

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**BÚSQUEDA DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE
TOLERANTES-RESISTENTES A *Phytophthora
cinnamomi* Rands.**

ELBA LIDIA CASTAÑEDA GONZÁLEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis, titulada: **BÚSQUEDA DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTES-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands**, realizada por la alumna: **ELBA LIDIA CASTAÑEDA GONZÁLEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dra. Reyna I. Rojas Martínez

ASESOR

Dr. Alejandro Barrientos Priego

ASESOR

Dr. Emma Zavaleta Mejía

ASESOR

Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán

ASESOR

Dra. June Simpson

Montecillo, Texcoco, estado de México, diciembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico proporcionado para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios.

A la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C, por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, por su apoyo durante la realización de la Tesis, pero sobretodo por sus consejos, amistad, paciencia y comprensión.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego, por su amistad y apoyo en todo momento y por las sugerencias durante la realización del trabajo de investigación.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía, por sus consejos, comprensión, y sugerencias para el buen desarrollo de ésta investigación.

A la Dra. Ma. Pilar Rodríguez, por su apoyo y sugerencias.

A la Dra. June Simpson, por su apoyo.

Al Ing. Pedro Mijares Oviedo, por su paciencia y apoyo durante la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Lic. Juan de Dios Barbabosa Kubli por la oportunidad brindada para continuar con los estudios de Doctorado.

Al Ing. Juan José Aguilar Melchor, por su amistad y apoyo incondicional durante la realización de la Tesis.

Al Dr. Juan Carlos Reyes Alemán, por su gran calidad humana, amistad y apoyo.

Al M.C. Abimael López López y al Dr. Manuel Campos Figueroa por todo el apoyo en la realización de la Tesis.

A todos aquéllos que de una u otra manera aportaron algo para la realización de éste trabajo.

DEDICATORIA

A MI HERMANO PABLO (†)
CON AMOR.

A MIS PADRES: AUDELIA Y JOSÉ
QUE SON TODO PARA MI.

CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Revisión de literatura.....	3
3.1. <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.....	4
3.2. Síntomas de la enfermedad.....	7
3.3. Portainjertos resistentes.....	7
3.4. Técnicas para evaluar resistencia.....	7
3.5. Efecto del portainjerto sobre el cultivar.....	7
4. Literatura citada.....	8
 CAPÍTULO I. SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE RESISTENTES A <i>P. cinnamomi</i> Rands. PROVENIENTES DE COLECTAS DE SEMILLA DE ÁRBOLES CRIOLLOS	
Resumen.....	11
Abstract.....	12
1.1. Introducción.....	13

1.2. Materiales y Métodos.....	13
1.2.1. Localización del experimento.....	13
1.2.2. Colecta de semilla.....	14
1.2.3. Calidad del agua de riego.....	15
1.2.4. Detección de <i>P. cinnamomi</i> en raíces de árboles“escape”.....	17
1.2.5. Propagación del inóculo.....	18
1.2.6. Evaluación	20
1.3. Resultados y Discusión.....	21
1.4.. Conclusiones.....	24
1.5.. Literatura citada.....	24

CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE

TOLERANTES-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands

CON MARCADORES MOLECULARES

Resumen.....	27
Abstract.....	28
2.1. Introducción.....	29
2.2. Materiales y métodos.....	34
2.2.1. Extracción de ADN.....	34
2.2.2. Análisis estadístico.....	35
2.3. Resultados y discusión.....	37
2.4. Conclusiones.....	37
2.5. Literatura citada.....	46

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AGUACATE

TOLERANTES-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands

PROVENIENTES DE UN BANCO DE GERMOPLASMA

Resumen.....	49
Abstract.....	50
3.1. Introducción.....	51
3.2. Materiales y métodos.....	54
3.3. Resultados y discusión.....	55
3.4. Conclusiones.....	60
3.5. Literatura citada.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CAPÍTULO I	
Cuadro 1.1. Análisis químico del agua de riego, el cual muestra niveles altos de cloro y sodio.....	16
Cuadro 1.2. Análisis químico del agua para riegos de emergencia, la cual contiene altos niveles de cloro y sodio.....	17
Cuadro 1.3. Escala arbitraria utilizada para evaluar el grado de daño por <i>P. cinnamomi</i> , considerando en ella los síntomas de salinidad ocasionados por el agua de riego.....	21
Cuadro 1.4. Treinta y ocho genotipos de aguacate sobrevivieron a las inoculaciones de <i>P. cinnamomi</i> en 5, 200 plantas con <i>P. cinnamomi</i>	22
CAPÍTULO II	
Cuadro 2.1. Iniciadores utilizados para la caracterización de los materiales de aguacate.	37
Cuadro 2.2. Nivel de polimorfismo obtenido con 13 iniciadores para RAPD e ISSR en 41 materiales de aguacate (<i>Persea</i> spp.).....	39
CAPÍTULO III	
Cuadro 3.1. Genotipos de <i>Persea</i> del Banco de Germoplasma y tipificados mediante RAPD e ISSR en el estudio.....	54

Cuadro 3.2. Nivel de polimorfismo obtenido con 13 iniciadores de RAPD e ISSR en 16 materiales de aguacate (<i>Persea</i> spp.).....	60
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO I	
Figura 1.1. Recipientes donde se propagaron las semillas colectadas. Macetas; A y B, charolas; C y D.....	15
Figura 1. 2. Condiciones de la planta a los dos años de la inoculación con <i>P. cinnamomi</i> Rands. A: charolas, B: maceta.....	24
CAPÍTULO II	
Figura 2.1. Dendograma consenso de 41 genotipos de aguacate (<i>Persea</i> spp.), generado de la matriz de datos binarios con 8 iniciadores de RAPD. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación con UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones.....	41
Figura 2.2. Dendograma consenso sin raíz de 41 genotipos de aguacate (<i>Persea</i> spp.), generado de la matriz de datos binarios con 8 iniciadores de RAPD. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación por UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones.....	42
Figura 2.3. Dendograma consenso de 41 materiales de aguacate (<i>Persea</i> spp.) generado de la matriz binaria con cinco iniciadores de ISSR. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación por UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones.....	44
Figura 2.4. Dendograma consenso sin raíz de 41 materiales de aguacate	

(*Persea* spp.) generado de la matriz binaria con cinco iniciadores de ISSR. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación por UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones..... **45**

CAPITULO III

Figura 3.1. Agrupamiento de 16 materiales de aguacate (*Persea* spp.), obtenido a partir de los datos moleculares de 8 iniciadores de RAPD. El agrupamiento se realizó con el índice Nei y Li y la distancia UPGMA con un remuestreo de 1000 repeticiones..... **57**

Figura 3. 2. Agrupamiento de 16 materiales de aguacate (*Persea* spp.), obtenido a partir de 5 iniciadores de ISSR. El agrupamiento se realizó con el índice Nei y Li y la distancia UPGMA con un remuestreo de 1000 repeticiones..... **59**

BÚSQUEDA DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTES-RESISTENTES

A *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Elba Lidia Castañeda González, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2009.

México se considera el centro de origen del aguacate y mantiene diversidad genética en materiales criollos. En este estudio, se realizaron colectas de semilla para detectar tolerancia o resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands, principal patógeno de la raíz del aguacate. El material se colectó en los estados de Querétaro, Puebla y Estado de México, seleccionando árboles que no mostraban síntomas (árboles “escape”) aún cuando los huertos están infestados con el patógeno. Además, se incluyeron en la investigación semillas de 22 accesiones del Banco de Germoplasma (BG) de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. y planta clonal del portainjerto Duke-7 resistente a *P. cinnamomi* y utilizado como testigo. Se inocularon 5,200 plántulas con micelio de *P. cinnamomi* para hacer una selección masal recurrente; treinta y ocho plantas mostraron potencial para utilizarse como portainjerto. Para evaluar el polimorfismo entre genotipos, caracterizarlos y detectar la cercanía entre individuos, de los 38 materiales seleccionados, se extrajo el ADN y se caracterizó molecularmente con RAPD e ISSR; se incluyeron también los materiales: Topa-topa (susceptible), Duke-7 (resistente) y Day resistente a *P. cinnamomi* y salinidad, provenientes del BG y utilizados como referencia. Los dendogramas se elaboraron con el programa FreeTree, versión 0.9.1.50, aplicando un método de remuestreo con 1,000 repeticiones. La similitud genética se estimó con el coeficiente Nei and Li, y para los agrupamientos se utilizó el método UPGMA. Trece de los 25 iniciadores presentaron polimorfismo; el promedio del contenido de información polimórfica (PIC) para RAPD e ISSR fue de 0.9052 y 0.9054, respectivamente, con un total de 3,057 bandas. De forma independiente se caracterizaron 16 accesiones de aguacate provenientes del BG, 14 de ellas con resistencia o tolerancia en campo a *P. cinnamomi* y dos con susceptibilidad al patógeno. El análisis detectó un alto grado de polimorfismo entre los materiales evaluados.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., Portainjertos, PCR.

SEARCH OF ROOTSTOCK OF AVOCADO TOLERANT-RESISTANT TO

Phytophthora cinnamomi Rands.

Elba Lidia Castañeda González, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2009.

México is considered as the origin center of the avocado and maintain genetic diversity in wild materials. Seed collections were carried out to find tolerance or resistance to *Phytophthora cinnamomi* Rands, main pathogen of the avocado root. The collection sites were the states of Queretaro, Puebla and state of Mexico, where “escape” trees were selected in orchards infested whit the pathogen, likewise, in this research there were included seeds of 22 accessions from the Germplasm Bank (GB) located in Coatepec Harinas, state of Mexico, y clone plant Duke-7 as standard. After five years from the beginning of the collection, the outcome was 5,200 seedlings that were inoculated with *P. cinnamomi* through recurrent mass selection. From this selection, 38 plants survived and are considered as potential of rootstock. Likewise, there were materials selected to water with salty water with concentrations up to 14.2 meq/L of Na⁺ and 4.52 meq/L of Cl⁻. From these 38 materials, the DNA was extracted and characterized molecularly with RAPD and ISSR, which includes three materials from the Germoplasm Bank used as reference: Topa-topa (susceptible), Duke-7 (resistant) and Day resistant to *P. cinnamomi* and salinity as well. The objective was to evaluate the polymorphism among genotypes, characterize them and detect a close relationship among individuals. The Dendograms (trees) were constructed with the software FreeTree, version 0.9.1.50 considering a re-sampling method with 1 000 replications. The close genetic relationship was estimated by Nei and Li coefficient, and the cluster analysis was analyzed by the UPGMA method. Only 13 of 25 primers showed polymorphism; the average of the polymorphic information content for RAPD and ISSR was 0.9052 and 0.9054, respectively, with a total of 3,057 bands. Other study was by vegetal culture of 16 accessions from the GB, 14 resistant to *P. cinnamomi* in field, this analysis detected a high degree of polymorphism among materials assessed.

Keywords: *Persea americana* Mill., rootstock, PCR.

INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1. Introducción

El aguacate *Persea americana* Mill., es uno de los frutales más importantes en México, su importancia se deriva del beneficio económico que derrama entre productores, comercializadores, industrializadores, consumidores, y mano de obra que genera. La importancia en el mercado internacional ha crecido sostenidamente, dejando de ser una fruta exótica para incorporarse como parte de la dieta de la población de muchos países (Téliz y Marroquín, 2007).

Sin embargo, un inconveniente en la producción del aguacate son las enfermedades de raíz, siendo la más importante y devastadora la pudrición radical, conocida como “tristeza del aguacatero” (Ogawa y Lyons, 1983; Zentmyer, 1980). Esta enfermedad reduce la biomasa de la raíz y afecta su función debido al daño ocasionado por *Phytophthora cinnamomi* Rands en las raíces absorbentes. La enfermedad es severa en huertos con suelos arcillosos y con exceso de humedad (Zentmyer, 1985). Los síntomas de clorosis, marchitez y defoliación, se presentan en cualquier etapa del ciclo biológico de la planta, sin embargo, la planta pequeña es más susceptible (Ramírez *et al.*, 1996).

A partir de de la década de 1940, se descubrió la pudrición en raíces de aguacate por el patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands, iniciándose la búsqueda de portainjertos

que toleraran dicha enfermedad. Los esfuerzos iniciales los realizó el Dr. C. Arthur Schroeder y posteriormente el Dr. George A. Zentmyer de la Universidad de California en Los Angeles y Riverside (Barrientos, 2007). Las primeras colectas de aguacate en la búsqueda de portainjertos resistentes a *P. cinnamomi* las realizó Zentmyer en Uyuca, Honduras, en 1952 (Zentmyer, 1992). En la actualidad se tiene resistencia moderada en el portainjerto Duke-7 y en algunas colecciones de diversos tipos de aguacate nativos de América Latina, así como en selecciones de portainjertos en Riverside, California como: G6, G22, G166, G335, G592, Wurtz, Lluntalas y algunos criollos tolerantes al patógeno (Ramírez *et al*, 1996). Por otro lado, también existe resistencia a *P. cinnamomi* en algunas especies del subgénero *Eriodaphne* pero son incompatibles vegetativamente con el aguacate (Bergh, 1992), a excepción de *Persea longipes*, especie procedente de Veracruz, México (Barrientos, 2007).

2. Objetivos

Determinar los portainjertos de aguacate tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* Rands provenientes de semilla.

Caracterizar molecularmente a los portainjertos que presenten tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* Rands.

Caracterizar molecularmente 16 accesiones de aguacate procedentes del Banco de Germoplasma de la Fundación Salvador Sanche Colín CICTAMEX S.C., en Coatepec Harinas, Estado de México.

3. Revisión de literatura

El origen del aguacate se dió en bosques y selvas con clima tropical, subtropical o templado cálido de centroamérica, sureste y macizos montañosos de la parte central de México, donde se encuentran diversas variedades silvestres, las cuales son consideradas como posibles antecesores de las variedades comestibles (Solares, 1981).

El Aguacate es una dicotiledónea del orden Ranales (Rodríguez, 1982) y familia Lauracea (Solares 1981; Rodríguez 1982; Bergh 1992; Calabrese 1992), se clasificó por Gaertner como *Persea gratissima* y como *Persea americana* por Miller (Rodríguez, 1982). Es una planta leñosa de elevado porte, presenta hojas coriáceas y semillas dicotiledóneas. El género *Persea* se clasifica en dos subgéneros *Eriodaphne* y *Persea* (Bergh, 1992) y en tres razas o grupos ecológicos: mexicana, guatemalteca y antillana. La raza mexicana (*Persea americana* var. *Drymofilia*), originaria de los valles de México y ubicada de 1,500 a 2,000 m.s.n.m. Las hojas presentan un característico olor a anís que la diferencia con otras razas. Es la más resistente a bajas temperaturas, las plantas jóvenes resisten de -3 °C a -4 °C, y las adultas de -4 °C a -7 °C, incluso pueden tolerar hasta -10 °C si la duración de la helada es corta. La raza guatemalteca,

originaria de Guatemala, se desarrolla en alturas de 500 a 1,000 m.s.n.m. Las hojas son inodoras y los brotes nuevos son de color rojo violáceo. La resistencia al frío respecto a las otras razas es intermedia; las plantas jóvenes resisten entre -2 °C a -4 °C, y las adultas entre -3 °C y -5 °C. La raza antillana, se dice que su origen es en las Antillas, sin embargo, no hay pruebas que confirmen éste hecho. Esta raza se sitúa en altitudes menores a 500 m.s.n.m. y se adapta a lugares cálidos y con alta humedad relativa. Las hojas no tienen aroma a anís y los brotes nuevos inicialmente tienen una coloración rojiza, posteriormente verde y finalmente amarillo. Las hojas no presentan vellocidades (Rodríguez, 1982).

3.1. *Phytophthora cinnamomi* Rands

El primer reporte de esta especie se acredita a Rands, quien, en 1922, la aisló de canchales de *Cinnamomum burmani* Blume en Sumatra (Romero, 1993). Sin embargo, el primer reporte en aguacate (*Persea americana* Mill.) lo hizo Tucker en 1927 en Puerto Rico, y Payer en 1942 en California, quien aisló al patógeno de árboles de aguacate enfermos por el daño de *P. cinnammi* en la raíz (Alvarez, 1979). En la actualidad esta enfermedad se reporta en cerca de 1,000 hospedantes, principalmente leñosas. (Zentmyer, 1980).

Los organismos pertenecientes al género *Phytophthora* se caracterizan por tener una morfología, genética y caracteres fisiológicos únicos. Este género lo incluyeron Margulis *et al* (1990) en la clase Oomicota, clasificándolo como hongo inferior del reino

Myceteae. Esta posición taxonómica la han discutido diversos autores (Barr, 1992; Dick, 1995), quienes sitúan al género *Phytophthora* dentro del Reino Cromista, en lugar del Reino Myceteae, o bien en el Reino Chromista, phylum Oomycota, orden Peronosporales y familia Peronosporaceae (Hardham, 2005). Las razones que explican este cambio de clasificación se basan en estudios del aparato flagelar de las zoosporas de la clase Oomicota. Se trata de un aparato flagelar heterocóntico, esto es, con dos flagelos morfológica y funcionalmente diferentes. Uno es largo, con bárbulas denominadas mastigonemas y con función motriz, y el otro es liso y con función de timón. La presencia de bárbulas en el flagelo es una característica evolutiva de ciertas algas, por lo que se supone que el género *Phytophthora* evolucionó a partir de algas amarillas *Crysophytas* (Edwin y Ribeiro, 1996). En estudios recientes a nivel molecular, los análisis estructurales agrupan a los Oomycota con las algas cromofitas y otros taxa que poseen flagelo tubular, en un ensamble llamado Stramenofita (Sogin y Silberman, 1998),

El micelio de *P. cinnamomi* es cenocítico, toruloso, con nódulos redondos de 8 μm de ancho, dilataciones hifales esféricas con racimos de 42 a 60 μm de diámetro. El crecimiento micelial en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) presenta un aspecto algodonoso o en forma de camelia. Los esporangios pueden ser ovoides, ovopiriformes o elipsoides, con un ápice no papilado, su base es redonda y estrecha, sujeta por una zona terminal, la forma y tamaño varían con las condiciones ambientales y nutricionales. El tamaño promedio es de 75 x 40 μm (Ho y Zentmyer, 1977). Las clamidosporas de *P. cinnamomi* tienen diámetros de 40 a 135 μm y muchas son de

forma irregular, pueden presentar grupos de dos a tres por hifa (Arthur *et al.*, 1967) de forma terminal o intercaladas en el micelio, con frecuencia se encuentran racimos con tres y 10 (Edwin y Ribeiro, 1996).

Phytohthora cinnamomi Rands es un patógeno virulento y con amplio rango de hospedantes y como habitante del suelo vive parasitando las raíces y base del tallo de sus hospedantes, en consecuencia las plantas se marchitan y mueren (Romero, 1993).

3.2. Síntomas de la enfermedad

Las plantas de aguacate afectadas por *P. cinnamomi* muestran síntomas de salinidad tanto en la parte aérea como en la raíz. En la parte aerea, las hojas son más pequeñas que las normales, de color verde pálido en lugar de verde oscuro y tienden a caer. En fases avanzadas de la enfermedad, las ramas van muriendo de la punta a la base (muerte regresiva). Los frutos no alcanzan su tamaño normal y es común observar que se producen en mayor número. Los síntomas típicos en el sistema radical son: pudrición de las raíces alimentadoras, las cuales se tornan negras y quebradizas; las raíces largas y gruesas son menos dañadas y tienen la capacidad de producir nuevas raicecillas que prolongan la vida del árbol durante algún tiempo (Romero, 1993).

3.3. Portainjertos resistentes

Se han buscado portainjertos resistentes en todos los países donde se cultiva aguacate, como México, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Argentina y Chile, se encontraron algunas especies silvestres de *Persea* (*P. skutchii* en Honduras y Costa Rica; *P. chrysophila* en Colombia y *P. donell-smithii* en Honduras y Guatemala) con alta resistencia; pero son incompatibles con *P. americana*. Sin embargo, la variedad Duke-7 tiene resistencia moderada, es por ello que se realiza su propagación clonal para utilizarse como portainjertos (Romero, 1993).

3.4. Técnicas para evaluar resistencia

Una técnica para obtener plantas resistentes a *P. cinnamomi* es mediante la inoculación del oomiceto (Zentmyer y Mircetich, 1965) en plántulas propagadas en maceta o camas con suelo infestado (Zentmyer, 1952). Otra forma es mediante inoculación de raíces desarrolladas en solución nutritiva (Zentmyer y Mircetich, 1965).

3.5. Efecto del portainjerto sobre el cultivar

En diversos frutales, existen características fenotípicas y fisiológicas que los portainjertos pueden transmitir a los cultivares injertados sobre ellos, como son: control del crecimiento y desarrollo del cultivar, fotosíntesis, consumo de agua y nutrimentos, producción de reguladores del crecimiento, época y densidad de floración, producción

de chupones basales, precocidad, peso, forma, maduración, firmeza y color del fruto, longevidad del cultivar y tolerancia a plagas y enfermedades del suelo (Cruz, 1994).

4. Literatura citada

Alvarez de la Peña, F. J. 1979. El aguacate. Ministerio de agricultura. Madrid, España. 225 p.

Arthur, H., McCain O.V., Holtzmann, y E. E. Trujillo. 1967. *Phytopathology*. 57: 1134-1135.

Barr, D. J. S. 1992. Evolution and kingdoms of organism from the perspective of a mycologist. *Mycologia*. 84: 1-11.

Barrientos, P. F. A., R. B. Muñoz P., J. C. Reyes A., M. W. Borys., y M. T. Martínez D. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos. pp: 31-62. *In: El Aguacate y su manejo integrado*. 2da. Edición. Coordinadores: Daniel Téliz y Antonio Mora. Edit. Mundi Prensa. México. 321 p.

Bergh, B. 1992. The Origin, Nature, and Genetic Improvement of the Avocado. California Avocado Society. 76: 61-75.

Calabrese, F. 1992. El aguacate. Mundi Prensa. Madrid, España. 249 p.

Cruz, C. J. G. 1994. Aspects of fruit growth and rootstock/scion influence on field performance in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* (A.CHEV) C:F: Liang et A.R. Ferguson var *deliciosa*). Ph.D. Thesis. Massey University. Palmerston North New Zealand.

- Dick, M. W. 1995. Sexual reproduction in the Peronosporomycetes (cromista fungi).
Canadian Journal of Botany. 1: 5712-5724.
- Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, MN.
APS Press. 562 p.
- Hardham, A. R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology. 6(6): 589-
604.
- Ho, H. H., and G. A. Zentmyer. 1977. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*.
Mycology. 69: 701-713.
- Margulis, L., J. O. Corliss, M. Melkonian, and D. J. Chapman. 1990. Handbook of
proctista. Jones and Bartlett. USA. 914 p.
- Munns, R., and M. Tester. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. Annual Review of
Plant Biology. 59: 651-81.
- Ogawa, J. M., and J. M. Lyons. 1983. How commodity marketing orders help solve crop
problems in California. Plant Disease. 67: 1042-1046.
- Ramírez, V.J., F. J. Estrada R., y R.R.A. Saíenz. 1996. Cultivo, enfermedades y plagas
del aguacatero. Universidad Autónoma de Sinaloa. Cualiacán. México.
- Rodríguez, S. F. 1982. El Aguacate. AGT Editor, S.A. México, D.F. 167 p.
- Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo.
Dirección General del Patronato Universitario. 347 p.
- Sogin M. L., and J. D. Silberman. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites
from the perspective of molecular systematic. International Journal for
Parasitology. 28: 11-20.

- Solares, M. 1981. Técnicas y prácticas en el cultivo del aguacate. Editores Mexicanos Unidos, S.A. México, D.F. pp. 14,16.
- Téliz, O. D., y F. J. Marroquin P. 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. pp: 1-28. *In: El Aguacate y su Manejo Integrado*. 2da. Edición. Téliz, D.; Mora, A. (eds). Mundi Prensa. D.F., México. 321 p.
- Zentmyer, G. A. 1952. Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* to avocado trees, and the effect of irrigation on disease development. *Phytopathology*. 42: 35-37.
- Zentmyer, G. A., Paulus, A. O., and R. M. Burns. 1962. Avocado root rot. California Agricultural Experimental Station. Circular 511.
- Zentmyer, G. A., and S. M. Mircetich. 1965. Testing for resistance of avocado to *Phytophthora cinnamomi* Rands in nutrient solution. *Phytopathology*. 55: 487-489.
- Zentmyer, G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. American Phytopathological Society. 96 p.
- Zentmyer, G. A. 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. California Avocado Society. Yearbook. 69: 89-93.
- Zentmyer, G. A. 1992. Early *Persea* Collections-Beginning of 40-Year Saga. California Avocado Society. Yearbook. 76: 85-92.

CAPITULO I

SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE RESISTENTES A *P. cinnamomi* Rands PROVENIENTES DE COLECTAS DE SEMILLA DE ÁRBOLES CRIOLLOS

RESUMEN

Se evaluó la tolerancia o resistencia a *Phytophthora cinnamomi* en 5,200 plántulas de aguacate provenientes de semilla de árboles criollos de Querétaro, Puebla, y Estado de México, y 22 accesiones del Banco de Germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. Simultáneamente se seleccionaron también aquellos materiales que resistieron concentraciones hasta 14.2 meq/L de Na⁺ y 4.52 meq/L de Cl⁻ en el agua de riego. Plántulas clonales del material Duke-7 resistentes a *P. cinnamomi* se utilizaron como testigo. Sólo 38 plantas sobrevivieron a la inoculación con micelio de *P. cinnamomi*; 30 de ellas a una concentración de 3x10⁵ fragmentos de micelio por litro de suelo, seis a una concentraciones de 9x10⁴ y dos plantas a una concentración de 300 semillas de trigo por litro de suelo con crecimiento micelial de 15 días, de éstos materiales, 29 no presentaron síntomas (nivel cero de daño) y nueve mostraron marchitez leve y hojas de la parte media inferior con bordes necrosados nivel uno.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., portainjertos, salinidad.

**SCREENING AVOCADO ROOTSTOCKS RESISTANT TO *P. cinnamomi* Rands.
FROM WILD TREE SEED COLLECTION**

ABSTRACT

The tolerance or resistance to *Phytophthora cinnamomi* was evaluated in 5,200 avocado seedlings from wild tree seeds from Querétaro, Puebla, and state of México, and 22 accessions from a Germoplasm Bank belonging to the Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. foundation. Simultaneously, those materials resistant to concentrations up to 14.2 meq/L of Na⁺ and 4.52 meq/L of Cl⁻ in irrigation water were selected. Duke-7 material clone seedlings were used as standard control. Only 38 materials survived to the inoculation with *P. cinnamomi* mycelia, from these, 30 at concentration of 3x10⁵ pieces of mycelia per liter of soil, six at 9x10⁴, approximately, and two at concentration of 300 wheat seeds per liter of soil with 15-day mycelia growth, from these materials, 29 did not show symptoms (level 0 of damage) and nine showed light faded, and necrosis on the edge of leaves from low medium part of the plant level 1.

Keywords: *Persea americana* Mill., rootstocks, salinity.

1.1. Introducción

La principal enfermedad del aguacate en México y el mundo, es la pudrición radical inducida por *P. cinnamomi*, razón por la cual existe la necesidad de contar con material genético capaz de resistir la infección de este patógeno. La búsqueda de portainjertos resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands se inició desde 1940 cuando se descubrió que la pudrición radical del aguacate se debía a éste patógeno (Barrientos *et al.*, 2007); sin embargo, hasta la fecha se conocen pocos portainjertos resistentes a *P. cinnamomi*, como Duke-7 proveniente de California, USA, y distribuido a nivel mundial. México como país de origen del aguacate presenta una gran diversidad genética en materiales criollos, por consiguiente un alto potencial para proveer de materiales resistentes al oomiceto. Considerando estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue detectar portainjertos de aguacate tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* a partir de semillas de material criollo.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Localización del experimento.

El trabajo se llevó a cabo en campo, vivero y laboratorio. La fase de campo se realizó en diferentes localidades de los estados de Querétaro, Puebla y Estado de México. La fase de vivero se realizó en el Centro Experimental “Tierra Blanca” de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. en el Municipio de Ixtapan de la Sal, estado

de México, ubicado a 18°49 30.1 de longitud norte y 99°40 2.5 de longitud oeste, coordenadas tomadas con GPS (Etrex, GARMIN, USA). La fase de laboratorio se realizó en los laboratorios Fisiología y Biología Molecular de la Interacción Planta-Patógeno del Instituto de Fitosanidad en el Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco y el laboratorio de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C.

1.2.2. Colecta de semilla.

Para la colecta de la semilla se realizaron recorridos de campo en los estados anteriormente mencionados, pero también se consideraron colectas del material del Banco de Germoplasma de aguacate de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C., ubicado en Coatepec Harinas, estado de México, durante el año 2003 y 2004. El mayor número de frutos se colectó en el estado de México. En los huertos infestados con *P. cinnamomi* se seleccionaron árboles criollos que no mostraban síntomas de la enfermedad (árboles “escape”) y de cada uno de ellos generalmente se colectaban 30 frutos. De estos árboles también se colectaron muestras de la raíz de la planta y suelo de la rizósfera, para detectar la presencia de *P. cinnamomi* en medio de cultivo selectivo PARPH, el cual consistió de 20 mg de pimaricina (Delvolid 50%), 250 mg de ampicilina, 10 mg de rifampicina, 50 mg PCNB (pentacloronitrobenzeno) y 50 mg de hymexazol; todo en un litro de medio estéril a base de agua destilada y 20 gr de harina de maíz agar.

La fruta, se dejó madurar a la sombra y posteriormente se extrajo la semilla, se limpió, se le hizo un corte de candado, y se sembró en tierra de monte previamente esterilizada con calor húmedo. La semilla se sembró tanto en macetas conteniendo un litro de suelo, como en charolas para hidroponía, conteniendo 10 L de suelo (Figura. 1. 1).

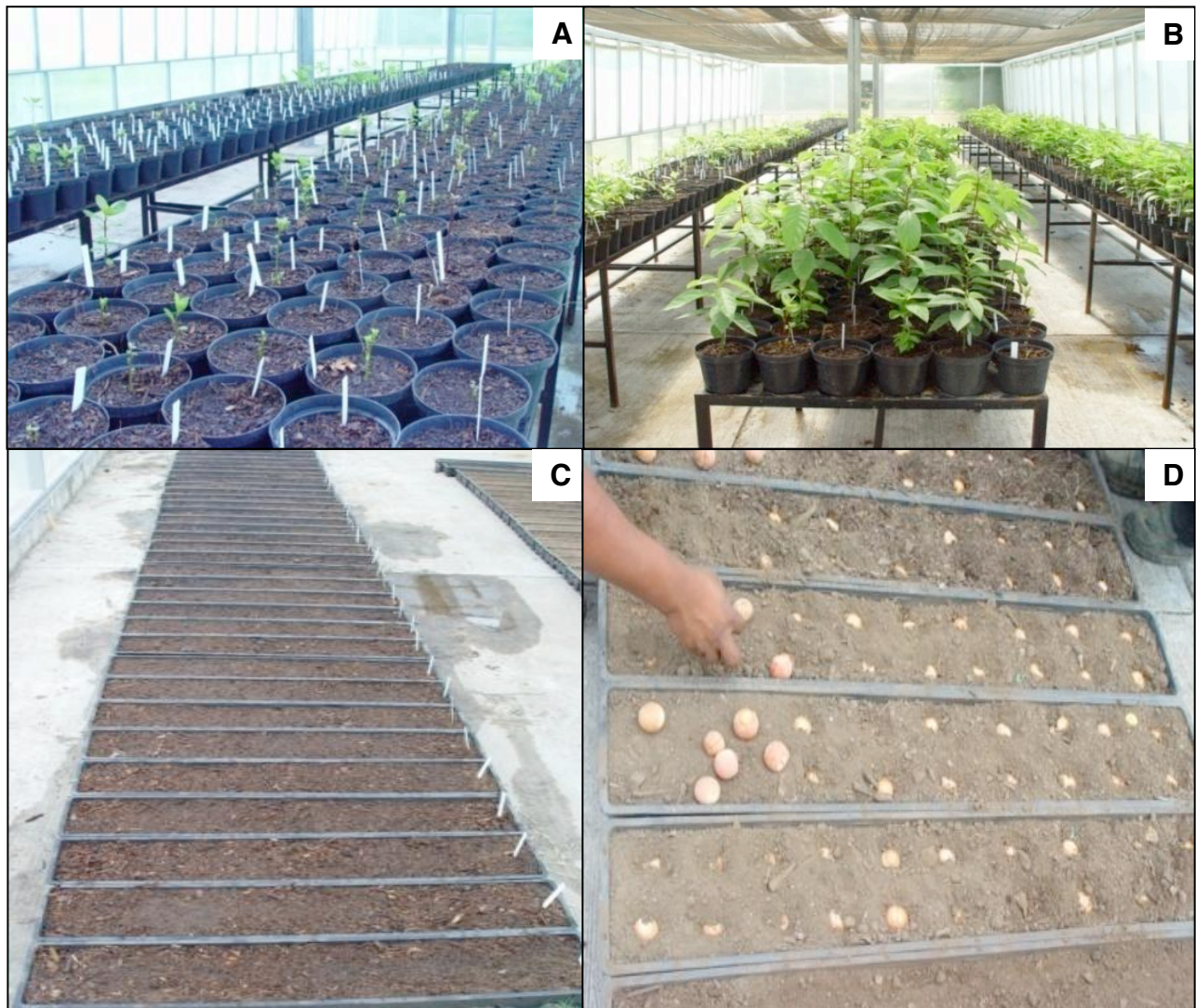


Figura 1.1. Recipientes donde se propagaron las semillas colectadas. Macetas; A y B, charolas; C y D.

1.2.3. Calidad del agua de riego.

El riego se realizó con agua proveniente de dos fuentes: La primera fue de pozo profundo perteneciente al Centro Experimental “La Cruz” de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C., lugar donde se llevó a cabo el experimento. La segunda fue de un pozo cercano y utilizada en riegos de emergencia cuando había fallas mecánicas en el pozo principal. Sin embargo, se puede observar en el cuadro 1.1 (A) y cuadro 1.2 (B) que ambas aguas tienen problemas de salinidad. De acuerdo con Ortíz (1997) el análisis químico del agua A presentó una alta salinidad con 14.2 meq/L de Na⁺ y 4.52 meq/L de Cl⁻, apta sólo para cultivos muy tolerantes y tolerantes, respectivamente. El agua B también mostró alta salinidad con 3.70 meq/L de Na⁺ y 1.55 meq/L de Cl⁻, los cuales pueden provocar toxicidad y bajo riesgo de toxicidad, respectivamente, y sólo puede ser utilizada en cultivos con mediana o alta tolerancia, debido a que provoca salinidad en el suelo.

Cuadro 1.1. Análisis químico del agua de riego, el cual muestra niveles altos de sodio y cloro.

Características			Interpretación
pH	7.42		Alcalina
C.E.	1.73	DSm-1	Media
Ca	7.99	meq/L	Media
Mg	1.23	meq/L	Media
K	0.78	meq/L	Buena
Na	14.2	meq/L	Mala
CO ₃	Trazas	meq/L	Buena
HCO ₃	8.25	meq/L	Media
Cl	4.52	meq/L	Media
SO ₄	3.88	meq/L	186 ppm
RAS ¹	6.60	meq/L	Mala
PSI ²			

PO ₄	ppm
NH ₄	ppm
NO ₃	ppm
B	ppm

*Análisis realizado por el laboratorio de química de suelos de Edafología-IRENAT, Colegio de Postgraduados.¹ Relación de adsorción de sodio. ² Porcentaje de sodio intercambiable.

Cuadro 1.2. Análisis químico del agua para riegos de emergencia, la cual contiene altos niveles de cloro y sodio.

Características		Interpretación	
pH	7.58		Alcalina
C.E.	0.79	DSm-1	Media
Ca	7.99	meq/L	Media
Mg	0.93	meq/L	Buena
K	0.24	meq/L	Buena
Na	3.70	meq/L	Media
CO ₃	Trazas	meq/L	Buena
HCO ₃	6.75	meq/L	Media
Cl	1.55	meq/L	Buena
SO ₄	1.15	meq/L	55 ppm
RAS ¹	1.75	meq/L	Buena
PSI ²			
PO ₄		ppm	
NH ₄		ppm	
NO ₃		ppm	
B		ppm	

*Análisis realizado por el laboratorio de química de suelos de Edafología-IRENAT, Colegio de Postgraduados.¹ Relación de adsorción de sodio. ² Porcentaje de sodio intercambiable.

1.2.4. Detección de *P. cinnamomi* en raíces de árboles “escape”.

En laboratorio, las muestras de raíz fueron lavadas con agua corriente hasta eliminar el exceso de tierra, después se cortaron en trozos de 1 a 2 cm de longitud aproximadamente y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril en tres ocasiones y se secaron con papel absorbente estéril. Se colocaron de 10 a 12 trozos de raíces en cajas Petri (cuatro

cajas por árbol muestreado) con medio de cultivo PARPH y se incubaron a 25 °C durante una semana. Al término de este tiempo, se procedió a la detección y aislamiento de *P. cinnamomi* con base en sus características morfológicas y taxonómicas de acuerdo a Zentmyer (1980).

Para la inoculación se utilizó el aislamiento C-38 proveniente de Coatepec Harinas, estado de México, con la finalidad de corroborar la identificación del patógeno y descartar una contaminación en el micelio por otro microorganismo, se llevo a cabo la extracción de su ADN y se envió a secuenciar al laboratorio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

1.2.5. Propagación del inóculo.

Una vez que se confirmó la identidad del aislamiento enviado a secuenciar se procedió a reproducir el micelio de *P. cinnamomi* Rands en medio PDA (papa fresca-dextrosa-agar) y semilla de trigo previamente esterilizada. El patógeno se propagó en cajas Petri (Fisher Scientific, Canada, de 9.0 cm de diámetro) con el medio de cultivo PDA, colocando una rodaja de 0.5 cm de diámetro de crecimiento miceliar proveniente de medio selectivo PARPH y se incubó durante siete días a 25 °C. Para la reproducción del micelio en semillas de trigo, se colocaron las semillas hasta la parte media de los matraces Erlenmyer de un litro de capacidad, posteriormente se cubrió con agua-agar al 0.1%, la semilla se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C durante dos horas por día, dejando un día de reposo entre la primera y segunda esterilización. A cada matraz

se le agregaron 12 rodajas de medio con micelio de *P. cinnamomi* de 0.5 cm y se incubaron durante 15 días a 25 °C.

Inoculación de las plántulas. Se inoculó un total de 5,200 plantas de aguacate, divididas en tres lotes. El primer lote constó de 2,200 plantas (de un año de edad) y propagadas en charolas (Figura 1.2.), inoculadas con una solución de 3×10^5 fragmentos de micelio por litro de suelo, aproximadamente, debido a que cuando se inocula con micelio el número de fragmentos no presenta la misma longitud, además su contabilización se dificulta por la presencia de residuos del medio de cultivo PDA o cualquier otro medio semi-sólido. El segundo lote fue de 2,530 plantas (2000 de un año de edad y 530 de seis meses de edad) propagadas en macetas (Figura 1.2) e inoculadas con una concentración de 9×10^4 trozos o fragmentos de micelio por litro de suelo, aproximadamente. El tercer lote consistió de 470 plantas de seis meses de edad, propagadas en macetas e inoculadas con crecimiento micelial en 300 semillas de trigo por litro de suelo; considerando al menos un propágulo por semilla. La concentración de propagulos o trozos de micelio se obtuvo al licuar, durante un minuto, el contenido de una caja Petri con PDA (elaborado con papa fresca) y crecimiento micelial de ocho días de crecimiento a 25 °C en un litro de agua estéril. Antes de la inoculación de las plántulas se realizó una mezcla total de la solución.

Un trabajo realizado por Gallo *et al* (1999) en las Islas Canarias, España, donde reevaluaron materiales resistentes a *P. cinnamomi* mediante inoculaciones con semillas de trigo con crecimiento micelial de 15 días a 25 °C con una concentración de 250 mL

en macetas de 25 litros. En Malaga, España, se hizo algo similar, dónde se inocularon plantas de aguacate con crecimiento micelial en semillas de trigo con *Rosellinia necatrix*, sin embargo, aquí la dosis se midió en gramos, inoculando 4 g de semilla con micelio en un litro de suelo (Pérez *et al.*, 2003).

Besoain *et al* (2005) evaluaron el efecto de la inundación de sustrato en plántulas de aguacate del cv. Mexicola de 120 días, cada planta se inoculó con 200 mL de una suspensión de 10^6 propágulos de micelio por mL, obtenido a partir de medio de cultivo con jugo de zanahoria.

1.2.6. Evaluación

Durante cuatro años (2004-2008) se registró el número de plantas muertas a partir de los seis meses después de la inoculación con micelio en semillas de trigo y de un año las inoculadas con micelio en medio líquido. El índice o nivel de resistencia de las plantas de aguacate a *P. cinnamomi* se estimó utilizando una escala arbitraria que se realizó considerando los síntomas de marchitez ocasionada por el patógeno y los daños foliares ocasionados por las sales del agua de riego, iniciando con necrosis o “quemadura en las hojas” hasta defoliación de la planta (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Escala arbitraria utilizada para evaluar el grado de daño por *P. cinnamomi*, considerando en ella los síntomas de salinidad ocasionados por el agua de riego.

INDICE	DESCRIPCIÓN
0	Planta sin síntomas.
1	Marchitez leve y hojas de la parte media inferior con bordes necrosados.
2	Marchitez y amarillamiento en hojas inferiores, incluyendo bordes necrosados de las hojas.
3	Marchitez, amarillamiento total y defoliación de la parte media inferior.
4	Planta defoliada.
5	Planta muerta.

1.3. Resultados y Discusión

Las plantas testigo del clon Duke-7, no sobrevivieron más de un año después de ser inoculadas, por el efecto nocivo de la salinidad del agua de riego, ya que Duke-7 no se ha reportado como resistente a salinidad.

Cuatro años después de la inoculación de las plántulas con *P. cinnamomi*, sobrevivieron un total de 38 plantas, consideradas tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* (Cuadro 1.4); de ellas, 30 no mostraron síntomas de la enfermedad (nivel cero de daño) y ocho presentaron una marchitez leve (nivel uno). El 28% de las plántulas sobrevivientes fueron de semilla del Banco de Germoplasma, el 55.2% de las colectas de semilla en el Estado de México y el 15.8% de las colectas en Puebla.

El método de mejoramiento que se utilizó fue el fitomejoramiento poblacional, el cual se basa en la selección masal, en el que sólo los mejores individuos de cada generación llegan a ser padres durante la siguiente (Robinson, 2000). Sin embargo, al momento de la colecta de la semilla se seleccionaron los árboles sobrevivientes en huertos infestados (*in situ*) con el patógeno, aun así, sólo se obtuvo, de las 5,200 semillas inoculadas el 0.73% de sobrevivientes (79% sin síntomas y 21% con nivel uno de daño). Sin embargo, en trabajos realizados por Koekemoer *et al.* (1994) en el año 1992 y 1993 obtuvieron porcentajes de 3.86% y 0.58%, con 12 y 15 plantas tolerantes, respectivamente, partiendo inicialmente de la semilla de 12 árboles únicamente, aunque no mencionan el número total de plántulas inoculadas, sugieren que la selección de portainjertos debe ser a partir de 10, 000 semillas.

Cuadro 1.4. Treinta y ocho genotipos de aguacate sobrevivieron a las inoculaciones de *P. cinnamomi* en 5,200 plantas.

Código	Nivel de daño	Procedencia	Estado
SSC-1	0	Chiquiuntepec, Texcalttlan	México
SSC-2	0	Tenancingo	México
SSC-3	0	Temascaltepec	México
SSC-4	1	Banco de Germoplasma	México
SSC-5	0	Banco de Germoplasma	México
SSC-6	1	Temascaltepec	México
SSC-7	1	Banco de Germoplasma	México
SSC-8	0	Temascaltepec	México
SSC-9	0	Temascaltepec	México
SSC-10	0	San Juan Texhuacan	Puebla
SSC-11	0	Banco de Germoplasma	México
SSC-12	0	Coatepec Harinas	México
SSC-13	0	Santiago Oxtotitlán, Villa Guerrero	México
SSC-14	0	Coatepec Harinas	México
SSC-15	0	Banco de Germoplasma	México
SSC-16	0	Puebla	Puebla
SSC-18	0	San Andrés de los Gamma, Temascaltepec	México

SSC-19	0	Tepetzingo, Tenancingo	México
SSC-21	0	San Andrés T., Almoloya de Alquisiras	México
SSC-22	0	Temascaltepec	México
SSC-23	0	Coatepec Harinas	México
SSC-24	1	Puebla	Puebla
SSC-26	0	Banco de Germoplasma	México
SSC-27	0	Banco de Germoplasma	México
SSC-28	0	Temascaltepec	México
SSC-29	1	Tochimilco, Puebla	Puebla
SSC-30	0	Tochimilpo, Puebla	Puebla
SSC-31	0	Banco de Germoplasma	México
SSC-32	1	Banco de Germoplasma	México
SSC-33	1	Banco de Germoplasma	México
SSC-34	0	Coatepec Harinas	México
SSC-35	1	Banco de Germoplasma	México
SSC-36	0	San Gaspar, Villa Guerrero	México
SSC-37	0	Coatepec Harinas	México
SSC-38	0	Sn. Andrés, Tepetitlan	México
SSC-39	0	Coatepec Harinas	México
SSC-40	0	Puebla	Puebla
SSC-41	0	Coatepec Harinas	México

Para Litz *et al* (2005) la resistencia a *P. cinnamomi* Rands se desconoce en *Persea americana* Mill (subgénero *Persea*), existiendo sólo diferentes niveles de tolerancia al patógeno en los materiales Duke-7 y Toro Canyon, pertenecientes a *P. americana*, un alto nivel de resistencia en las especies del subgénero *Eriodaphne*, las cuales son incompatibles vegetativamente con *P. americana*, excepto la especie *P. longipes* que si es compatible. Sin embargo, se debe continuar en la búsqueda de materiales compatibles a *P. americana*, especie que incluye las principales variedades comerciales como Hass, Fuerte, Colín V.33, entre otras.

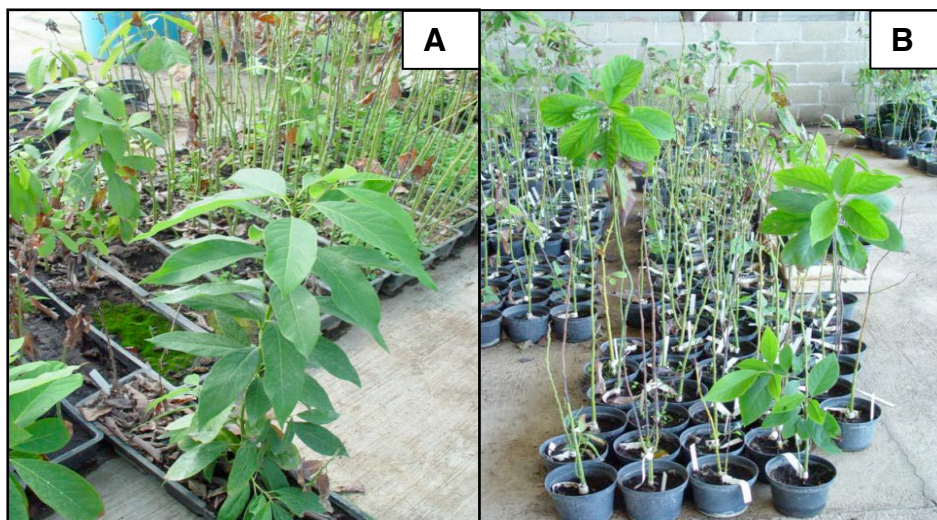


Figura 1.2. Condiciones de la planta a los dos años de la inoculación con *P. cinnamomi* Rands. A: charolas, B: maceta.

1.4. Conclusiones

Se seleccionaron 38 materiales de aguacate tolerantes-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* rands, los cuales pueden ser utilizados como potenciales portainjertos en huertos de aguacate infestados con el patógeno.

Los materiales seleccionados podrían ser utilizados como portainjertos en lugares donde el agua de riego presente hasta 14.2 meq/L de Na^+ y 4.52 meq/L de Cl^- .

1.5. Literatura citada

Barrientos-Priego, A. F., R. B. Muñoz P., J. C. Reyes A., W. Borys M., M. T. Martínez D. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos, pp: 31-62. *In*: El Aguacate y su Manejo Integrado. Téliz, D.; Mora, A. (eds). Mundi Prensa. D.F., México

- Besoain, X., C. Arenas, E. Salgado, y B. A. Latorre. 2005. Efecto del Periodo de Inundación en el Desarrollo de la Tristeza del Palto (*Persea americana*), Causada por *Phytophthora cinnamomi*. Ciencia e Investigación Agraria. 32(2): 97-103.
- Gallo, L. L., S. Pérez Z, y F. Silverio de la Rosa. 1999. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands en patrones de aguacate de raza antillana. Revista Chapingo Serie Horticultura. 5: 275-277.
- Koekemoer, P. J. J., H. J. Breedt, B. Q. Manicom, and Z. Bijzet. Selection of *Phytophthora* tolerant avocado rootstocks. 1994. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 17: 72-74.
- Litz, R.E., Witjaksono, D., Efendi, S. H. T. Raharjo and I. Suarez. 2005. Genetic Transformation of Avocado (*Persea americana* Mill.): A Coordinated Strategy for Crop Improvement. Acta Horticulturae. 692: 131-136.
- Niks, R.E. and W. H. Lindhout. 2004. Curso Sobre Mejoramiento para Resistencia a Enfermedades y Plagas. Tercera Edición. Quito, Ecuador. Fundación Preduza. Department of Plant Breeding, Wageningen University.
- Pérez, J. M., T. Zea B., I. Solano I., F. Pliego A., C. J. López H., y A. Barceló M. 2003. Selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix*. Proceedings V World Avocado Congress. 537-541.
- Robinson, R.A. 2000. Retorno a la Resistencia. Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados; SAGAR, Montecillo, México. Pp. 106.
- Rodríguez, R. F. 1982. El Aguacate. AGT Editor, S.A. D.F. México. Pp. 13-54. 167 p.

Zentmyer, G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. American
Phytopathological Society. 96 p.

CAPITULO II

**IDENTIFICACIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTES-
RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands CON MARCADORES
MOLECULARES**

RESUMEN

Se probaron 25 iniciadores para RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) e ISSR (Secuencias Intergénicas Simples Repetidas) en 41 materiales de aguacate evaluados, 38 de ellos provenientes de una selección masal de 5,200 plántulas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* Rands y tres provenientes de un Banco de Germoplasma ubicado en Coatepec Harinas, estado de México, utilizadas éstas últimas como material referencial en el análisis. El objetivo fue evaluar el polimorfismo entre genotipos, caracterizarlos y detectar la cercanía entre individuos. Para elaborar los dendogramas se utilizó el programa FreeTree Versión 0.9.1.50 considerando un método de remuestreo (“bootstrapping”) con 1,000 repeticiones. La similitud genética se estimó mediante el coeficiente Nei y Li, para el análisis de agrupamientos se utilizó el método UPGMA. Sólo 13 de los iniciadores presentaron polimorfismo; el contenido promedio de información polimórfica (PIC) para RAPD e ISSR fue de 0.9052 y 0.9054, respectivamente y un total de 3057 bandas. El agrupamiento para RAPD e ISSR fue diferente, sin embargo, hay mucha similitud en algunos materiales.

Palabras clave: marcadores moleculares, portainjertos, PCR.

**IDENTIFICATION OF AVOCADO ROOTSTOCKS TOLERANT-RESISTANCE TO
Phytophthora cinnamomi Rands WITH MOLECULAR MARKERS**

ABSTRACT

Twenty five primers were tested for RAPD (random amplified polymorphic DNA) and ISSR (Inter-sequence Simple Repeated) in 41 materials of avocado, 38 of them from mass selection of 5,200 seedlings inoculated with *Phytophthora cinnamomi* Rands from the Germoplasm Bank in Coatepec Harinas, state of Mexico, and used as reference material in the analysis. The objective was the evaluation of polymorphism among genotypes, characterize them and detect the close relationship among individuals. Tree graphs were created with FreeTree Version 0.9.1.50 considering a re-sampling “bootstrapping” method with 1,000 replications. The genetic relationship was estimated by Nei and Li coefficient, and the clusters analysis the UPGMA was used. Only 13 primers showed polymorphism; the average of polymorphic information content (PIC) for RAPD and ISSR was 0.9052 and 0.9054, respectively and a total of 3 057 bands. The cluster for RAPD and ISSR was different; however, there is a close relationship among some materials.

Keywords: Molecular markers, rootstock, PCR.

2.1. Introducción

Los polimorfismos en el ADN tienen su origen en cambios localizados en la secuencia química de las bases nitrogenadas que conforman la molécula, y por lo regular no están asociados con caracteres propios de los organismos (Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente, los cuales permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo y la caracterización de germoplasma (Wilches, 2004).

La generación de marcadores moleculares en aguacate ha sido lenta con respecto a otras especies, sin embargo, éstos nos permiten identificar, clasificar y aprovechar la diversidad genética existente en el genoma de *Persea*, ya que las diferencias o similitudes a nivel del ADN entre individuos se observa en forma directa (Gutiérrez *et al.*, 2009).

La principal aplicación de los marcadores del ADN en el mejoramiento de plantas puede estar representada en la identificación varietal. Por ejemplo, los RFLPs detectan el polimorfismo en variedades de plantas de la misma especie, la combinación particular de los fragmentos hallados para cada cultivo, podría proveer un perfil o patrón único de fragmentos de ADN que puede usarse para la identificación varietal, a

esos patrones se les ha denominado “huellas genómicas” debido a que poseen gran especificidad (Valadez y Kahl, 2000).

La variación a nivel individual o poblacional hace posible encontrar atributos heredables (morfológicos o moleculares) que permiten inferir si los variantes bajo estudio pertenecen o no al mismo organismo, población o especie. La presencia compartida de esos atributos marca la individualidad ontogenética, poblacional o histórica (González, 1998).

El estudio del ADN ha permitido señalar aquellas características que resultan útiles o ventajosas para ciertas especies. Algunas de estas características son la resistencia natural a ciertos patógenos y plagas, un alto nivel de productividad, altura ideal de las plantas, color y otras características de interés agronómico. Para ello, se han desarrollado distintas aplicaciones que buscan conocer la estructura del ADN de los organismos, estudiarlo, identificar y localizar genes de interés, insertar ciertos genes en el ADN de otros organismos para evaluar su expresión; todo ello enmarcado en programas de investigación y fitomejoramiento avanzado.

Sin embargo, los marcadores tipo STS (secuencias blanco simples) tienen limitaciones en el sentido de que se requiere al menos, una mínima cantidad de datos acerca de la secuencia genómica del *loci* de interés, que permita el diseño de los iniciadores apropiados. Estas limitaciones se han superado con el uso de iniciadores de tipo aleatorio en la PCR, que se utilizan en la metodología llamada “Amplificación aleatoria

del ADN polimórfico” (RAPD-randomly amplified polymorphic of DNA), que permite la síntesis de diferentes fragmentos pequeños del ADN. El procedimiento de RAPD es relativamente rápido, puesto que sólo se utilizan pequeñas cantidades de ácido nucleico y no involucra transferencia tipo Southern, ni uso de radioactividad. Usualmente esta técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas que resultan de inserciones o deleciones en las regiones amplificadas, o a partir de cambios de bases en el ADN que alteran la unión del iniciador. Actualmente, los marcadores tipo RAPD, proporcionan un método rápido para generar mapas genéticos y analizar poblaciones. Además, este tipo de metodología puede dirigirse a la búsqueda de regiones monomórficas por marcadores previamente caracterizados y a la captura de regiones o de genes específicos con fines de clonación (Valadez y Kahl, 2000).

La técnica RAPD amplifica ADN genómico con un solo tipo de iniciador con secuencias arbitrarias de nucleótidos. Estos iniciadores detectan polimorfismos que funcionan como marcadores genéticos y pueden usarse para construir mapas genéticos (Williams *et al.*, 1990). La longitud del iniciador es de 10 pares de bases, lo cual es clave en la técnica RAPD, ya que la probabilidad de detectar secuencias complementarias en el genoma de estudio se incrementa (Vidal, 2005).

Recientemente se incrementó en Biología Molecular la utilización de microsatélites o simples secuencias repetidas (SSRs), presumiblemente por su efecto en la organización de cromatina, regulación de actividad de genes, recombinación,

replicación de ADN, ciclo celular, entre otros. Muchos reportes demuestran que un gran número de SSRs se localizan y transcriben en regiones del genoma, incluyendo genes que codifican proteínas y expresan secuencias tags (ESTs- Sitios Etiquetados para la Expresión)). Las ESTs tienen funciones como; metabolismo enzimático, estructural, y almacenaje de proteínas, las cuales señalan enfermedades y factores de transcripción, sugiriendo alguna función en el metabolismo de plantas y evolución de genes. (Li *et al.*, 2004).

En plantas y humanos, se ha encontrado que las secuencias de oligonucleótidos complementarias a minisatélites y microsatélites en el ADN, por ejemplo las secuencias (GACA)₄, (GATA)₄, (GTG)₅, entre otras, representan una herramienta de mucha utilidad para obtener dichas huellas. Estas proporcionan una opción de paternidad en plantas y en la identificación de algunos de sus patógenos, así como su caracterización genómica. Las huellas de ADN también aportan una forma conveniente de calcular la heterogeneidad dentro de líneas mantenidas como fuentes de germoplasma (Valadez y Kahl, 2000).

Los microsatélites tienen una arquitectura parecida a los minisatélites, ya que las secuencias motivo están también repetidas en serie, pero son más pequeños, sólo se han identificado de 2 a 10 pares de bases como unidad básica (Valadez y Kahl, 2000).

Los ISSR o microsatelites no requieren de un conocimiento previo de la secuencia del ADN en estudio, son relativamente rápidos, emplean bajas cantidades de ADN y generan polimorfismos distinguibles aun entre individuos de relación genética cercana

(Lara *et al.*, 2003). Esta técnica es de utilidad, porque aun es parecida a la de RAPD (ya que el iniciador es de un solo tipo), las regiones amplificadas no son aleatorias, debido a que una característica de los ISSR es que se mantienen conservados entre las especies y la variabilidad entre sus integrantes (individuos) puede detectarse de manera dirigida con este tipo de iniciadores (Vidal, 2005).

En el fitomejoramiento, la selección de plantas apoyada por marcadores genéticos ha sido la más utilizada, debido a que permite identificar aquellas de interés desde estados tempranos de desarrollo. La selección apropiada de la planta en estas condiciones, reduce el tiempo para obtener aquel genotipo que tenga un potencial genético deseable, sin necesidad de esperar su madurez y evaluación en ambientes diferentes.

En la actualidad, para realizar análisis genéticos, los investigadores prefieren usar el polimorfismo que contiene el ADN de los organismos con respecto a los marcadores bioquímicos. Esta decisión tiene que ver con dos aspectos principales: primero, porque los polimorfismos son mucho más abundantes, ya que se encuentran distribuidos en todo el genoma; es decir, tanto en el ADN codificante, como en el ADN no codificante; segundo, porque su presencia no es afectada por el ambiente o expresión de tejidos específicos (como el caso de las isoenzimas), debido a que son estrictamente genéticos (Valadez y Kahl, 2000).

Considerando las aplicaciones que pueden tener los marcadores moleculares en el presente estudio, se centró en la caracterización molecular mediante polimorfismos de 38 plántulas de aguacate sobrevivientes a la inoculación con *Phytophthora cinnamomi*

Rands de 5,200 semillas de árboles criollos en los estados de México, Querétaro y Puebla.

2.2. Materiales y métodos

Los materiales se caracterizaron mediante marcadores RAPD e ISSR (Cuadro 2.1 y 2.2, respetivamente). Treinta y ocho materiales de aguacate sobrevivientes de una selección masal de 5,200 plántulas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* y regadas con aguas salinas. Para el tratamiento con agua salina, según Ortiz (1997), solo las que sobreviven pueden ser utilizadas como cultivos altamente tolerantes o tolerantes a la salinidad. Las plantas que sobrevivieron durante cuatro años fueron utilizadas en ésta investigación, además de incluir tres testigos de referencia para comparación: Duke-7, Topa-Topa y Day. La caracterización molecular de los materiales se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Interacción Planta-Patógeno del Instituto de Fitosanidad en el Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco.

2.2.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico total se hizo de brotes vegetativos con el método descrito por Ahrens y Seemüller (1992). La concentración de ADN se midió mediante un espectrofotómetro de Perkin Elmer Lambda Bio 10. La mezcla de reacción utilizada en la PCR consistió de: 12.95 µl de agua bidestilada estéril, 2.5 µl de amortiguador

10X, 1.25 μl de MgCl_2 30 mM, 2.0 μl de dNTPs 2.5 mM, 2.0 μl del iniciador 10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 0.3 μL de taq. amplificasa 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, y 4.0 μL de ADN genómico a 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ sumando un volumen en un final de 25 μl por tubo de reacción de PCR.

Las amplificaciones con ambas técnicas (RAPD e ISSR), se hizo en un termociclador (iCycler de Bio Rad®); el programa de amplificación para RAPD fue de un ciclo 94 °C, 1 min; 38 ciclos 94 °C, 30 s; 35 °C, 30 s; 72 °C, 1 min 30 s; y 72 °C, 2 min 30 s. Para los ISSR el programa fue de un ciclo 93 °C, 1 min; 40 ciclos 93 °C, 20 s; 48 °C, 1 min; 72 °C, 20 s; y 72 °C, 6 min. Los productos de amplificados se separaron en gel de agarosa al 3% usando como amortiguador para electroforesis TBE 1X durante 3 y 4 horas a 80 V, para RAPD e ISSR, respectivamente. En cada electroforesis, las muestras fueron bordeadas con marcador de peso molecular de 1Kb y 100 pb. Finalmente los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se fotodocumentaron en un transiluminador de luz UV, modelo Gel Doc 2000 (Bio Rad) utilizando el software Quantity One.

2.2.2. Análisis estadístico

De los perfiles de ADN generados por cada iniciador de RAPD e ISSR, cada banda fue considerada como un locus independiente, las cuales se codificaron visualmente como polimórficas ausentes (0) o presentes (1) en cada uno de los genotipos, sin considerar las diferencias cualitativas entre bandas. La matriz binaria de datos se generó con la información molecular de cada método. La similitud genética se estimó mediante el

coeficiente de Nei y Li y para el agrupamiento se utilizó el método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA). Para la obtención del dendograma de similitud entre los genotipos de aguacate evaluados, se utilizó el software FreeTree, Versión 0.9.1.50 seleccionando la instrucción para un remuestreo (“bootstrapp”) a partir de la matriz binaria con 1,000 repeticiones generando un dendograma consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir *et al.*, 2001) y para la visualisualizacion del mismo se usó el software TreeView, Versión 0.5.0.

El método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética, agrupa ramas en un dendogram basándose en el criterio de maximizar la similitud entre pares y entre promedios de pares ya unidos generando una ubicación topología mas acertada de los individuos evaluados (Page y Holmes, 1998). Y para tener mayor certeza de las relaciones genéticas que se observan entre los individuos evaluados del dendograma, se recurre al análisis bootstrap, el cual consiste en un remuestreo con remplazo a partir de los datos originales, es decir, en una operación de remuestreo una columna de datos no serán consideradas mientras que otras serán cosideradas mas de una vez y se reconstruye el dendograma. Si el dendograma que se reconstruye a partir de los datos remuestreados es similar al de los datos originales entonces incrementa la confianza de los datos, pero si es muy distinto, entonces indica que son individuos muy heterogéneos. A mayor número de remuestreos es posible asignar un grado de confianza de los grupos que se conforman en el dendograma. Es decir, que del total de remuestreos y sus dendogramas recostruidos, se genera un dedograma consenso con

el porcentaje de coincidencia de cada grupo que lo conforma indicandonos el soporte bootstrap de cada grupo y la confianza en la monofilia de cada grupo será mayor entre mayor sea el bootrap (Page y Holmes, 1998).

Para la obtención del contenido de información de polimorfismo (PIC) se utilizó la fórmula $PIC= 1-\sum^n (p_i)^2$. Donde: p_i = frecuencia del i-ésimo alelo del número total de alelos y n = número de diferentes alelos en la muestra.

Cuadro 2.1. Iniciadores utilizados para la caracterización de los materiales de aguacate.

Sistema	Iniciador	Secuencia
RAPD	C- 8	TGG ACC GGT G
	A-04	AAT CGG GCT G
	C-13	AAG CCT CGT C
	A-17	GAC CGC TTG T
	C-10	TGT CTG GGT G
	E-18	GGA CTG CAG A
	E-16	GGT GAC TGT G
	E-14	TGC GGC TGA G
ISSR	(AC) 8G	ACA CAC ACA CAC ACA CG
	(GA) 8C	GAG AGA GAG AGA GAG AC
	(TCC) 5RY	TCC TCC TCC TCC TCC RY
	GACA – 4	GAC AGA CAG ACA GAC A
	DBDA (CA) ₇	DBD ACA CAC ACA CAC ACA

Iniciadores sintetizados en Invitrogen life technology.

2.3. Resultados y discusión

Los análisis de la matriz de datos binarios codificados de los perfiles de ADN generados por RAPD e ISSR indicaron la existencia de variabilidad genética entre los

materiales analizados en el presente estudio. De los 25 iniciadores evaluados inicialmente, se seleccionaron 13 para el análisis molecular de los genotipos de aguacate. Los cuales, generaron altos polimorfismos, con un total de 3057 bandas, con una media de 235.15 bandas por iniciador, demostrando con ello la diversidad genética que existe entre los materiales estudiados. En un trabajo realizado por Fiedler *et al* (1998) en 16 accesiones de aguacate representando las tres razas (Mexicana, Antillana, Guatemalteca) de *Persea americana* Mill y una accesión de *Persea schiedeana* Nees, utilizando 22 iniciadores, sólo produjeron 133 fragmentos polimórficos de ADN mediante RAPD, concluyendo que este tipo de marcadores pueden ser de utilidad para la clasificación del aguacate, así como evaluar la diversidad genética de su germoplasma.

La media del contenido de información polimórfica (PIC) para RAPD e ISSR fue de 0.9053. El promedio del PIC y total de fragmentos polimórficos de ADN para RAPD e ISSR fueron de 0.9052 y 0.9054 con 1640 y 1417 bandas, respectivamente (Cuadro 2.2.). El PIC representa el grado de polimorfismo que es capaz de detectar un determinado marcador molecular. Si el PIC es bajo indicaría un escaso número de alelos en ese locus, sin embargo, los resultados del presente estudio mostraron PIC altos, lo cual indica niveles altos de polimorfismo y por consiguiente de variabilidad genética. González (1998) mencionó que los polimorfismos se deben a la variación discontinua y de base genética asociada a procesos no sexuales, los cuales pueden ser conspicuos o no y son consecuencia de alteraciones en el ADN, provocadas por mutaciones o recombinación. La variación a nivel individual o poblacional hace posible

encontrar atributos heredables (morfológicos o moleculares) que permiten inferir si las variantes bajo estudio pertenecen o no al mismo organismo, población, o especie. La presencia compartida de esos atributos marca la individualidad ontogenética, poblacional o histórica.

Cuadro 2.2. Nivel de polimorfismo obtenido con 13 iniciadores para RAPD e ISSR en 41 materiales de aguacate (*Persea spp.*).

Sistema	Iniciador	Secuencia	Total de bandas ²	PIC
RAPD				
	C- 8	TGG ACC GGT G	200	0.8873
	A-04	AAT CGG GCT G	217	0.8871
	C-13	AAG CCT CGT C	231	0.9451
	A-17	GAC CGC TTG T	224	0.9494
	C-10	TGT CTG GGT G	83	0.8515
	E-18	GGA CTG CAG A	254	0.9106
	E-16	GGT GAC TGT G	201	0.8902
	E-14	TGC GGC TGA G	230	0.9206
ISSR				
	(AC) 8G	ACA CAC ACA CAC ACA CG	370	0.9327
	(GA) 8C	GAG AGA GAG AGA GAG AC	344	0.9374
	(TCC) 5RY	TCC TCC TCC TCC TCC RY	180	0.8441
	GACA – 4	GAC AGA CAG ACA GAC A	224	0.8951
	DBDA (CA) ₇	DBD ACA CAC ACA CAC ACA	299	0.9180

Iniciadores sintetizados en Invitrogen life technology. ² total de fragmentos de ADN. PIC= Contenido de información polimórfica.

El método de análisis indicado en la metodología y al que fue sometida la matriz binaria obtenida de los iniciadores RAPD generó un dendograma, en el cual fue posible identificar tres grupos o clados, que fueron calculados por el índice de Nei y Li. Para determinar la confianza en los coeficientes de similitud donde se forman los nodos, los datos fueron nuevamente sometidos a bootstrap con 1000 repeticiones, generando un

dendograma consenso con un grado de confiabilidad para cada grupo (Figura 2.1). En el primer grupo se ubicaron 24 genotipos muy heterogéneos ya que la confiabilidad bootstrap entre ellos fue pobre registrándose valores de 1% y 46%, respectivamente. También fue posible distinguir dos subgrupos (I. A y I. B). Además, dentro de éste grupo se ubicó un genotipo de referencia: Topa-Topa (susceptible), coincidiendo con una confiabilidad del 24% con el individuo SSC 37, la ubicación del genotipo de referencia dentro de este clado posiblemente se asocia a un marcador de susceptibilidad. Por el contrario, en el grupo II se ubicó el genotipo de referencia Day 53 con una confianza de similitud del 66% con SSC-2; el material Day se considera un portainjerto excelente en condiciones de *P. cinnamomi* y salinidad, además se adapta a suelos calcáreos (Ben-Ya'acov *et al.*, 1992), así, el material SSC-2 es prometedor bajo éstas condiciones según el análisis con marcadores RAPD. El grupo III genéticamente se ubica en el punto intermedio entre los clados I y II pero más próximo al Duke-7, obtenido en selecciones de aguacate en California y considerado por Coffey (1987) como un material de tolerancia media. Los materiales SSC-10, SSC-32 y SSC-38 se ubicaron fuera del resto de los genotipos, lo cual indica que podrían comportarse con mayor resistencia a *P. cinnamomi* en campos infestados por el patógeno.

Cabe aclarar, que los materiales Topa-topa, Day y Duke-7 no fueron sometidos a los tratamientos que los materiales SSC, debido a que el Duke 7 (utilizado como testigo) en la selección de materiales SSC no sobrevivió a las condiciones del experimento, por lo cual el follaje se colectó de los materiales del Banco de Germoplasma ubicado en Coatepec Harinas, Estado de México y utilizados en éste análisis sólo como referencia.

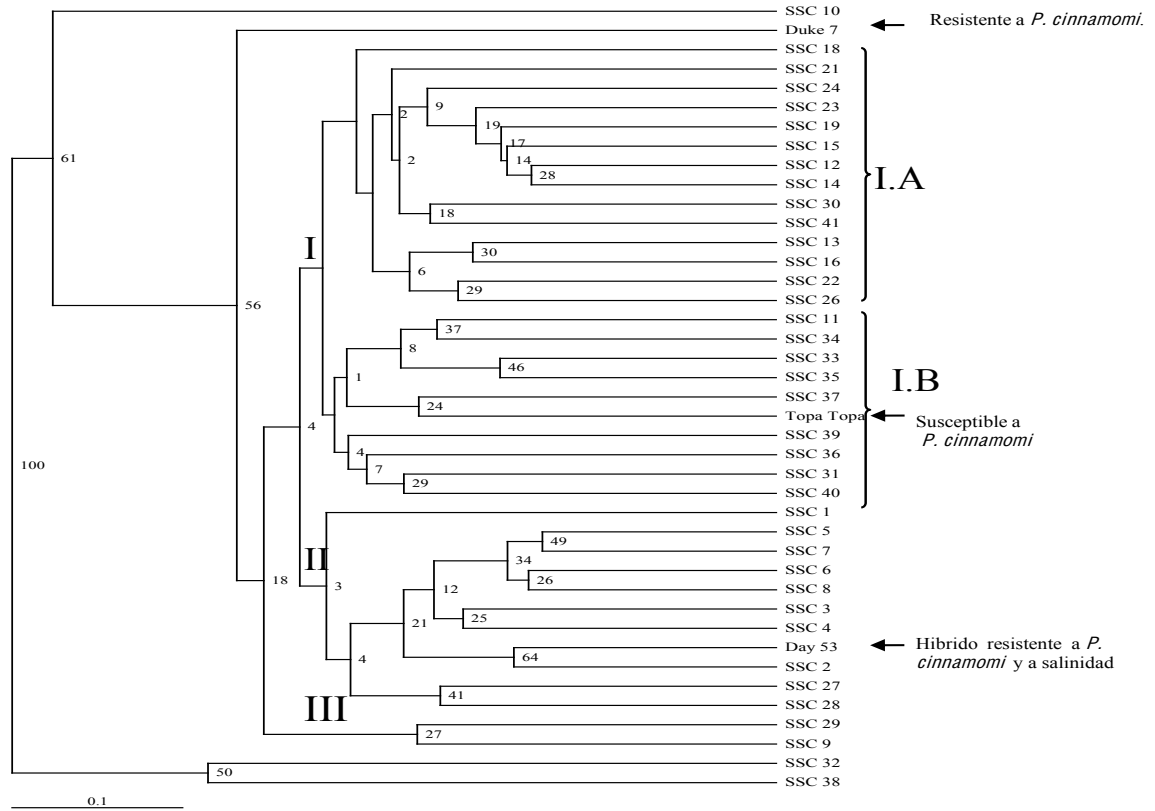


Figura 2.1. Dendrograma consenso de 41 genotipos de aguacate (*Persea* spp.), generado de la matriz de datos binarios con 8 iniciadores de RAPD. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación con UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones

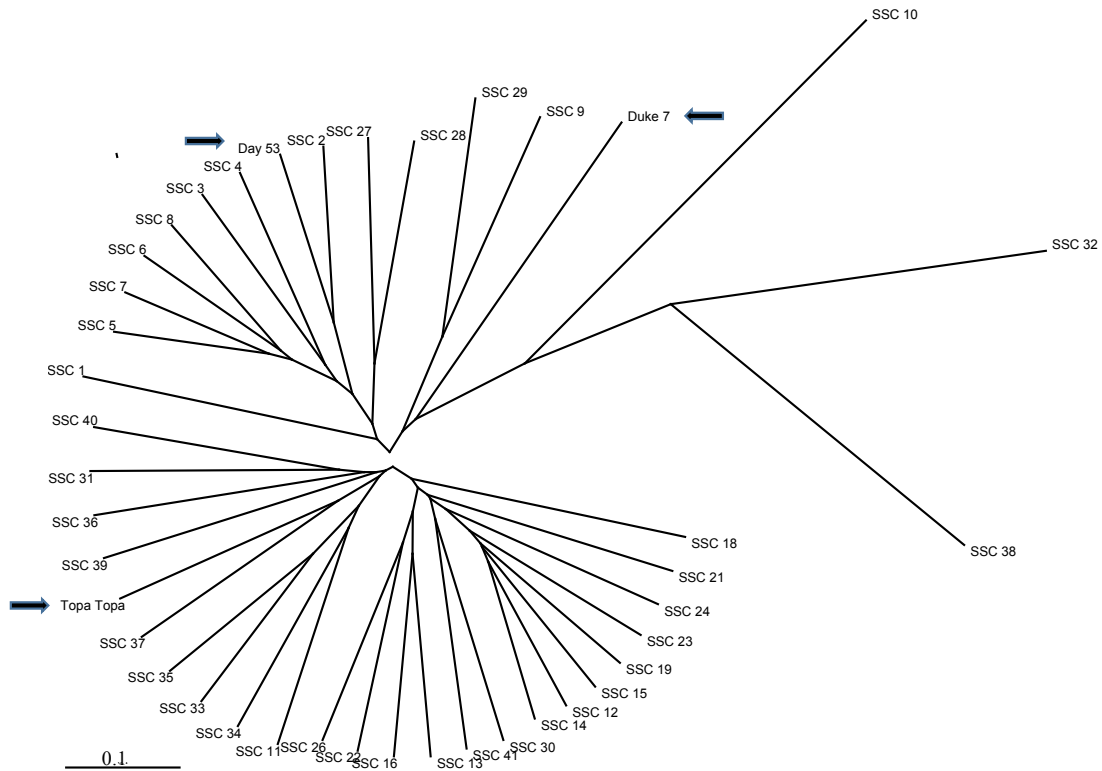


Figura 2.2. Dendrograma consenso sin raíz de 41 genotipos de aguacate (*Persea* spp.), generado de la matriz de datos binarios con 8 iniciadores de RAPD. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación por UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones.

En el dendrograma sin raíz (Figura 2. 2.) generado de los mismos cálculos del dendrograma anterior, identificando claramente los grupos por distancias genéticas; de los genotipos utilizados como individuos de referencia, aquellos considerados como resistentes o tolerantes (Day 53 y Duke 7) están mas alejados del susceptible. Por lo que los individuos SSC más próximos a los genotipos resistentes, posiblemente presenten marcadores moleculares de ADN visibles en un gel de agarosa o poliacrilamida.

Con los datos obtenidos con los iniciadores ISSR se generó un dendrograma con un número mayor de clados que en el dendrograma generado con los indicadores RAPD

(Figura 2.3). El grupo I se conformó de 18 individuos, 10 materiales coincidieron con el grupo I del dendograma generado con RAPD (34, 35, 33, 31, 30, 41, 19, 11, 21 y 18, respectivamente), además en el subgrupo I. A seis individuos coinciden con el grupo II de RAPD. Los individuos del grupo I en general fueron bastante heterogéneos entre sí ya que se distribuyeron en dos subclados, denotados como I. A y I. B, respectivamente. En el grupo II se ubicaron 7 individuos. Los genotipos SSC- 2 y SSC-39 se consideraron como grupos individuales (III y IV, respectivamente). Los grupos VII y VIII se compone de tres y un individuo, respectivamente. Es evidente que los individuos usados como referencia genética se alejaron de los individuos SSC. Así, en el clado IX se ubicaron dos de los materiales o genotipos referenciales; Day 53 y Topa-Topa, este último con una confiabilidad o robustez del 44% al agruparse con el SSC-27. Entre el clado IX y el Duke-7 (se comportó como un individuo fuera de grupo), se ubicaron el SSC-10, SSC-36 y SSC-38, respectivamente.

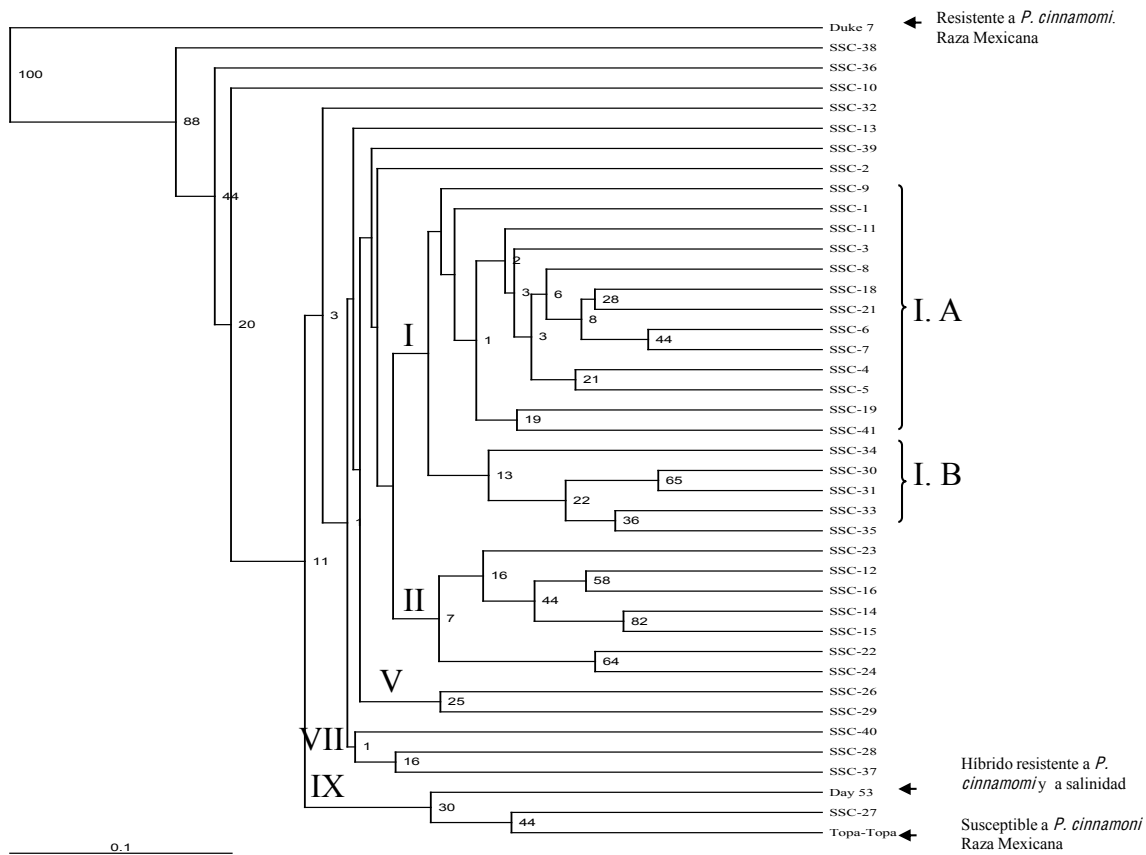


Figura 2.3. Dendrograma consenso de 41 materiales de aguacate (*Persea* spp.) generado de la matriz binaria con cinco iniciadores de ISSR. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación por UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones.

Los materiales SSC-10 y SSC-38 se mantuvieron fuera de grupo tanto en RAPD como en ISSR, confirmando con ello una diferencia genética con el resto de los materiales. La diferencia entre germoplasmas de *Persea* es diversa, pues Sharon *et al* (1997) mencionan que el número de microsatélites predecibles en el aguacate es de aproximadamente 45,200 y según Lavi *et al* (1991) pueden ser utilizados en la caracterización y diferenciación de razas hortícolas de aguacate.

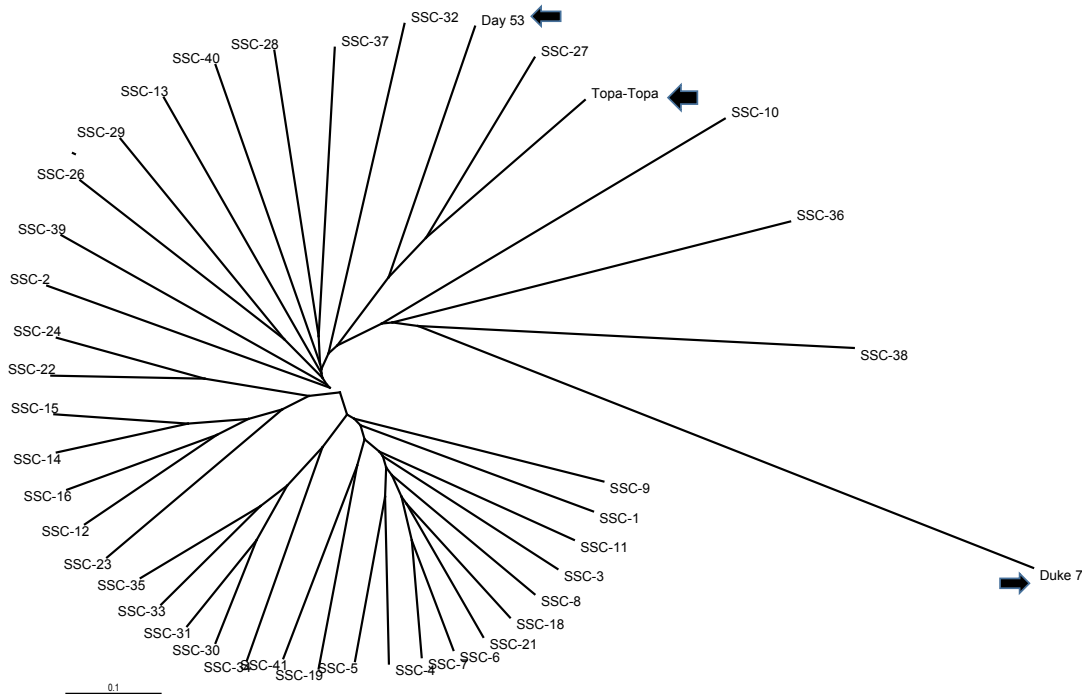


Figura 2.4. Dendrograma consenso sin raíz de 41 materiales de aguacate (*Persea* spp.) generado de la matriz binaria con cinco iniciadores de ISSR. El análisis se realizó con el índice Nei y Li y la agrupación por UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones.

En el dendrograma sin raíz (Figura 2.4) generado de los mismo cálculos del dendrograma anterior (Figura 2.3), se identificó claramente un grupo definido, el resto de los individuos resultaron ser heterogéneos, debido a que presentaron una mayor número de nodos. De los genotipos Day 53 y Duke-7 utilizados como resistentes o tolerantes a *P. cinnamomi*; se agruparon a mayor distancia que los SSC evaluados. Los materiales SSC-10 y SSC-38 genéticamente se ubicaron más cerca del Duke-7 tanto en RAPD como en ISSR.

2.4. Conclusiones

De acuerdo a los resultados en los dendogramas de RAPD e ISSR, los materiales SSC-10 y SSC-38 son los más prometedores como fuente de resistencia en estudios posteriores.

2.5. Literatura citada

- Ahrens, U. and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Ben-Ya'acov, A., M. Zilberstaine and I. Sela. 1992. A study of avocado germoplasm resources, 1988-1990. V. The evaluation of the collected avocado germoplasm material for horticultural purposes. *Proceedings II World Avocado Congress, Riverside, USA*. Pp. 559-562.
- Coffey, D. M. 1987. Phytophthora root rot of avocado an integrated approach to control in California *Avocado Society Yearbook* 71: 121-132.
- Fiedler, J., G. Bufler, and F. Bangerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea Americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica*. 101: 249-255.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en Ecología y Sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.

- Gutiérrez, D. A., J. Martínez de la Cerda., E. A. García Z., L. Iracheta-D., J. D. Ocampo M., I. M. Cerda H., 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32(1): 9-18.
- Lara, A., R. Valverde, O. Rocha, y L. Gómez. 2003. Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotria acuminata* en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 27(2): 29-42.
- Lavi, U., M. Akkaya, A. Bhagwat, E. Lahav, and P. B. Cregan. 1994. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea Americana* Mill.). *Euphytica* 80: 171-177.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, and E. Nevo. 2004. Microsatellites within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular biology and evolution*. 21(6): 991-1007.
- Ortíz, O. M. 1997. La calidad de las aguas de riego. Universidad Autónoma Chapingo. 53 p.
- Page, R. D. M. and E.C. Holmes. 1998. *Molecular Evolution: a phylogenetic approach*. Ed. Blackwell Science. USA.
- Sharon, D., P. Cregan, B., S. Mhameed, M. Kusharska, J. Hillel, E. Lahav. and U. Lavi. 1997. An integrated genetic linkage map of avocado. *Theoretical Applied Genetics*. 95: 911-921.
- Tapia, P. D., y J. Legaria P. S. 2007. Variabilidad genética en cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 30(4): 391-401.
- Valadez, M., E. y G. Kahl. 2000. *Huellas de ADN en Genoma de Plantas*. Mundi Prensa. D. F., México. 147 p.

- Vidal, B. A. 2005. Caracterización de la diversidad morfológica y molecular de cultivares criollos y mejorados de frijol común del trópico húmedo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 102 p.
- Vladimir H., A., Puvlíček. and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Wilches M. A. V. 2004. Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. Serie técnica No. 5. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas. Universidad Rafael Landívar. Guatemala. 36 p.
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18 (22): 6531-6535.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE AGUACATE TOLERANTES- RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands PROVENIENTES DE UN BANCO DE GERMOPLASMA

RESUMEN

Se probaron 25 iniciadores para RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) e ISSR (Secuencias Intergénicas Simples Repetidas) en 16 accesiones de aguacate provenientes de un Banco de Germoplasma, ubicado en Coatepec Harinas, estado de México. Catorce de los materiales presentan resistencia en campo a *Phytophthora cinnamomi* Rands y dos presentan características de susceptibilidad. El objetivo del análisis fue evaluar el polimorfismo entre genotipos, caracterizarlos y detectar la cercanía entre individuos. Para elaborar los dendogramas se utilizó el programa FreeTree Versión 0.9.1.50 considerando un método de remuestreo ("bootstrap") con 1,000 repeticiones. La similitud genética se estimó mediante el coeficiente Nei y Li y para el análisis de agrupamientos se utilizó el método UPGMA. Sólo 13 de los iniciadores presentaron polimorfismo; el contenido promedio de información polimórfica para RAPD e ISSR fue de 0.910 y 0.919, respectivamente. El agrupamiento para RAPD e ISSR fue diferente, sin embargo, hay mucha similitud en los materiales, Olanca 2S1 y Olanca 3S1, y Olanca 2 Clon con *Persea floccosa*, además, se detectó similitud del material ScrMer7-S2 con materiales que han presentado mayor resistencia a *P. cinnamomi* en campo.

Palabras clave: *Persea*, RAPD, ISSR, marcadores moleculares.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AVOCADO TOLERANT-RESISTANT TO
TO *Phytophthora cinnamomi* Rands FROM BANK GERMOPLAM**

ABSTRACT

Twenty five primers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) were evaluated in 16 accesions of avocado trees. This accesions come from the Germplasm Bank in Coatepec Harinas, state of Mexico. Fourteen materials showed resistance in field to *Phytophthora cinnamomi* Rands and two showed to be susceptible. The objectives of this study were to determine polymorphism within genotypes, characterize them and detect close relationship within individuals. The close relationship genetic was measured with Nei and Li coefficient and clusters generated were analyzed with UPGMA method. The tree was created with the FreeTree software, version 0.9.1.50 and considered as re-sampling method (bootstrapping) with 1,000 replications. Thirteen primers showed polymorphism within genotypes; the average of polymorphic information for RAPD and ISSR was 0.910 and 0.919, respectively. Clusters generated for RAPD and ISSR were different. However, there is close relationship with Olanca 2S3 and Olanca 3S1, and Olanca 2 Clon and *Persea flocosa* materials. Moreover, there was a close relationship of ScrMer7-S2 material with materials that showed high resistance to *P. cinnamomi* in field.

Keywords: *Persea*, RAPD, ISSR, molecular markers.

3.1. Introducción

El aguacate *Persea americana* Mill. es una planta perenne subtropical originaria de México y su fruto es consumido mundialmente. En la década de 1940 se descubrió la pudrición en raíces de aguacate, ocasionada por el patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands, y principal enfermedad del cultivo, en esa misma década que inició la búsqueda de portainjertos tolerantes a dicha enfermedad (Barrientos *et al.*, 2007). Sin embargo, en la actualidad sólo se tiene resistencia moderada con el portainjerto Duke-7 y colecciones de diversos tipos de aguacate nativos de América Latina, así como, selecciones de portainjertos en California, Estados Unidos de América, como: G6, G22, G166, G335, G592, Wurtz, Huntalas, criollos tolerantes al patógeno, y especies del subgénero *Eriodaphne*, pero incompatibles vegetativamente (Bergh, 1992), a excepción de *Persea longipes*, procedente de Veracruz, México (Barrientos *et al.*, 2007). Actualmente, el material Dusa de Sudáfrica promete buenos resultados como portainjerto resistente. Para el mejoramiento genético en frutales, la evaluación de caracteres morfológicos significa una espera de varios años (Azofeifa, 2006); no obstante, los avances en Biología Molecular durante la década de 1980 aportaron una clase nueva de marcadores genéticos que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Este tipo de marcadores detecta variaciones directas y tienen la ventaja de ser dominantes o codominantes, desarrollarse de manera estable, carecer de efectos pleiotrópicos y de no estar sujetos al ambiente en donde se desarrolla el organismo de estudio (Valadez y Kahl, 2000).

Esto hace de los marcadores una herramienta útil y rápida, comparado con los análisis genéticos a nivel morfológico.

Actualmente, los marcadores tipo RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), proporcionan un método rápido para generar mapas genéticos y analizar poblaciones. Este tipo de metodología puede dirigirse a la búsqueda de regiones monomórficas por marcadores previamente caracterizados y a la captura de regiones o de genes específicos con fines de clonación. Por otro lado, los microsatélites, también conocidos como secuencias simples, dan lugar a la obtención de patrones de bandeo individuales y específicos que se utilizan para la obtención de huellas genómicas. Los diferentes patrones de bandeo que exhibe el genoma de los organismos, pueden traducirse a árboles filogenéticos o dendogramas mediante métodos estadísticos y programas de cómputo, lo que permite definir de manera más clara la relación a nivel de ADN entre individuos de una determinada población (Valadez y Kahl, 2000). Recientemente se incrementa la utilización de microsatélites o simples secuencias repetidas (SSRs) por su efecto en la organización de cromatina, regulación de actividad de genes, recombinación, replicación de ADN, ciclo celular, entre otros. Reportes demuestran que un gran número de SSRs se localizan y transcriben en regiones del genoma, incluyendo genes que codifican proteínas y expresan secuencias tags (ESTs). Las ESTs tienen una amplitud de funciones, tales como, metabolismo enzimático, estructural y almacenaje de proteínas, señalando enfermedades y factores de transcripción, sugiriendo alguna función en el metabolismo de plantas y evolución de genes (Li *et al.*, 2004).

En el fitomejoramiento, la selección de plantas es apoyada por marcadores genéticos y la más utilizada, debido a que permite identificar plántulas de interés desde estados tempranos de desarrollo. La selección apropiada de la planta en estas condiciones, reduce el tiempo para obtener el genotipo con el potencial genético deseable (Valadez y Kahl, 2000).

Los recursos genéticos del aguacate son una fuente única de genes, los cuales pueden utilizarse para el mejoramiento genético de cultivares, portainjertos e interinjertos (Barrientos *et al.*, 2007). El aguacate se clasifica en tres grupos ecológicos o razas básicas: Mexicana, Guatemalteca y Antillana. La raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), originaria de los valles de México en alturas de 1,500 a 2,000 m.s.n.m. Las hojas presentan un característico olor a anís que la diferencia de otras razas y es la más resistente a bajas temperaturas. La raza Guatemalteca, originaria de Guatemala, se desarrolla en alturas de de 500 a 1,000 m.s.n.m. Las hojas son inodoras y los brotes nuevos son de color rojo violáceo. La resistencia al frío respecto a las otras razas es intermedia. La raza Antillana, se dice que su origen es en las Antillas, sin embargo, no hay pruebas que confirmen éste hecho. La raza se sitúa en alturas menores a 500 m.s.n.m., se adapta a lugares cálidos y con alta humedad relativa. Las hojas no tienen aroma a anís y los brotes nuevos inicialmente tienen una coloración rojiza, posteriormente verde y finalmente amarillo-verde (Rodríguez, 1982). Debido a la gran diversidad que presenta el género *Persea*, el objetivo de este estudio fue evaluar el polimorfismo entre genotipos resistentes a *P. cinnamomi* procedentes de un Banco de Germoplasma, caracterizarlos y detectar la cercanía entre individuos.

3.2. Materiales y métodos

En esta investigación se utilizaron 16 accesiones de aguacate (*Persea* spp), 14 materiales tolerantes-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands y dos susceptibles, los cuales incluyen a las razas Antillana, Mexicana y Guatemalteca, así como híbridos y especies distintas a *Persea americana* Mill, provenientes de un Banco de Germoplasma en Coatepec Harinas, estado de México. Para cada material evaluado (Cuadro 3.1) se tomaron por separado hojas jóvenes y sanas, se etiquetaron y transportaron al laboratorio de Biología Molecular en el Colegio de Postgraduados donde se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis molecular.

Cuadro 3.1. Genotipos de *Persea* del Banco de Germoplasma tipificados mediante RAPD e ISSR en el estudio.

Número de Colecta	Origen de la Muestra	Nombre designado	Número en el Lote	Especie, Raza o Parentesco	Modo de Conservación ^z
CH-C-29	España	Indica	1	<i>Persea indica</i>	S
CH-I-3	México vía Israel	Floccosa	10	<i>Persea floccosa</i>	I
CH-C-62	Guatemala vía EEUU	Martín Grande C	19	Híbrido <i>Persea schiedeana</i> x <i>Persea americana</i> var. <i>Guatemalensis</i>	C
CH-G-9	México	Olanca2 C	25	Guatemalteca	C
CH-C-22	México	Almoloya C	28	Mexicana	C
CH-C-63	México	Tepetl	46	Mexicana	C
CH-I-7	Israel	Day	53	Híbrido	I
CH-G-76	México	Rodeo 1	70	<i>Persea nubigena</i>	I
CH-CR-28	Costa Rica	Marichal	102	Antillana	S
CH-G-10	México	Olanca2 S3	114	Guatemalteca	I
CH-G-11	México	Olanca3S1	116	Guatemalteca	I
	México	Topa-Topa	s/n	Mexicana	

Número de Colecta	Origen de la Muestra	Nombre designado	Número en el Lote	Especie, Raza o Parentesco	Modo de Conservación ^z
	California	Duke 7	146	Mexicana	C
CH-CR-25	Costa Rica	Las Nubes	104	Antillano	S
	California	Thomas	103	Mexicana	C
CH-G-7	México	Sn. Cristobal SCRmr	63	Guatemalteca	I

S: semilla; I: injerto; C: Clon, s/n: sin número en el lote.

Para el estudio de la diversidad genética de las 16 accesiones de *Persea* se utilizaron marcadores RAPD e ISSR (Cuadro 3. 2). Los materiales seleccionados presentan tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* Rands en campo, excepto el ‘Topa-Topa’ que es conocido por su susceptibilidad al patógeno (Zentmyer *et al.*, 1977) y el *Persea indica* que también se ha comportado como susceptible en campo. La metodología de extracción de ADN genómico y análisis estadístico es la misma que la presentada en el capítulo anterior.

3.3. Resultados y discusión

Los análisis de RAPD e ISSR indicaron la existencia de variabilidad genética entre los materiales de *Persea*. De los 25 iniciadores evaluados, sólo 13 generaron polimorfismos y complejidad en el patrón de bandeo, con un total de 1275 bandas, 74.69 bandas por iniciador y una media del contenido de información polimórfica (PIC) de 0.914. El promedio del PIC y total de fragmentos polimórficos de ADN para RAPD e ISSR fueron de 0.910 y 0.919 con 491 y 480 bandas, respectivamente. El PIC representa el grado de polimorfismo que es capaz de detectar un determinado

marcador molecular. Si el PIC es bajo, indicaría un escaso número de alelos en ese locus, sin embargo, los resultados del presente estudio mostraron valores PIC altos, lo cual indica niveles altos de polimorfismo y por consiguiente de variabilidad genética. González (1998) mencionó que los polimorfismos se deben a la variación discontinua y de base genética asociada a procesos no sexuales, los cuales pueden ser conspicuos o no y son consecuencia de alteraciones en el ADN, provocadas por mutaciones o recombinación. La variación a nivel individual, poblacional o específico hace posible encontrar atributos heredables (morfológicos o moleculares) que permiten inferir si las variantes bajo estudio pertenecen o no al mismo organismo, población, o especie. La presencia compartida de esos atributos marca la individualidad ontogenética, poblacional o histórica.

El análisis de agrupamiento se realizó con el método UPGMA y generó dos dendogramas consenso, uno para RAPD y otro para ISSR, los cuales se construyeron a partir de los valores del índice de similitud. El dendograma para los iniciadores RAPD se conformó por dos grupos principales (I y II). En el grupo I, se agruparon los materiales: Las nubes 104, *Persea nubigena*, Olanca 2S3 114, Olanca 3S1 116, Day 53, Marichal 102 y Tepetl, todos con tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands en campo, incluidas dentro de éstos materiales las diferentes razas ecológicas del aguacate (Antillana, Mexicana y Guatemalteca), así como, un híbrido y *Persea nubigena* (Fig. 3.1). Sin embargo, en el grupo II se agruparon dos materiales tolerantes-resistentes y un susceptible a *P. cinnamomi*, Olanca 2 Clon 25 y *Persea flocosa*, con Topa-Topa, respectivamente. Para el material Duke-7, distribuido comercialmente

como resistente, se ubicó en el dendograma entre los dos materiales susceptibles, esto puede deberse al parentesco que hay entre el 'Topa-Topa' con el 'Duke-7', ambos materiales pertenecen a la raza Mexicana.

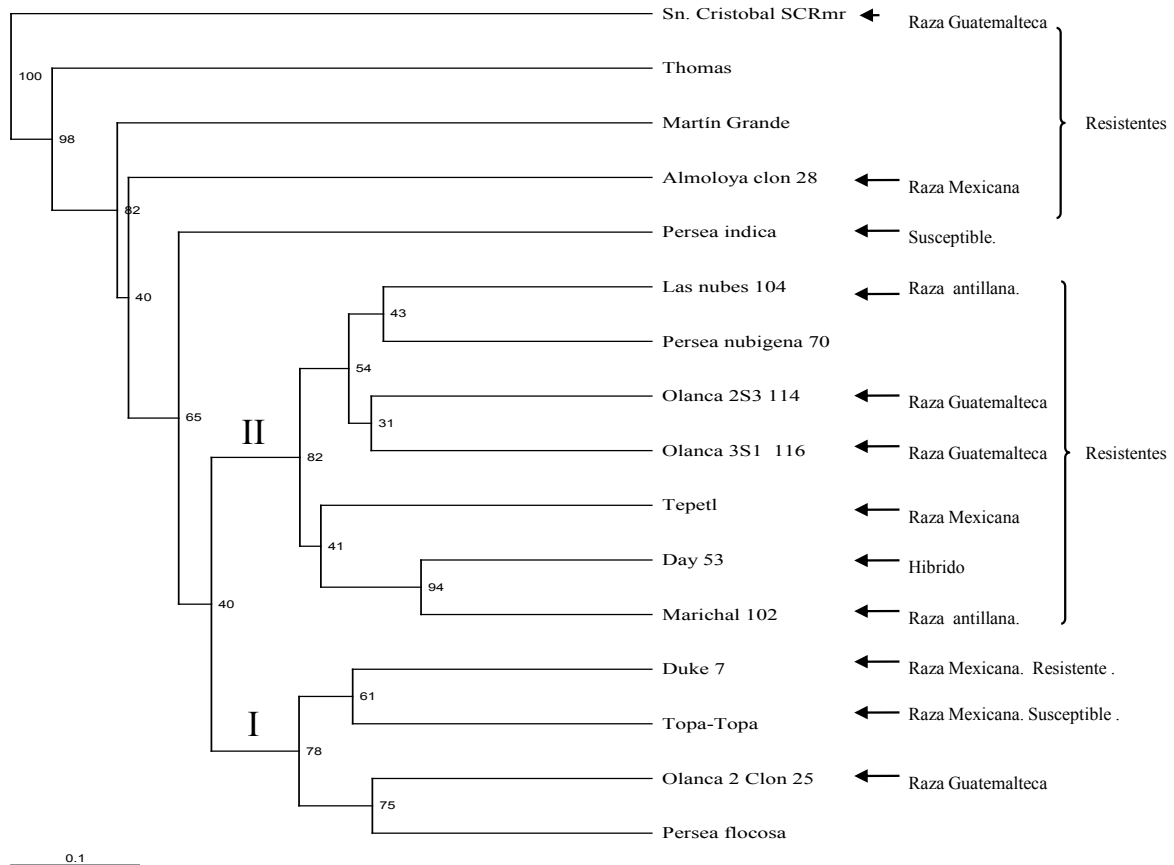


Figura 3.1. Agrupamiento de 16 materiales de aguacate (*Persea* spp.), obtenido a partir de los datos moleculares de 8 iniciadores de RAPD. El agrupamiento se realizó con el índice Nei y Li y la distancia UPGMA con un remuestreo de 1000 repeticiones.

El dendograma con los iniciadores ISSR presentó sólo un grupo bien definido de materiales tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi*, tales como; Las nubes 104, Marichal 102, Tepetl, *Persea nubigena*, Olanca 2S3 114, Olanca 3S1 116, Day 53, Olanca 2

Clon 25, *Persea flocosa*, y Almoloya Clon 28. También presentaron cercanía entre ellos los materiales susceptibles Topa-Topa y *Persea indica* (Figura 3.2).

Con los iniciadores ISSR la separación entre los resistentes y susceptibles a *P. cinnamomi* fue más evidente, por lo que para futuros estudios es conveniente el uso de éste tipo de iniciadores.

En ambos conglomerados RAPD e ISSR, los materiales Thomas, Martín Grande y Sn. Cristobal SCRmr siempre mantuvieron una posición similar. En estudios realizados por Coffey *et al* (1988) con Thomas y Martín Grande, también conocido como G755, presentaron resistencia moderada a *P. cinnamomi* en las condiciones de clima y suelo del sur de California. Aunque para el material Sn. Cristobal SCRmr no hay estudios precisos, hasta la fecha mantiene tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* en campo, y dentro del dendograma con los iniciadores de RAPD mantuvo siempre la misma posición en el 100% de los remuestreos y en los ISSR se agrupó junto al Martín Grande con una confiabilidad 31% del total de los remuestreos, lo cual indica que el Sn. Cristobal SCRmr puede ser un posible candidato con potencial como portainjerto resistente a *P. cinnamomi* Rands.

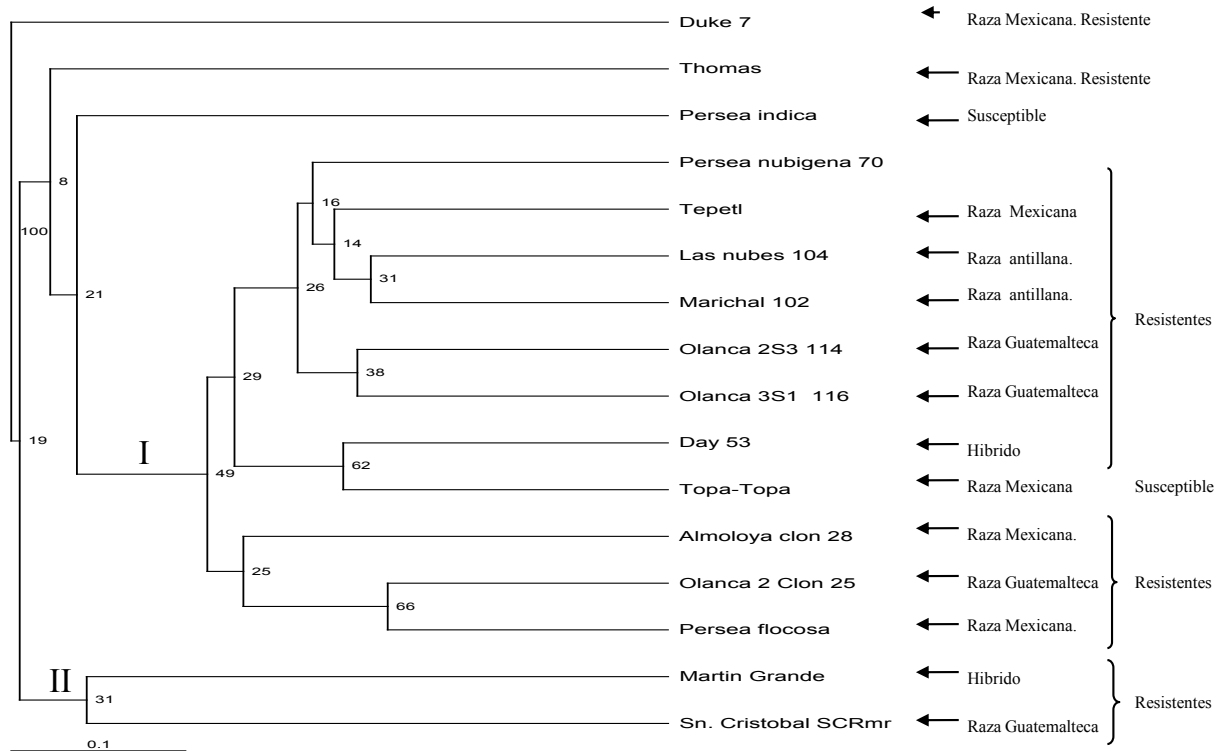


Figura 3.2. Agrupamiento de 16 materiales de aguacate (*Persea* spp.), obtenido a partir de 5 iniciadores de ISSR. El agrupamiento se realizó con el índice Nei y Li y la distancia UPGMA con un remuestreo de 1000 repeticiones.

En los dos aglomerados siempre se mantuvieron unidos los materiales Olanca 2S3 114 y Olanca 3S1 116, ambos de raza Guatemalteca, con un 31 y 38% de similitud para RAPD e ISSR, respectivamente. Los materiales Olanca 2 Clon 25 (raza Guatemalteca) y *Persea floccosa* (*Persea* que difiere a *P. americana* Mill.) mostraron mayor confiabilidad en la similitud con un 75 y 66% para RAPD e ISSR, respectivamente.

Cuadro 3. 2. Nivel de polimorfismo obtenido con 13 iniciadores de RAPD e ISSR en 16 materiales de aguacate (*Persea spp.*).

Sistema	Iniciador	Secuencia	Total de bandas ^Z	PIC
RAPD				
	C- 8	TGG ACC GGT G	66	0.899449036
	A-04	AAT CGG GCT G	61	0.89814566
	C-13	AAG CCT CGT C	61	0.936844934
	A-17	GAC CGC TTG T	60	0.938333333
	C-10	TGT CTG GGT G	56	0.919642857
	E-18	GGA CTG CAG A	72	0.915509259
	E-16	GGT GAC TGT G	58	0.8882283
	E-14	TGC GGC TGA G	57	0.889504463
ISSR				
	(AC) 8G	ACA CAC ACA CAC ACA CG	130	0.941065089
	(GA) 8C	GAG AGA GAG AGA GAG AC	150	0.949333333
	(TCC) 5RY	TCC TCC TCC TCC TCC RY	48	0.885416667
	GACA – 4	GAC AGA CAG ACA GAC A	62	0.899583767
	DBDA (CA) ₇	DBD ACA CAC ACA CAC ACA	90	0.923209877

Iniciadores sintetizados en Invitrogen life technology. ^Ztotal de fragmentos de ADN

3.4. Conclusiones

En los dendogramas de RAPD e ISSR, el genotipo Sn. Cristobal Scrm se alejó del resto de los materiales al igual que el Martín Grande, unidos estos materiales en los ISSR con un 31% de similaridad, razón por la cual el Sn. Cristobal Scrm podría ser utilizado como fuente de resistencia en el mejoramiento genético del aguacate.

3.5. Literatura citada

- Ahrens, U., Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Azofeifa, D. A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242.
- Barrientos-priego, A F., Muñoz P., R. B., Reyes A., J. C.; Borys, M. W.; Martínez D., M. T. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos, pp: 31-62. *In: El Aguacate y su Manejo Integrado*. Téliz, D. y Mora, A. (eds.). Mundi Prensa. D.F., México.
- Bergh, B. 1992. The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 76: 61-75.
- Coffey, M., F. Guillemet. G. Schieber, G. Zentmyer. 1988. *Persea schiedeana* and Martín Grande the Period from 1920 to 1975. *California Avocado Society Yearbook*. 72: 107-120.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, T. and E. Nevo. 2004. Microsatellites within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular biology and evolution*. 21(6): 991-1007.
- Rodríguez, S. F. 1982. *El Aguacate*. AGT Editor, S. A. D. F., México 167 p.
- Valadez M., E. and G. Kahl. 2000. *Huellas de ADN en Genoma de Plantas*. Mundi Prensa. D. F., México. 147 p.

- Vladimir H., A. Puvlíček. and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Zentmyer A., G., B. F. Guillement, K. M. Harjung and I. A. Zaki. 1977. Resistance to *Phytophthora* Root Rot. *California Avocado Society Yearbook*. 61: 76-80.