fueron realizados usando el programa Mega 4 (Tamura *et al.* 2007a).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de los diferentes nucleótidos fueron similares en todas las accesiones, especialmente en Guanina (G) y Adenina (A), pero existió un cambio en la frecuencia de Timina (T) y Citosina (C) entre los *Crataegus* mexicanos, el *Crataegus* chino y aún más significativamente fue esta variación con la manzana. Sin embargo, todas las accesiones mexicanas presentaron el mismo patrón (Cuadro 2).

C. pinnatifida Bunge presentó una secuencia con dos bases menos que los *Crataegus* mexicanos y la manzana presentó 28 bases menos que las accesiones mexicanas de *Crataegus* (Cuadro 2).

En el filograma se observa que todos los *Crataegus* mexicanos estuvieron estrechamente relacionados, este grupo se unió a *C. pinnatifida* y la manzana mostró una mayor distancia al grupo de los *Crataegus* (Figura 1). Sin embargo, las accesiones mexicanas de

Cuadro 2. Frecuencias de nucleótidos de las secuencias de la región ribosómica nuclear de 20 accesiones mexicanas de *Crataegus*, una accesión de *C. pinnatifida* Bunge y una accesión de manzana (*Malus x domestica* Borkh.) de DNA extraído en el laboratorio del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México, de enero de 2007 a septiembre del 2008.

Número de accesión	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	Nucleótidos totales
5	16,1	34,2	18,1	31,6	652
11	16,1	34,2	18,1	31,6	652
54	16,1	34,2	18,1	31,6	652
86	16,1	34,4	18,1	31,4	652
17	16,1	34,4	18,1	31,4	652
89	16	34,5	18,1	31,4	652
88	16,1	34,4	18,1	31,4	652
34	16	34,5	18,1	31,4	652
59	16	34,5	18,1	31,4	652
72	16	34,4	18,1	31,5	652
71	16	34,4	18,1	31,5	652
36	16,1	34,2	18,1	31,6	652
55	16,1	34,2	18,1	31,6	652
25	16,1	34,4	18,1	31,4	652
70	16	34,5	18,1	31,4	652
81	16	34,5	18,1	31,4	652
26	16	34,5	18,2	31,3	652
82	16,3	34,2	17,9	31,6	652
91	16,1	34,5	18,1	31,3	652
83	16,3	34,2	17,9	31,6	652
CP	17,1	33,7	17,8	31,4	650
MZ	19,5	31,3	17,6	31,6	624
Promedio	16,3	34,2	18,1	31,5	650,6

Crataegus no tuvieron una estructura taxonómica entre las especies identificadas debido a que solamente se encontraron diferencias mínimas entre sus secuencias.

La manzana presentó un patrón de sustitución estadísticamente diferente con todas las accesiones de *Crataegus* (Cuadro 3) en la prueba de homogeneidad de los patrones de sustitución. Por otra parte, todos los patrones de sustitución de las accesiones de *Crataegus*

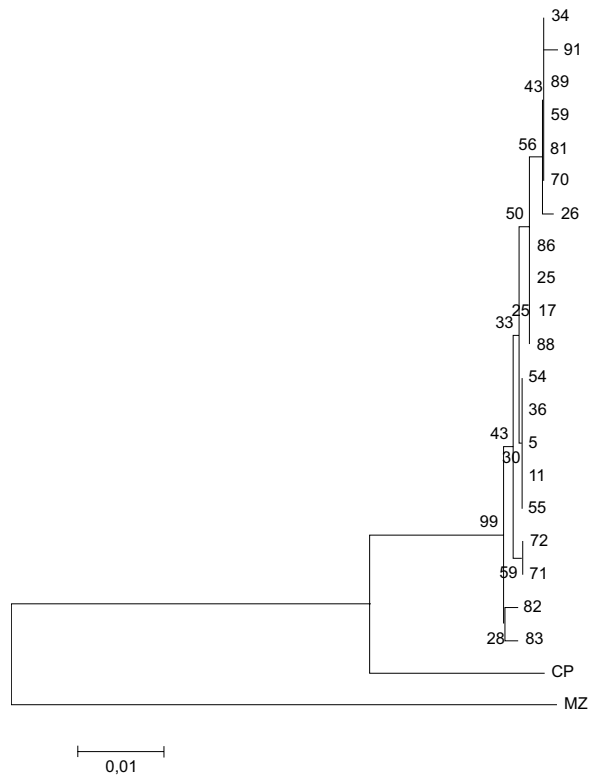


Figura 1. Filograma de 20 accesiones mexicanas de *Crataegus*, una accesión de *C. pinnatifida* Bunge y una accesión de manzana 'royal gala' (*Malus x domestica* Borkh.) mediante las secuencias de la región ribosómica nuclear con base en el método Neighbor-Joining y validado mediante el método Bootstrap con 1000 remuestros de DNA extraído en el laboratorio del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México de enero de 2007 a septiembre del 2008.

en la región ribosómica nuclear fueron similares, aunque *C. pinnatifida* presentó un alto valor en el índice de disparidad al compararlo con la mayoría de los *Crataegus* mexicanos, con excepción de las accesiones 82 y 83 identificadas como *C. nelsoni* Eggl. y *C. stipulosa* (Kunth) Steud., respectivamente. Ambas accesiones originarias de San Cristóbal de la Casas, Chiapas tuvieron un patrón de sustitución idéntico entre ellas (Cuadro 3).

Todas las accesiones mexicanas mostraron valores bajos en el índice de disparidad entre ellos (0,0000

y 0,0048), las mexicanas de *Crataegus* tuvieron patrones de sustitución idénticos en la región ribosómica nuclear o pudieran tener variaciones mínimas entre sus patrones (Cuadro 3).

La manzana tuvo los más altos valores en la distancia de composición en comparación con todos los *Crataegus*; lo que significa que la manzana presentó la mayor diferencia en la secuencia de la región ribosómica nuclear entre todas las accesiones estudiadas (Cuadro 4).

C. pinnatifida mostró altos valores en la distancia de composición con todas las accesiones mexicanas debido a que el máximo valor ellas fue de 0,0128, obtenido entre las 82 y 83 con la accesión 26, más bajo que cualquier valor entre *C. pinnatifida* con cualquiera de las mexicanas (Cuadro 4).

Dentro de las accesiones mexicanas, las identificadas como *C. stipulosa* presentaron valores de distancia de cero como mínimo, con accesiones identificadas como otras especies. Esto da como resultado que se tengan secuencias idénticas entre algunas de *C. stipulosa* y de otras especies (Cuadro 5).

C. gracilior fue la única especie que no mostró secuencias idénticas entre accesiones identificadas como esta; sin embargo, algunas accesiones de *C. gracilior* presentaron secuencias idénticas con accesiones de *C. mexicana*, *C. stipulosa* y *C. nelsoni* (Cuadro 5).

C. mexicana mostró la distancia promedio más baja entre sus accesiones de todas las especies en estudio, aunque también presentó un alto coeficiente de variación, esto es porque sólo una accesión tuvo una diferente secuencia en la región ribosómica nuclear (Cuadro 5).

Accesiones de *C. nelsoni* presentaron secuencias idénticas con los de otras especies excepto con las accesiones no identificadas de *Crataegus* (Cuadro 5). Además, presentó el más alto valor promedio entre sus accesiones en todas las especies mexicanas.

Las accesiones de especies no identificadas (*C. sp.*) mostraron la misma secuencia entre sus accesiones de Chiapas y tuvieron unos pocos cambios con la de Puebla, pero sólo mostraron diferencias con todas las otras especies excepto con *C. stipulosa*. Además, presentaron el segundo más bajo valor promedio entre sus accesiones después de *C. mexicana*.

Se encontró una muy alta similaridad en las secuencias de la región ribosómica nuclear entre los

Cuadro 3. Prueba de homogeneidad de patrones de sustitución de nucleótidos entre secuencias de la región ribosómica nuclear de 20 accesiones mexicanas de *Crataegus*, una accesión de *C. pinnatifida* Bunge y una accesión de manzana 'royal gala' (*Malus x domestica* Borkh.); de DNA extraído en el laboratorio del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México, de enero de 2007 a septiembre del 2008; sobre la diagonal principal está el índice de disparidad y bajo la misma los valores de probabilidad de la prueba de hipótesis.

Accesión	5	11	54	86	17	89	88	34	59	72	71	36	55	25	70	81	26	82	91	83	CP	MZ
5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0032	0,0000	0,0016	0,0000	0,0064	0,6292
11	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0032	0,0000	0,0016	0,0000	0,0064	0,6292
54	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0032	0,0000	0,0016	0,0000	0,0064	0,6292
86	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064	0,6661
17	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064	0,6661
89	0,4490	0,4420	0,4510	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0225	0,7368
88	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064	0,6661
34	0,4050	0,4430	0,4260	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0225	0,7368
59	0,4140	0,4400	0,4490	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0225	0,7368
72	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0241	0,7014
71	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0241	0,7014
36	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4250	1,0000	0,4220	0,4300	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0032	0,0000	0,0016	0,0000	0,0064	0,6292
55	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4220	1,0000	0,4660	0,4260	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0032	0,0000	0,0016	0,0000	0,0064	0,6292
25	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064	0,6661
70	0,4210	0,4060	0,4280	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4480	0,4360	1,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0225	0,7368
81	0,4040	0,4240	0,4040	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4310	0,4360	1,0000	1,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0225	0,7368
26	0,2420	0,2520	0,2560	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2540	0,2570	1,0000	1,0000	0,0000	0,0048	0,0000	0,0048	0,0225	0,7432
82	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3350	1,0000	0,3570	0,3490	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3620	0,3250	0,1730	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5955
91	0,3120	0,3240	0,3270	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3060	0,3150	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0080	0,7014
83	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3680	1,0000	0,3360	0,3270	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3560	0,3550	0,2080	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,5955
CP	0,3310	0,3120	0,3630	0,2890	0,2920	0,1950	0,3120	0,2150	0,2080	0,1790	0,1780	0,3540	0,3190	0,3230	0,1930	0,2060	0,1960	1,0000	0,3220	1,0000	0,0000	0,3596
MZ	0,0010	0,0000	0,0010	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0010	0,0000	0,0020	

Cuadro 4. Distancia de composición entre las secuencias de la región ribosómica nuclear de 20 accesiones mexicanas de *Crataegus*, una accesión de *C. pinnatifida* Bunge y una accesión de manzana 'royal gala' (*Malus x domestica* Borkh.) de DNA extraído en el laboratorio del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México, de enero de 2007 a septiembre del 2008.

Accesión	5	11	54	86	17	89	88	34	59	72	71	36	55	25	70	81	26	82	91	83	CP	
11	0,0000																					
54	0,0000	0,0000																				
86	0,0016	0,0016	0,0016																			
17	0,0016	0,0016	0,0016	0,0000																		
89	0,0048	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016																	
88	0,0016	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0016																
34	0,0048	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016	0,0000	0,0016															
59	0,0048	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016	0,0000	0,0016	0,0000														
72	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016													
71	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0000												
36	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0048	0,0016	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016											
55	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0048	0,0016	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016	0,0000										
25	0,0016	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016									
70	0,0048	0,0048	0,0048	0,0016	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0048	0,0048	0,0016								
81	0,0048	0,0048	0,0048	0,0016	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0016	0,0016	0,0048	0,0048	0,0016	0,0000							
26	0,0080	0,0080	0,0080	0,0032	0,0032	0,0016	0,0032	0,0016	0,0016	0,0048	0,0048	0,0080	0,0080	0,0032	0,0016	0,0016						
82	0,0016	0,0016	0,0016	0,0032	0,0032	0,0080	0,0032	0,0080	0,0080	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016	0,0032	0,0080	0,0080	0,0128					
91	0,0064	0,0064	0,0064	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0048	0,0048	0,0064	0,0064	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0080				
83	0,0016	0,0016	0,0016	0,0032	0,0032	0,0080	0,0032	0,0080	0,0080	0,0048	0,0048	0,0016	0,0016	0,0032	0,0080	0,0080	0,0128	0,0000	0,0080			
CP	0,0433	0,0433	0,0433	0,0449	0,0449	0,0626	0,0449	0,0626	0,0626	0,0594	0,0594	0,0433	0,0433	0,0449	0,0626	0,0610	0,0353	0,0498	0,0353			
MZ	0,7432	0,7432	0,7432	0,7785	0,7785	0,8507	0,7785	0,8507	0,8507	0,8138	0,8138	0,7432	0,7432	0,7785	0,8507	0,8555	0,7079	0,8170	0,7079	0,4735		

Cuadro 5. Valores máximos, mínimos, medios y coeficiente de variación de la distancia de composición de las secuencias de la región ribosómica nuclear de 20 accesiones mexicanas de *Crataegus* pertenecientes a cinco diferentes especies de DNA extraído en el laboratorio del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México, de enero de 2007 a septiembre del 2008..

Especie	<i>C. mexicana</i>			<i>C. graciflor</i>			<i>C. stipulosa</i>			<i>C. nelsoni</i>			<i>C. sp</i>							
	min.	máx.	media	cv	min.	máx.	media	cv	min.	máx.	media	cv	min.	máx.	media	cv				
<i>C. mexicana</i>	0,0000	0,0016	0,0008	1,1250	0,0000	0,0080	0,0041	0,7317	0,0000	0,0048	0,0020	1,0000	0,0000	0,0016	0,0015	0,3333	0,0016	0,0048	0,0033	0,6061
<i>C. graciflor</i>	0,0000	0,0080	0,0041	0,7317	0,0016	0,0080	0,0040	0,7000	0,0000	0,1280	0,0034	0,8824	0,0000	0,0128	0,0039	1,0256	0,0016	0,0048	0,0028	0,7143
<i>C. stipulosa</i>	0,0000	0,0048	0,0020	1,0000	0,0000	0,1280	0,0034	0,8824	0,0000	0,0080	0,0030	0,8667	0,0000	0,0080	0,0031	1,0000	0,0000	0,0048	0,0019	0,6842
<i>C. nelsoni</i>	0,0000	0,0016	0,0015	0,3333	0,0000	0,0128	0,0039	1,0256	0,0000	0,0080	0,0031	1,0000	0,0000	0,0080	0,0053	0,9434	0,0016	0,0048	0,0025	0,5600
<i>C. sp</i>	0,0016	0,0048	0,0033	0,6061	0,0016	0,0048	0,0028	0,7143	0,0000	0,0048	0,0019	0,6842	0,0016	0,0048	0,0025	0,5600	0,0000	0,0016	0,0011	0,8182

Crataegus mexicanos aquí estudiados, lo que significa que se encuentran genéticamente relacionados; sin embargo, Núñez-Colín *et al.* (2008) demostraron que accesiones de Chiapas (sur de México) son morfológicamente diferentes en comparación con las del centro de México; por lo que pueden considerarse especies relacionadas pero diferentes. Estos hallazgos corroboran el postulado de Phipps (1997) sobre que los materiales del centro y sur de México pertenecen a un complejo taxonómico alrededor de *C. mexicana sensu lato*.

Por otro lado, Phipps *et al.* (1990) clasificaron, a *C. nelsoni* y *C. stipulosa* dentro de la serie *Mexicanae* (Loud.) Rehder, pero es necesario revisar la clasificación taxonómica para los *Crataegus* del sur de México y considerar que algunas de las accesiones de Chiapas puedan ser reclasificadas como nuevas especies debido a que se pueden tener errores de clasificación por utilizar las claves taxonómicas de Eggleston (1909). Es por esto que existe la duda sobre si los especímenes de *Crataegus* de Chiapas realmente pertenecen a la serie *Maexicanae* o que puedan pertenecer a series relacionadas como la Serie *Crus-galli* (Loud.) Rehder.

En esta investigación no es claro si *C. gracilior* pertenece a la serie *Crus-galli* debido a que estas accesiones mostraron similitud en la secuencia de la región ribosómica nuclear con otras accesiones que se menciona, por la especie que se identificó, que pertenecen a la Serie *Mexicanae* (Phipps *et al.* 1990). Phipps (1997) demostró usando morfología que *C. gracilior* pertenece a la serie *Crus-galli* pero no se encontraron las diferencias esperadas en esta investigación.

Debido a que las accesiones mexicanas de *Crataegus* se distribuyeron de manera aleatoria dentro del filograma no pudo observarse grupos por cada una de las especies; además, dichas accesiones presentaron el mismo patrón de sustitución de nucleótidos y valores bajos de la distancia de composición. Esto puede ser interpretado como que todas las accesiones de *Crataegus* del centro y sur de México están estrechamente relacionadas y pudieron ser originadas por un ancestro en común reciente (Saitou y Nei 1987, Kumar y Gadagkar 2001, Tamura *et al.* 2007b), o bien puede tratarse de variantes de una misma especie, pero para corroborar esta afirmación deben probarse con otras secuencias de genes filogenéticos como las regiones intragénicas de ADN de cloroplasto, el segundo intron del gen LEAFY, etc. (Lo *et al.* 2007).

Estos resultados no sólo son importantes desde el punto de vista taxonómico, sino que también pueden ser utilizados en gestión de los recursos genéticos de este género. Por ejemplo, si los datos de Talent y Dickinson (2005) pudieran ser generalizados sobre que *C. mexicana* y *C. stipulosa* son diploides y poder probar el nivel de ploidía de *C. nelsoni*; estas especies de Chiapas pueden ser una fuente de genes para programas de mejoramiento genético de *C. mexicana* que es la especie más cultivada y usada en México, además de que tiene el mejor potencial agronómico (Zagaja 1988, Büttner 2001, Núñez-Colín *et al.* 2009, Karp 2010). Algunos especímenes de *C. stipulosa* y *C. nelsoni* del Banco de Germoplasma de Tejocote de la Universidad Autónoma Chapingo presentan características deseables en cuanto a color de pulpa y de cáscara, así como en compuestos fenólicos y otras sustancias que serían deseables incorporar a los tejocotes cultivados (Núñez-Colín *et al.* 2007, Núñez-Colín 2009) y que en esta investigación dichas especies mostraron una alta similitud genética con la cultivada.

Puede concluirse que la variación en las secuencias de la región ribosómica nuclear fue baja en todas las accesiones del germoplasma mexicano de *Crataegus*. Además, en el filograma sólo se muestra la separación de las especies utilizadas como controles positivos por lo que no se observaron grupos de especies de manera clara.

Además, todas las accesiones mexicanas de *Crataegus* tienen el mismo patrón de sustitución de nucleótidos y muy bajos valores de la distancia de composición de nucleótidos; por lo tanto, las especies de *Crataegus* mexicanas tienen una alta relación genética entre ellas, pero falta evidencia sobre si se trata de variantes de una misma especie taxonómica, por lo que se podría considerar que todos los *Crataegus* del centro y sur de México son un complejo taxonómico alrededor de *C. mexicana sensu lato*, aunque hay que secuenciar otros genes filogenéticos para corroborarla.

C. nelsoni y *C. stipulosa* pueden ser estimados como una fuente de genes para *C. mexicana*, que es la especie que presenta las mejores características agronómicas, porque ambas especies de Chiapas son las más estrechamente relacionadas con esta especie cultivada.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por medio de la beca número 169581 y por el Servicio Nacional de Identificación y Certificación de Semillas (SNICS) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por medio del proyecto número 53 del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos-Red Frutales del último autor.

LITERATURA CITADA

- Büttner, R. 2001. Rosaceae. In P. Hanelt; Institute of Plant Genetics and Crop Plant research eds. Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops: except ornamentals. Springer, Berlin-Heidelberg-New York. p. 417-532.
- Campbell, CS; Evans, RC; Morgan, DR; Dickinson, TA; Arsenault, MP. 2007. Phylogeny of subtribe *Pyrinae* (formely the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Systematics and Evolution* 266:119-145.
- Efron, B. 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The Annals of Statistics* 7:1-26.
- Eggleston, WW. 1909. The *Crataegi* of Mexico and Central America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 36: 501-514.
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Karp, D. 2010. Tejocote: No longer forbidden. *Fruit Gardener* 42(6):10-13.
- Kumar, S; Gadagkar, SR. 2001. Disparity index: A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* 158:1321-1327.
- Lo, EYY; Stefanovic, S; Dickinson, TA. 2007. Molecular reappraisal of relationships between *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Pyreae) – Two genera or one? *Systematic Botany* 32(3):596-616.
- Núñez-Colín, CA. 2008. Variabilidad inter e intra específica del germoplasma de tejocote (*Crataegus* spp.) del centro y sur de México. Ph D. Thesis. Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Mexico. 120 p.
- Núñez-Colín, CA. 2009. The tejocote (*Crataegus* spp.): A Mexican plant genetic resource that is wasted, a review. *Acta Horticulturae* 806:339-346.
- Núñez-Colín, CA; García-Mateos, R; Nieto-Ángel, R; Soto-Hernández, M. 2007. Caracterización de genotipos de *Crataegus* en relación al contenido de compuestos fenólicos. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 51:124-127.
- Núñez-Colín, CA; Nieto-Ángel, R; Barrientos-Priego, AF; Sahagún-Castellanos, J; Segura, S; González-Andrés, F. 2008. Variability of three regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55(8):1159-1165.
- Núñez-Colín, CA; Sahagún-Castellanos, J; González-Andrés, F; Barrientos-Priego, AF; Segura, S; Nieto-Ángel, R. 2009. Identification of morphometric traits for screening of tejocote (*Crataegus* spp.) germplasm for better yield potential. *Fruits* 64:35-44.
- Phipps, JB. 1997. Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae subfam. Maloideae). *SIDA Botanical Miscellany* 15:1-94.
- Phipps, JB; O'Kennon, RJ; Lance, RW. 2003. Hawthorns and Medlars. Timber Press, Portland, USA. 139 p.
- Phipps, JB; Robertson, KR; Smith, PG; Rohrer, JR. 1990. A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany* 68:2209-2269.
- Saitou, N; Nei, M. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.
- Talent, N; Dickinson, TA. 2005. Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inference from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Canadian Journal of Botany* 83:1268-1304.
- Tamura, K; Dudley, J; Nei, M; Kumar, S. 2007a. MEGA. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 4. User's Guide. Center of Evolutionary Functional Genomics, Biodesign Institute, Arizona State University. Tempe, USA. 229 p.
- Tamura, K; Dudley, J; Nei, M; Kumar, S. 2007b. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8):1596-1599
- Weising, K; Nybon, H; Wolf, K; Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications. 2 ed. CRC Press, Boca Raton, USA. 472 p.
- White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for

phylogenies. *In* Innis, M; Gelfand, D; Sninsky, J; White T. eds. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA. p. 315-322.

Zagaja, SW. 1988. Exploración de recursos genéticos. *In* Moore, JN; Janick, J. eds. Métodos genotécnicos en frutales, AGT Editor, Mexico City, Mexico. p. 3-12.