



Variabilidad Genética en *Pouteria lucuma* mediante marcadores ISSR

Genetic variability in *Pouteria lucuma* using ISSR markers

Carlos Helí Quijano Jara*; Zulita Adriana Prieto Lara

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

*Autor correspondiente: cquijano@unitru.edu.pe (C. Quijano).

ID ORCID de los autores

C. Quijano:  <https://orcid.org/0000-0001-9269-9864>

Z. Prieto:  <https://orcid.org/0000-0002-9782-1782>

RESUMEN

La lúcuma es un frutal oriundo de Sudamérica, se produce en Colombia, Ecuador, norte de Chile y Perú, siendo los principales productores a nivel mundial con una participación de 88%. Sin embargo, existe escasa información de su base genética, los cuales son la base para posteriores evaluaciones agronómicas, mejoramiento genético, selección y reproducción de materiales con características deseables en un programa de fomento y diversificación de la producción agrícola. Razón por la cual se planteó llevar a cabo una caracterización genética de poblaciones de *Pouteria lucuma* "lucuma" procedentes del caserío de Naubamba en el Distrito de Usquil. Los resultados muestran ADN extraído de buena concentración y calidad, así como amplificación con todos los marcadores ISSR empleados y alto número de bandas polimórficas con una proporción de loci polimórficos altos por marcador.

Palabras clave: *Pouteria lucuma*; Variabilidad; ISSR; Naubamba.

ABSTRACT

Lucuma is a fruit tree native to South America, it is produced in Colombia, Ecuador, north-ern Chile, and Peru, being the main producers worldwide with an 88% participation. How-ever, there is little information on its genetic base, which is the basis for further agronomic evaluations, genetic improvement, selection and reproduction of materials with desirable characteristics in a program to promote and diversify agricultural production. Reason why it was proposed to carry out a genetic characterization of populations of *Pouteria lucuma* "lucuma" from the village of Naubamba in the District of Usquil. The results show DNA extracted from good concentration and quality, as well as amplification with all used ISSR markers and high number of polymorphic bands with a high polymorphic loci ratio per marker.

Keywords: *Pouteria lucuma*; variability; ISSR; Naubamba.

Recibido: 02-01-2020.

Aceptado: 15-02-2020.

INTRODUCCIÓN

La región andina, es uno de los mayores centros de domesticación de plantas, en concordancia con el desarrollo de civilizaciones que generaron una agricultura autóctona con la domesticación de un gran número de especies de plantas, siendo empleadas durante un tiempo prolongado hasta la llegada de los españoles y el consiguiente reemplazo de muchas de las especies nativas por especies importadas de Europa (Jacobsen, 2003).

Entre las diversas plantas domesticadas existen numerosas especies frutales, tales como la chirimoya (*Annona cherimola*), varias granadillas (*Passiflora spp.*), naranjilla (*Solanum quitoense*), paca (*Inga feuillei*), varias papayas de altura (*Vasconcella spp.*), pepino dulce (*Solanum muricatum*), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) y lúcuma (*Pouteria lucuma*) perteneciente a la familia Sapotaceae (Sanjinés, 2006).

En nuestro país la familia Sapotaceae presenta 10 géneros y 90 especies, todos árboles, considerando a *Pouteria* como el género más rico en especies (León, 2006). Dentro del género *Pouteria* tenemos a *Pouteria lucuma* "lúcuma", oriunda de los valles Interandinos de Ecuador, Chile y Perú, la cual crece entre 200 y 2800 msnm, desarrollándose bien en diversidad de suelos por lo que puede calificarse como rustica (Huamantupa, 2008).

Es cultivada en Colombia, Ecuador, norte de Chile y Perú, siendo los principales productores a nivel mundial con una participación de 88%. En el Perú, Lima concentra la producción a nivel nacional con 676 hectáreas cultivadas y 6711 toneladas producidas y en segundo lugar Ica con 166 hectáreas y una producción de 1906 toneladas y en tercer lugar La Libertad con 119 hectáreas y una producción de 944 toneladas, existiendo producción en otros departamentos en menor medida, según el plan nacional de cultivos 2018-2019.

La lúcuma tiene un fruto versátil que posee un sabor distintivo; siendo la pulpa utilizada en gran diversidad de postres, además, es un ingrediente frecuente de los batidos de leche. En Perú y Chile se la seca para obtener una harina que se utiliza para varios fines: refrescos, helados y dulce, además de ser una fuente de fibra, b - caroteno, compuestos fenólicos, vitaminas A, B₁, B₂, B₅, C y también minerales como el calcio, hierro y fósforo (León, 2000). Investigaciones a cargo del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) y la Asociación de Productores de Lúcuma (Prolúcuma) han llegado a identificar cuatro variedades de lúcuma de seda como las más apropiadas para el cultivo, tanto por su calidad como por su productividad. Estas variedades han venido sembrando en los departamentos de Lima, Ica y en la costa de La Libertad. En los otros departamentos se puede encontrar muchos cultivos silvestres, que crecen prácticamente solos, pero dan frutos de no muy buena calidad, mayormente de lúcuma de palo (Mostacero, 2002). Debido al valor potencial que representa este material genético se hace necesario estudiar la caracterización y conservación, ya que la caracterización in situ de especies nativas es el paso inicial para determinar características morfológicas y fenológicas que conforman la variabilidad genética. Dichos estudios son la base para posteriores evaluaciones agronómicas, mejoramiento genético, selección y reproducción de materiales con características deseables en un programa de fomento y diversificación de la producción agrícola (Álvarez, 2006; dos Santos *et al.*, 2016; Wu, 2019).

Según Utrera y Martínez (1994), la caracterización es la descripción de un carácter, es sinónimo de distinguir, a marcar, diferenciar, o separar en tipos, clases o categorías, siendo los caracteres morfológicos utilizados en la caracterización de poblaciones y en la descripción de cultivares para su inscripción. Sin embargo, en algunos casos estos no proveen una cuantificación adecuada de la variabilidad genética. En ese sentido, la caracterización genética se puede realizar a diferentes niveles, desde los marcadores cromosómicos (Arends, 1976; Majourhat, 2003); bioquímicos como las isoenzimas (Rodríguez, 1999; Becerra y Paredes, 2000), así como los marcadores basados en secuencias de ADN los cuales tienen la ventaja de no estar influenciadas por el ambiente, tal como los RAPDs (Random amplified polymorphic DNA) (Rolim, 2011; Puecher, 1998; Rodríguez-Rojas, 2012).

Otro marcador dominante es el ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), donde se usan cebadores compuestos de repeticiones de di, tri, tetra o penta-nucleótidos, que se hibrida a la región de microsátelites genómicos, razón por la cual no es necesario tener información del genoma; las secuencias diana de los cebadores ISSR son abundantes en todo el genoma eucariota y evolucionan rápidamente, conllevando a presentar gran cantidad de loci polimórficos que otros marcadores dominantes como RAPD (Ansari *et al.*, 2012; dos Santos *et al.*, 2016). En *Pouteria lucuma* "lúcuma", se han realizado diversos estudios, respecto a los metabolitos primarios y secundarios (Fuentealba, 2016), la presencia de flavonoides, así como su rendimiento de la harina de lúcuma (Lavado, 2012); sin embargo, no existe información respecto a caracterización genética a nivel de su variabilidad genética lo cual permite, determinar el comportamiento de la especie, el éxito reproductivo individual. Los datos moleculares mejoran o aún permiten la aclaración de la filogenia, y proporcionan el conocimiento básico para la taxonomía, la domesticación y la evolución de comprensión lo cual hace necesario llevar a cabo estudios de caracterización genética de *Pouteria lucuma* como un paso inicial, para plantear posteriores programas de mejoramiento genético, lo cual permitirá mejorar las características de este cultivo y por lo tanto la calidad de los productos a exportar; por lo cual se plantea como objetivo del presente trabajo determinar la variabilidad genética en muestras de *P. lucuma* procedentes del caserío de Naubamba del Distrito de Usquil mediante marcadores ISSR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Utilizando bolsas herméticas, se colectaron muestras hojas jóvenes de individuos de la especie *Pouteria lucuma* (Ruiz&Pav.) Kuntze, en el caserío Naubamba en el Distrito de Usquil - Otuzco, las

cuales fueron almacenadas a -40 °C hasta el momento en que fueron necesarias para ejecutar los protocolos de extracción de ADN en *Pouteria lucuma*. Se seleccionaron las hojas jóvenes, sin signos de marchitez, ni daño.

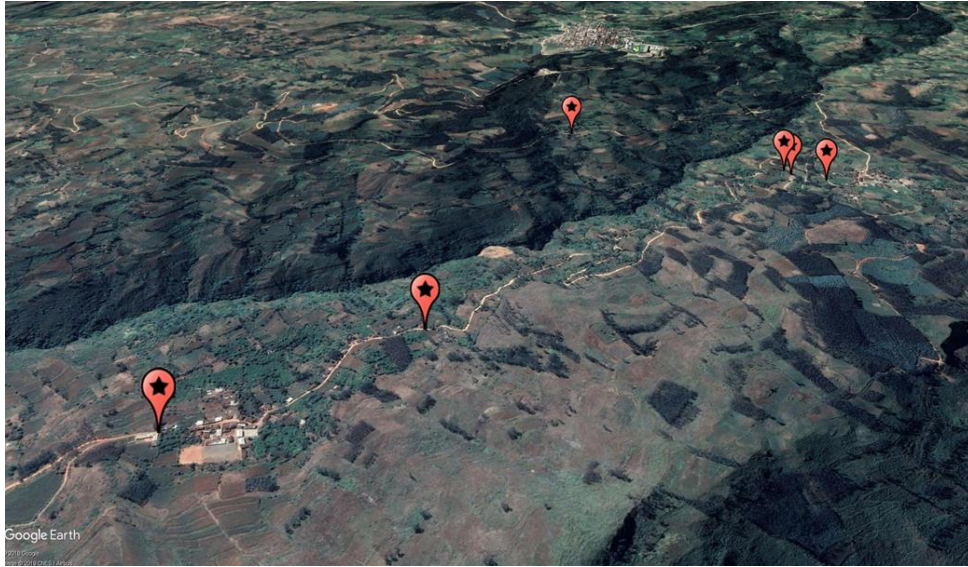


Figura 1. Mapa de la ubicación de puntos de colecta de muestras en el caserío de Naubamba en el Distrito de Usquil - Otuzco.

Protocolo de extracción de ADN

Se usaron las hojas previamente colectadas para obtener muestras de 100 mg (peso fresco). Se trituraron las hojas hasta un polvo fino con nitrógeno líquido en un mortero congelado y esterilizado. Después, el polvo se colocó en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y se añadió 500 µL de amortiguador de extracción de ADN (2% (w/v) CTAB (hexadeciltrimetil-amonio bromuro), 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 mM EDTA (ácido etilenediaminotetracético, sal disodio, dihidrato-Na₂); 1,4 M NaCl, 1% (w/v) polivinilpirrolidona (PVP) esta mezcla fue mantenida a 60 °C por 30 min en termostato. Cumplido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y después añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó mediante vortex por 5 segundos y posteriormente se centrifugó la muestra a 14 000 rpm por 1 minuto para separar las fases. La fase acuosa (superior) fue transferida a un nuevo tubo. Este procedimiento de extracción se repitió hasta que la fase superior es clara. A la fase acuosa se le agregó 0,7 volúmenes de Isopropanol helado incubándose a -20 °C durante 15 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga la muestra a 14 000 rpm por 10 minutos, se elimina el sobrenadante y se agrega 500 µl de etanol al 70% helado, posteriormente se elimina el etanol y se secó la muestra en un concentrador o a temperatura ambiente; finalmente se disolvió el pellet en 50 µl de buffer TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), en una congeladora a -20 °C hasta su utilización (Doyle y Doyle; 1990).

Determinación de la concentración de ADN

Para determinar la concentración y calidad de ADN, se procedió a medir las muestras, en un espectrofotómetro Nanodrop marca Thermo Scientific modelo OneC del laboratorio de servicios de la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación del Master Mix

En un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se preparó

un MasterMix (GoTaq® DNA Polymerase), mezclando todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR, posteriormente se repartió en tubos de PCR (Tubos de 0,1 ml estériles) 19,0 µl de la mezcla, finalmente se le agregó 1µl de ADN a cada tubo de PCR, luego se colocaron los tubos de PCR en el termociclador marca Applied Biosystem modelo Veriti de 0,1 ml.

Tabla 1

Master Mix para muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del caserío de Naubamba utilizando ISSR

Reactivo	1X	19.5X
Buffer 5x Sin Color	5 µl	78
dNTPs (10mM de	0,5 µl	7,8
MgCl 25mM	2,5 µl	39
Primer F	1 µl	19,5
Taq pol DNA	0,125 µl	1,95
Agua Ultrapura	13,88 µl	228,15
ADN	1 µl	
TOTAL	20 µl	390

Tabla 2

Condiciones de Amplificación para marcadores ISSR

ETAPA	Etapa	Tiempo	Temperatura
1 Ciclo inicial	Desnaturalización	5'	95°C
2 Ciclo (35 veces)	Desnaturalización	30"	94°C
	Hibridación	45"	50 - 52 °C
	Extensión	2'	72 °C
Extensión Final	Extensión final	7'	72 °C

Tabla 3

Nombre y secuencia de marcadores ISSR usados en la amplificación por PCR en muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del caserío de Naubamba

Primer ISSR	Secuencia de nucleotidos (5'- 3')
UBC M825	ACACACACACACACT
UBC M844	CTCTCTCTCTCTCTRC
UBC M849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
UBC M854	TCTCTCTCTCTCTCRG
UBC M856	ACACACACACACACYA

Electroforesis

Se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1%; se utilizaron 5 μ l de cada muestra de ADN, la cual se mezcló con 2 μ l de Fluorescent DNA Loading dye marca GeneON para posteriormente cargar la mezcla en el gel de agarosa y realizar el corrido electroforético durante 30 minutos a 100V, culminado el corrido electroforético se procedió a visualizar las bandas correspondientes a las muestras de

ADN en el fotodocumentador CHEMIDOC XRS de la marca Biorad (Sambrook, 2001).

Análisis de datos de ISSR-PCR

Se generó una matriz binaria de ausencia (cero) y presencia (uno) (Jedrzejczyk y Rewers, 2018; Wu, 2019), luego se determinaron algunos parámetros genéticos utilizando el paquete estadístico Infogen (Balzarini, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los aspectos importantes en la caracterización en base a marcadores moleculares de ADN es la extracción de ADN de buena concentración y calidad, siendo en vegetales un punto crítico debido a la gran cantidad y diversidad de metabolitos secundarios que producen, los cuales cumplen muchas funciones importantes en estos organismos, sin embargo pueden hacer el proceso de extracción sumamente complicado, debido a que pueden coprecipitar con el ADN durante la extracción, los complejos de polisacáridos por ejemplo pueden provocar que la fase acuosa sea excesivamente viscosa complicando la separación del ADN, o pueden adherirse a la molécula de ADN dificultando el acceso a las enzimas como las polimerasas o las enzimas de restricción, siendo necesario elegir un método que se adecue al material biológico con el cual se va a trabajar (Ferreira, 1998; Sánchez-Coello *et al.*, 2012). Uno de los parámetros empleados para evaluar la calidad de los ácidos nucleicos es la espectrofotometría, la cual se fundamenta en la gran capacidad de los ácidos nucleicos para absorber el paso de la luz a una longitud de onda de 260 nanómetros, permitiendo medir la concentración de ADN así como determinar la pureza del ADN, mediante el ratio 260/280 el cual debe encontrarse en un rango entre 1,7 a 2,0 para ser considerado de buena calidad (Sambrook, 2001).

Tabla 4

Valores de Concentración y calidad del ADN en muestras de hojas de *Pouteria lucuma* "lucuma" del caserío de Naubamba

Muestra	Concentración ADN (ng/ μ L)	A260/A280
Muestra 1	67,0	1,95
Muestra 2	485,6	2,06
Muestra 3	576,3	2,06
Muestra 4	188,1	2,00
Muestra 5	67,7	1,89
Muestra 6	85,5	2,01
Muestra 7	216,7	2,02
Muestra 8	66,1	1,96
Muestra 9	69,7	2,05
Muestra 10	85,1	2,06
Muestra 11	49,5	2,07
Muestra 12	76,5	2,03
Muestra 13	49,4	2,07
Muestra 14	57,2	2,08
Muestra 15	79,8	2,00
Muestra 16	65,2	2,00
Muestra 17	122,1	2,05
Muestra 18	35,5	1,99
Promedio	135,7	2,0

Como se observa en los resultados de extracción de ADN (Tabla 4) en las muestras de *Pouteria lucuma*

"lúcuma", muestreadas en el caserío de Naubamba distrito de Usquil se han obtenido valores adecuados de concentración de ADN con un promedio de 135,7 ng/ μ L y con una calidad promedio de 2,0; estos resultados de calidad concuerdan con los valores obtenidos por Sánchez (2017), donde se trabajó con marcadores SSR en *Solanum tuberosum*, logrando, sin embargo, concentraciones de ADN mayores (481,9 ng/ μ L) pero con degradación; sin embargo no fue determinante al momento de la amplificación de los marcadores por requerirse bajas concentraciones de ADN.

Respecto a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de marcadores ISSR, se eligió estos marcadores moleculares, por las ventajas que ofrece como son: la alta variabilidad que se detecta, así como en su reproducibilidad, no requiere de altas concentraciones de ADN. No es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida y son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos (Eguiarte *et al.*, 2007). Asimismo, presentar una mayor reproducibilidad y un mayor porcentaje de polimorfismo que los otros marcadores dominantes tales como los marcadores RAPDs, lo cual fue confirmado con los resultados obtenidos (Figuras 2 a 6), observando amplificación en todos los marcadores ISSR utilizados y polimorfismo; esto contrasta con los resultados obtenidos por Guasmi (2012) en *Hordeum vulgare*, donde los datos mostraron que el porcentaje de bandas polimórficas RAPD (100%) fue mayor que el de ISSR (66,67%), además el número medio de bandas de amplificación RAPD (5,66) fue mayor que el de ISSR (3), siendo el número total de bandas polimórficas (17) detectadas por tres cebadores RAPD fue mucho mayor que el de los tres cebadores ISSR (6), considerando que los marcadores RAPD eran superiores a los marcadores ISSR en la capacidad de revelar bandas más informativas en una sola amplificación (Tabla 5).

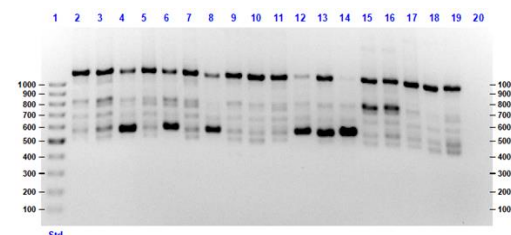


Figura 2. Productos de amplificación por PCR con el marcador 825 a partir de muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del Caserío de Naubamba Distrito de Usquil.

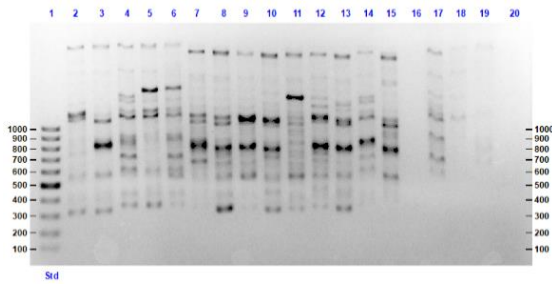


Figura 3. Productos de amplificación por PCR con el marcador 844 a partir de muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del Caserío de Naubamba Distrito de Usquil.

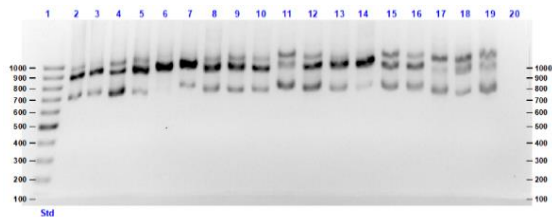


Figura 5. Productos de amplificación por PCR con el marcador 849 a partir de muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del Caserío de Naubamba Distrito de Usquil.

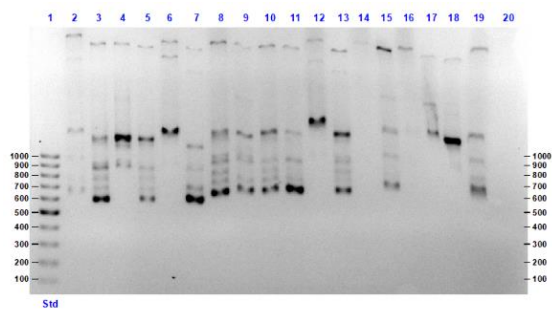


Figura 4. Productos de amplificación por PCR con el marcador 854 a partir de muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del Caserío de Naubamba Distrito de Usquil.

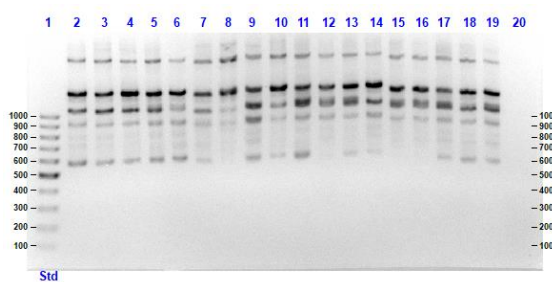


Figura 6. Productos de amplificación por PCR con el marcador 856 a partir de muestras de ADN de hojas de *Pouteria lucuma* del Caserío de Naubamba Distrito de Usquil.

El proporción de Loci Polimorficos (PMF(95), muestran que los primers M844 y M854, presentan los mayores valores de loci polimorficos: respecto a la información de contenido polimórfico, fluctúa entre 0,19 y 0,32, con un promedio de 0,26 (Tabla

6), valores bajos si lo comparamos con los resultados en otras investigaciones en diferentes especies como *Mentha L* (Jedrzejczyk y Rewers, 2018) evaluada con marcadores ISSR, con un PIC promedio de 0,434 o comparado con el PIC promedio en 30 accesiones de *Solanum tuberosum*, con un promedio de 0,493 mediante marcadores microsateletes (Sánchez, 2017); esto se podría deber al tipo de marcador empleado, a la cantidad de marcadores o también debido a que la población no presenta gran variabilidad genética.

Tabla 5

Tabla resumen de amplificación con marcadores ISSR en muestras de hojas de *Pouteria lucuma* del caserío de Naubamba

Resumen	Cantidad de casos
Muestras	18
Muestras duplicadas	0
Bandas (número)	40
Patrón bandas duplicadas	0
Bandas monomórficas	9
Bandas polimórficas (%)	77,50
Primers	5

Tabla 6

Resumen por primer de marcadores ISSR en muestras de hojas de *Pouteria lucuma* del caserío de Naubamba

Primer	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC
M825	4	3	7	0,57	0,24
M844	12	0	12	1,00	0,29
M849	2	1	3	0,67	0,19
M854	11	0	11	1,00	0,24
M856	2	5	7	0,29	0,32
Total	31	9	40	0,71	0,26

Número de bandas polimórficas (BP), Número de bandas monomórficas (BM), Número de bandas totales (BT), Proporción de loci polimórficos (PMF(95)), Contenido de información polimórfica (PIC) promedio.

Los valores obtenidos, además, son bajos en comparación con otras investigaciones como la realizada por dos Santos *et al.* (2016) trabajando en *Mimosa caesalpiniaefoli* donde a partir de 7 marcadores ISSR obtuvieron un total de 78 loci, además valores más altos de contenido de información polimórfica promedio por marcador; sin embargo, respecto a la cantidad de loci polimórficos presentan valores cercanos, 41 para *Mimosa* y 40 para la presente investigación, esto podría estar en función de la población estudiada.

Recientemente se ha analizado la variación morfológica y molecular en *P. lucuma*, destacando moderada o baja variabilidad genética de las poblaciones colectadas, probablemente por tratarse de colectas en huertas familiares, a diferencia de la presente investigación donde evaluamos poblaciones de *P. lucuma* de zonas alejadas de la provincia de Otuzco, observándose de forma preliminar resultados que demuestran variabilidad genética en las poblaciones muestreadas; pudiendo considerarse a futuro a estas poblaciones para programas de selección de plantas resistentes a enfermedades y producción, enmarcado en un programa de mejoramiento genético, tal como se sugiere en la tesis (Borbor, 2017).

CONCLUSIONES

Se logró extraer ADN de buena concentración y calidad a partir de hojas colectadas el caserío de Naubamba, distrito de Usquil. Se logró amplificación con todos los marcadores ISSR empleados y alto número de bandas polimórficas

con una proporción de loci polimórficos altos por marcador. Se sugiere continuar con investigaciones de esta especie de importancia económica mediante el empleo de otros marcadores moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al biólogo Victor Sanchez Cabrera por el apoyo en la colecta del material biológico y la bachiller

Silvana Carolina Ruiz Agurto por el apoyo durante la ejecución de la investigación en la etapa de Laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, Z.; Bravo, L.; Tagami, R. 2006. Plan de negocios para la industrialización y exportación de lúcumas de seda. Cuad. Difus. 11(21): 97-114.
- Arends, J. 1976. Somatic Chromosome Number of some African Sapotaceae. Acta Bot. Neerl. 1976: 449-457.
- Ansari, S.A.; Narayanan, C.; Wali, S.A.; Kumar, R.; Shukla, N.; Rahangdale, S.K. 2012. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* Lf) populations. Annals of Forest Research 55(1): 11-23.
- Becerra, V.; Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica 60(3): 270-281.
- Balzarini, M.; Di Rienzo, J. InfoGen. 2016. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: www.info-gen.com.ar
- Borbor, M. 2017. Variación morfológica y molecular de la lúcumas (*Pouteria lucuma* [R. et Pav.] O. Kze) y su contribución al manejo sustentable de los huertos de Yaután y Laredo. Tesis para optar por el grado de Doctoris Philosophiae en Agricultura Sustentable. Universidad Nacional Agraria la Molina. 222 pp.
- Doyle, J.; Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- dos Santos, F.; Vasconcelos, M.; de Almeida, F.; dos Santos, C.; Cardoso F. 2016. Teixeira das Chagas, Kyvia Pontes. ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. Idesia (Arica) 34(3): 47-52.
- Eguiarte, L.; Souza, V.; Aguilar, X. 2007. Ecología Molecular. Editorial SEMARNAT. México.
- Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Brasília 1: 121-123.
- Fuentealba, C.; Gálvez, L.; Cobos, A.; Olaeta, J.; Defilippi, B.; Chirinos, R.; Campos, D.; Pedreschi, R. 2016. Characterization of main primary and secondary metabolites and in vitro antioxidant and anti-hyperglycemic properties in thymus carp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. Food Chem. 190: 403-411.
- Guasmi, F.; Elfalleh, W.; Hannachi, H.; Feres, K.; Touil, L.; Marzougui, N.; Triki, T.; Ferchichi, A. 2012. The Use of ISSR and RAPD Markers for Genetic Diversity among South Tunisian Barley. ISRN Agronomy Article ID 952196. 10 pp.
- Huamantupa, I. 2008. Frutales Nativos Silvestres consumidos en los mercados locales y zonas rurales de la Amazonía Peruana (Departamentos de Cusco, Loreto y Madre de Dios). Rev. Q'EUÑ 1(2): 26-31.
- Jacobsen, S.; Mujica, A.; Ortiz, R. 2003. La Importancia de los Cultivos Andinos. Rev. Vzlana. de Soc. y Ant. 13(36): 14-24.
- Jedrzejczyk, I.; Rewers, M. 2018. Genome size and ISSR markers for *Mentha* L. (Lamiaceae) genetic diversity assessment and species identification. Industrial Crops and Products 120: 171-179.
- Lavado, M.; Yenque, J.; Robles, R. 2012. Estudio de rendimiento de harina de lúcumas a partir del fruto fresco. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial 15(1): 127-130.
- León, B. 2006. Sapotaceae endémicas del Perú. Rev. peru. Biol. 13(2): 608 - 609.
- León, J. 2000. Botánica de cultivos tropicales. 3ª ed. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Majourhat, K.; Jabbar, Y.; Aranedo, L.; Zeinalabedini, M.; Hafidi, A.; Martínez-Gómez, P. 2007. Karyotype characterization of *Argania spinosa* (L.) Skeel (Sapotaceae). South African Journal of Botany 73: 661-663.
- Mostacero, J.; Mejía, F.; Gamarra, E. 2002. Taxonomía de las Fanerógamas útiles del Perú. Trujillo - Perú. Editora Normas Legales S.A.C.
- Puecher, D.; Robredo, C.; Ríos, R.; Rimieri, P. 1998. Evaluación de la variabilidad por RAPDs en *Bromus catharticus* Vahl. En: Congreso Argentino de Botánica. Río Cuarto.
- Rodríguez, N. 1999. Determinación de la tasa de Cruzamiento con Marcadores Bioquímicos (Isoenzimas) en una Población de Zapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore Stearn) de la parte baja del río Hato, en San Agustín Acasaguastlan, El Progreso. Tesis para obtener el Título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rodríguez-Rojas, T.; Andrade-Rodríguez, M.; Alía-Tejagal, I.; López-Martínez, V.; Espinosa-Zaragoza, S.; Esquinca-Avilés, H. 2012. Caracterización molecular de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 29: 339-354
- Rolim, L.; Queiroz, M.; Fontes, A.; Cortopassi, G. 2011. Use of RAPD Molecular Markers on Differentiation of Brazilian and Chinese *Ganoderma lucidum* Strains. Braz. Arch. Biol. Technol. 54(2): 273-281.
- Sánchez, A. 2017. Papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante marcadores SSRs Genetic variability study in accessions of papa. Rev. Cien. Agri. 14(c): 67-76.
- Sánchez-Coello, N.; Luna-Rodríguez, M.; Vázquez-Torres, M.; Sánchez-Velásquez, L.; Santana-Buzzy, N.; Octavio-Aguilar, P.; Iglesias-Andreu, L. 2012. Optimización de un protocolo del aislamiento del ADN y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente 18(1): 123-133.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª Ed. Spring Harbor Laboratory Press, Sanjines, A.; Øllgaard, B.; Balslev, H. 2006. Frutos comestibles. Botánica Económica de los Andes Centrales. 329-346 pp.
- Utrera, L.; Martínez, T. 1994. Caracterización in situ de zapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore Stearn) en Chiquimulilla y Guazacapan, Santa Rosa, Guatemala. TIKALIA 7(2): 35-50.
- Wu, W.; Chen, F.; Yeh, K.; Chen, J. 2019. ISSR analysis of genetic diversity and structure of plum varieties cultivated in Southern China. Biology 8(1): 1-13.