



**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LA  
RESISTENCIA DEL AGUACATE RAZA MEXICANA (*Persea  
americana* Mill. var. *drymifolia*) AL OOMICETO  
*Phytophthora cinnamomi* Rands**

**TESIS QUE PRESENTA**

**M. C. JOSÉ DE LA LUZ SÁNCHEZ PÉREZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
EN LA OPCIÓN DE  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ASESOR**

**DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**COASESOR**

**DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA**

**Morelia, Michoacán, México**

**Abril de 2007**

**El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y el Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología de la UMSNH, bajo la tutoría del Dr. Rafael Salgado Garciglia, y la cotutoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para la realización de la parte experimental, se contó con financiamiento del Fondo para la Investigación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) durante el período 2003 a 2005 (CIC/2.10 SGR).**

**Esta tesis consta una introducción general que explica al lector los objetivos principales del trabajo de investigación que dio origen a esta tesis y los antecedentes. Posteriormente, se describen de manera general las estrategias metodológicas utilizadas. Enseguida se muestran los resultados obtenidos que fueron considerados para su publicación. El escrito también incluye un apartado que muestra los resultados adicionales que no han sido publicados. Hacia el final se desarrolla una discusión general acerca de los resultados obtenidos (publicados o no) y finalmente una conclusión general del trabajo.**

## AGRADECIMIENTOS

A mis tutores y directores de tesis, Drs. Rafael Salgado Garciglia y Joel Edmundo López Meza, que mostraron una gran paciencia, comprensión y apoyo en momentos difíciles. Abrieron panoramas y evitaron desviaciones.

Al Dr. Mario González Chavira que bajo otra óptica, hizo atinadas sugerencias.

A la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia, por su apoyo siempre constante e incondicional en un área del conocimiento tan específica como amplia.

Al Dr. Rodolfo López Gómez, quien con sus productivas conversaciones y observaciones, permitió afianzar conceptos.

Al Maestro Jaime Hernández Díaz por su invaluable apoyo moral y económico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante parte de mis estudios, y por las distinciones de que he sido objeto por sus directivos, desde hace diez años.

Al INIFAP (que recuerdo con nostalgia), y que me permitió acceder a su banco de germoplasma de aguacate, del cual seleccionamos los materiales utilizados en este trabajo.

A la Facultad de Agrobiología y en particular al M.C. Salvador Ochoa Ascencio por proporcionar las cepas de *Phytophthora cinnamomi* utilizadas en esta investigación.

Al personal directivo, docente, técnico y administrativo que conjuntaron un ambiente favorable, y en especial a la Sra. Martha por su apoyo en laboratorio.

## DEDICATORIA

A mis padres:

Daniel Sánchez Núñez (Q.E.P.D.) y  
Ma. De los Angeles Pérez Solís,  
por inculcarme independencia, responsabilidad y honestidad.

A mi esposa:

Rosa María Barreto Cárdenas.

A mis hijos:

José de la Luz, Liliana Ireri, Karla Patricia, y Dafne Iohanna.

A todos aquellos, mujeres y hombres de firme voluntad, que cotidianamente realizan acciones para la conservación de la biodiversidad, y en particular de los recursos genéticos vegetales.



<b>III</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	41
	3.1. HIPÓTESIS	41
	3.2. OBJETIVOS	41
	3.2.1.    Objetivo general	41
	3.2.2.    Objetivos específicos	41
<b>IV</b>	<b>ESTRATEGIA METODOLÓGICA</b>	41
	4.1. DIAGRAMA GENERAL DE LA ESTRATEGIA METODOLÓGICA	42
	4.2. MATERIAL BIOLÓGICO	42
	4.2.1.    Banco de germoplasma de aguacate	42
	4.2.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	42
	4.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA COLECCIÓN NÚCLEO	43
	4.3.1.    Método de extracción	43
	4.3.2.    Ensayos <i>in vitro</i>	43
	4.3.3.    Purificación parcial de los compuestos activos	44
	4.3.4.    Análisis por espectrofotometría	44
	4.3.5.    Análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)	45
	4.4. ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTENCIA (RGAs) A ENFERMEDADES EN AGUACATE	45
<b>V</b>	<b>RESULTADOS</b>	47
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS ADICIONALES</b>	48
	6.1. INTRODUCCIÓN	48
	6.2. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	49
	6.2.1.    Caracterizaciones de sitios de colecta y agromorfológica	49
	6.2.2.    Estandarización de un método para la detección de genes análogos de resistencia a enfermedades en aguacate criollo	50
	6.3. RESULTADOS	53

6.3.1.	Caracterización agromorfológica	54
6.3.2.	Búsqueda de marcadores fenotípicos relacionados a resistencia (inhibición de <i>P. cinnamomi</i> )	56
6.3.3.	Resultados adicionales de la caracterización química	57
6.3.3.1.	Análisis estadísticos de los resultados de inhibición	60
6.3.4.	Resultados adicionales de la identificación del metabolito activo	61
6.3.4.1	Espectrofotometría	62
6.3.4.2.	Análisis por CG-MS	63
6.3.5.	Estandarización del método de detección de genes análogos de resistencia	66
<b>VII</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	70
7.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE COLECTA Y CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA	70
7.1.1.	Búsqueda de marcadores morfológicos asociados con la capacidad de inhibición a <i>P. cinnamomi</i>	71
7.2.	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	73
7.2.1.	Extractos inhibitorios preformados e inducidos.	73
7.3.	IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIOOMICETO	75
7.4.	EL USO DE RGAPs PARA IDENTIFICAR MARCADORES MOLECULARES DE GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES	77
7.5.	RELEVANCIA PARA EL AGUACATE	78
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	81
<b>IX.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	82



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página	
Cuadro 1	Descripción de los iniciadores (oligonucleótidos) utilizados para amplificar genes de resistencia de varias especies de plantas	52
Cuadro 2	Reactivos y cantidades utilizados en la técnica de PCR para la amplificación de ADN de aguacate	53
Cuadro 3	Especificaciones del programa inicial del termociclador para el estudio de PCR	53
Cuadro 4	Materiales de aguacate seleccionados (colección núcleo) por medio de la caracterización de sitios de colecta	55
Cuadro 5	Clasificación taxonómica de las 628 accesiones de aguacate colectadas entre 1996 y 2002	56
Cuadro 6	Análisis de conglomerados en base a la caracterización vegetativa y su relación con los porcentajes de inhibición a <i>P. cinnamomi</i> . Se destaca el grupo 3 en el cual se incluyen los dos extractos que mostraron inhibición del 100%, pero que se agrupan con otros 15 extractos con inhibición que va de 0 a 75%	58
Cuadro 7	Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>P. cinnamomi</i> por los extractos de raíces de aguacate de la fase clorofórmica	60
Cuadro 8	Análisis de varianza de los valores de inhibición a <i>P. cinnamomi</i> por los extractos de raíces de aguacate	61
Cuadro 9	Separación de medias de tratamientos. Prueba de Rango Múltiple de Duncan	62
Cuadro 10	Metabolitos mayoritarios identificados en el extracto crudo de raíces de aguacate (accesión 765-01), por CG-MS	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Ciclo de la enfermedad de la pudrición de la raíz de aguacate, causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i> (adaptado de: Pegg et al.,2002)	11
Figura 2	Dendrograma del análisis de conglomerados de la caracterización vegetativa (brotes y hojas jóvenes, y hojas maduras) y su relación con el porcentaje de inhibición de <i>P. cinnamomi</i>	59
Figura 3	Espectros de absorbencia entre 200 y 800 nm de diferentes extractos de aguacate criollo y fracciones purificadas por cromatografía en capa fina: A, de extractos con inhibición de <i>P. cinnamomi</i> ; B, de extractos sin inhibición; fracciones 5 (C) y 4 (D) purificadas del extracto de la accesión 765-01	64
Figura 4	Cromatograma de los extractos de raíces de aguacate criollo (accesión 765-01) con mayor actividad antioomiceto (4A), y espectro de masas (4B) m/z 396 del metabolito mayoritario.El asterisco del cromatograma indica el pico del cual se tomó el espectro	65
Figura 5	Estructura propuesta del compuesto antioomiceto (Estigmastan-3,5-dieno) aislado del extracto de raíz de aguacate de la accesión 765-01	66
Figura 6	Productos de amplificación de ADN de genes R de diferentes plantas. Se utilizaron oligonucleótidos degenerados basados en dominios conservados de genes de resistencia a enfermedades de diferentes especies vegetales. Las condiciones para PCR fueron la estándar (6A), y con modificaciones en la concentración de MgCl <sub>2</sub> (6B).	68
Figura 7	Productos de amplificación de ADN de genes R en aguacate. Se utilizaron condiciones estándar de PCR excepto que se usó 2 mM de MgCl <sub>2</sub>	69

## RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue identificar compuestos activos contra el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands en portainjertos derivados de plantas de aguacate mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Adicionalmente, se trató de identificar marcadores fenotípicos ligados a esos compuestos químicos, y la estandarización de procedimientos en la metodología para detectar marcadores moleculares de genes análogos de resistencia a enfermedades (RGAs) en el genoma de aguacate. Con la información del sitio de colecta, se seleccionaron 48 accesiones de aguacate con potencial resistencia a *P. cinnamomi*, del Banco de Germoplasma de aguacate del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas, y Pecuarias), de cuyas raíces fueron obtenidos extractos acuosos y orgánicos. Con el objeto de identificar moléculas bioactivas, los extractos fueron evaluados *in vitro* contra el micelio de *P. cinnamomi*. Ocho extractos de las 48 accesiones probadas, exhibieron una inhibición del 50 al 100% del crecimiento micelial. Los extractos de las accesiones 765-01 y 773-01 exhibieron una inhibición del 100%, los cuales fueron fraccionados por cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice, detectando 6 fracciones bajo luz UV. Las fracciones IV y V de ambos extractos, con valores de  $R_f$  de 0.85 y 0.90 respectivamente, mostraron inhibición del 100%. La fracción IV presentó una absorbencia máxima de 245 nm, por lo que fue analizada por la técnica de CG-MS (Cromatografía de gases-Espectrometría de masas) para identificar el compuesto activo. Los resultados demostraron la presencia del compuesto (derivado de un fitosterol), Estigmastan-3,5-dieno ( $C_{29}H_{48}$ ), que inhibió completamente el crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* a una concentración de 100 ppm. Los descriptores usados en la caracterización agromorfológica no condujeron a la identificación de marcadores fenotípicos de resistencia. La estandarización del proceso de análisis RGAP, parece ser promisoria para identificar marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a enfermedades en aguacate.

**Palabras clave:** *Persea americana*, *Phytophthora cinnamomi*, Estigmastan-3,5-dieno, antioomiceto.

## ABSTRACT

The main objective of this research was to identify active compounds against the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands in rootstocks from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*). Additionally, phenotypic markers linked to that chemical compounds were identified, and the standardization of the protocol to detect molecular markers linked to disease resistance genes analogs (RGAs) in the avocado genome was carried out. Accordingly with descriptors for collection sites, 48 accessions from the avocado germplasm bank of INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) were pre-selected for their potential resistance to *P. cinnamomi*. Root extracts (aqueous and organic phase) were extracted from these accessions and evaluated *in vitro* against *P. cinnamomi* mycelium. Eight out of the 48 extracts evaluated exhibited inhibition on mycelia growth between 50% and 100%. Extracts from the accessions 765-01 and 773-01 showed inhibition of 100%, they were fractionated by thin-layer chromatography on silica gel plates and six fractions were detected under UV light. Fractions IV and V from both extracts with *Rf* values 0.85 and 0.9 respectively, exhibited 100% inhibition *in vitro* against mycelia growth of *P. cinnamomi*. Fraction IV showed a maximum absorbance of 245 nm under UV light and was analyzed by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrum) in order to identify the active compound. Our results show the presence of a compound (derived from some phytosterol), identified as Stigmastan-3,5-dien (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>), which completely inhibited mycelia growth of *P. cinnamomi* at a concentration of 100 ppm. The descriptors used in the morphological characterization were not useful to identify any phenotypic marker for resistance. The standardization process for RGAP methodology could be promissory to detect molecular markers for disease resistance genes in avocado.

Keywords: *Persea americana*, *Phytophthora cinnamomi*, Estigmastan-3,5-diene, antioomycete.

## I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es en la actualidad uno de los cultivos más importantes en México, no solo por la cantidad de toneladas producidas que lo ubica como el productor más importante a nivel mundial, sino también porque es un cultivo que genera miles de empleos directos e indirectos y permite una entrada importante de divisas por la exportación de su fruta. Un árbol comercial de aguacate se compone de dos materiales vegetales, uno llamado portainjerto sobre el cual se injerta el otro llamado variedad (var) o cultivar (cv). De esta manera, el productor enfrenta dos tipos de problemas fitosanitarios, unos que afectan solo al portainjerto y otros que afectan solamente a la variedad injertada (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001).

Uno de los problemas fitosanitarios más graves a nivel mundial para este cultivo, es la enfermedad que provoca pudriciones en la raíz del portainjerto cuyo agente causal es el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands., esta enfermedad ha sido un factor económicamente limitante de la producción en Australia, México, Sudáfrica, los E.U.A. y otros setenta países (Pegg *et al.*, 2002). En México, el oomiceto se ha detectado en las regiones productoras de aguacate de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit, y Morelos. En Toluca, Querétaro y en Comonfort, Guanajuato, causó la desaparición casi completa del cultivo. En Morelos y Puebla la incidencia es del 45% al 90% (Téliz, 2000). En Michoacán, en el año 1979 se habían reportado 13 mil árboles enfermos y para 1994, se reportó que unos 100 mil árboles estaban afectados por la enfermedad en los principales siete municipios productores, lo que significó para ese año un costo económico de 640 millones de pesos para los productores (Vidales y Alcántar, 1999).

El control de este patógeno ha requerido de una combinación de varias prácticas de manejo diseñadas para reducir su actividad e incrementar la tolerancia del hospedero durante los períodos críticos de infección. Las prácticas complementarias de manejo incluyen la prevención, el control químico y biológico y el uso de portainjertos resistentes (Coffey y Guillemet, 1987; Erwin

y Ribeiro, 1996). El control más efectivo, se realiza cuando todas esas estrategias se usan en un sistema de manejo integrado.

Algunos portainjertos de aguacate expresan tolerancia a la pudrición de la raíz por la rápida regeneración de las raíces alimentadoras, mientras en otros, el progreso de la infección en la raíz es inhibido (Phillips *et al.*, 1987). Desafortunadamente, la resistencia moderada expresada por los portainjertos existentes a nivel comercial no es adecuada por si misma para ayudar a controlar la enfermedad cuando las condiciones ambientales son las ideales para el desarrollo del patógeno. Por ello, una alternativa potencial es la selección de materiales de portainjertos de aguacate con resistencia a *P. cinnamomi*, siguiendo parámetros de caracterización ya establecidos en otras especies vegetales. Esta caracterización es una actividad complementaria que consiste en describir los atributos cualitativos y cuantitativos de las accesiones de una misma especie para diferenciarlas, determinar su utilidad, estructura, variabilidad genética y relaciones entre ellas y localizar genes que estimulen su uso en la producción o en el mejoramiento de cultivos.

La caracterización del germoplasma incluye la de tipo agromorfológica, la química y la genética a nivel molecular. La primera consiste en describir sistemáticamente las accesiones de una especie a partir de características cualitativas (morfológicas), mediante una lista de descriptores (características) y los instrumentos para registrarlos (Jaramillo y Baena, 2000); la caracterización química ha sido ampliamente utilizada en quimiotaxonomía (Scora y Bergh, 1992; Otto y Wilde, 2001) y también ha permitido identificar metabolitos secundarios que están estrechamente relacionados con la defensa de la planta contra herbívoros y microorganismos fitopatógenos (Anaya *et al.*, 2001); entre las técnicas moleculares más desarrolladas se encuentran las del Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (Bostein *et al.*, 1980), el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), y el de DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD's) (Williams *et al.*, 1990). Estas dos últimas basadas en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada por Mullis *et al.*, (1986).

En 1996 se inició un proyecto de investigación con la colecta de germoplasma de aguacate en 24 entidades federativas del país, dando como resultado el registro de 628 accesiones al banco de germoplasma de aguacate de INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Pecuarias y Forestales). Actualmente se tienen bajo conservación en campo varios taxones del género *Persea*, donde predomina la especie *P. americana*, con sus tres subespecies o variedades botánicas, conocidas como razas (Mexicana, Guatemalteca y Antillana), así como híbridos naturales entre ellas y en menor medida accesiones de *P. schiedeana* y *P. tolimanensis* (Sánchez-Pérez, 1999).

Debido a que se requiere de portainjertos que sean en primer lugar compatibles con los cultivares comerciales de aguacate y que tengan una verdadera resistencia o en caso ideal, inmunidad a *P. cinnamomi*, para evitar la pérdida de plantaciones de aguacate, es primordial la búsqueda de esa resistencia, sobre todo en materiales genéticos de la raza Mexicana ya que de las tres razas de aguacate, ésta (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) ha mostrado tener una mayor tolerancia e incluso resistencia moderada a este oomiceto (Zentmyer y Lewis, 1976; Zentmyer, 1978; Coffey, 1987). La importancia de la selección y del conocimiento de la fuente de resistencia a patógenos en aguacate mediante estos métodos de caracterización, permitió plantear la necesidad de identificar, seleccionar y caracterizar materiales de aguacate raza Mexicana (portainjertos) que mostraran resistencia a patógenos, principalmente a *P. cinnamomi*.

Con este fin, el objetivo principal de esta investigación fue identificar compuestos biológicamente activos contra el oomiceto *P. cinnamomi* en portainjertos derivados de plantas de aguacate mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Adicionalmente, se trató de identificar marcadores fenotípicos ligados a esos compuestos, y por otra parte, la estandarización de procedimientos en la metodología para detectar marcadores moleculares de genes análogos de resistencia a enfermedades (RGAs) en el genoma de aguacate. Para el logro de esos objetivos, se realizó una caracterización de sitios de colecta y agromorfológica de accesiones de aguacate criollo mexicano

del banco de germoplasma del INIFAP, lo que permitió la selección de una colección de trabajo, la cual fue posteriormente sometida a caracterizaciones química y molecular con el propósito de encontrar genotipos con potencial resistencia al oomiceto. Se reportan las características de los materiales o genotipos estudiados, el aislamiento, purificación y caracterización parcial de un compuesto constitutivo en raíces de aguacate (*P. americana* var. *drymifolia*) con actividad antioomiceto, además de los procedimientos necesarios para llevar a cabo un análisis del genoma de aguacate, en busca de genes análogos de resistencia a enfermedades (RGAs) con la metodología RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphism).



## II. ANTECEDENTES

### 2.1. LA PLANTA (AGUACATE)

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es uno de los cultivos más importantes en México, ya que es el principal productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2005), además es un cultivo que genera más de 100 mil empleos directos e indirectos y permite una entrada importante de divisas por la exportación de su fruta. Por otra parte, nuestro país forma parte del centro de origen de la especie, por lo que alberga una amplia diversidad genética.

El aguacate pertenece a la familia *Lauraceae*, una de las más antiguas en nuestro planeta. Comprende poco más de 50 géneros y unas 2,200 especies. De esta familia se deriva el género *Persea*, el cual tiene dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne*. El aguacate se clasifica dentro del género *Persea* y subgénero *Persea*. En el subgénero *Persea* se reconocen tres especies: *P. americana* Mill., *P. schiedeana* Nees, y *P. parvifolia* Williams. La mayoría de los miembros reconocidos del subgénero *Persea* se encuentran principalmente en una misma área que inicia del centro de México hasta Panamá en Centroamérica. Los hallazgos de aguacates primitivos desde la Sierra Madre Oriental en el Estado de Nuevo León, México, hasta Costa Rica en Centroamérica, apoyan la hipótesis de que se trata de un centro de origen del aguacate, y probablemente de todo el subgénero *Persea* (Bergh y Ellstrand, 1986; Storey *et al.*, 1986; Schroeder, 1990; Hawkes, 1991; Ben Ya'acov *et al.*, 1992a, 1992b; Bergh, 1992).

#### 2.1.1. Origen y razas ecológicas

El aguacate (*P. americana* Mill.) es una especie arbórea polimórfica que aparentemente se originó en una amplia área geográfica extendiéndose desde las tierras altas del centro y oriente de México, pasando a través de Guatemala, hasta la costa del Océano Pacífico en Centroamérica (Smith, 1966, 1969;

Storey *et al.*, 1986). Evidencias arqueológicas indican que esta fruta se utilizó y seleccionó en México desde hace unos 10,000 años (Smith, 1966, 1969).

Desde antes de la llegada de los Europeos, se habían seleccionado durante milenios formas hortícolas considerablemente mejoradas sobre sus tipos silvestres. Éstas estuvieron entre tres taxones distintos o subespecies, ecológicamente separadas, conocidas ahora como razas Mexicana, Guatemalteca y Antillana. Como resultado de la amplia distribución del germoplasma de aguacate hacia regiones distantes de sus sitios de origen, ocurrió un cruzamiento interracial, a tal grado que en la actualidad los cultivares económicamente importantes tanto en áreas tropicales como subtropicales donde se cultivan, son resultado de la hibridación entre razas (Knight, 2002).

### **2.1.2. Adaptación ecológica**

*P. americana* es una especie con alta variabilidad, consistiendo de varios taxones, variedades botánicas y subespecies que incluyen las tres razas antes mencionadas [var. *drymifolia* Schlect y Charn., var. *guatemalensis* Williams y var. *americana* Mill. (Scora y Bergh, 1992)], además de otras variedades cercanas, resaltando las variedades *nubigena*, *steyermarkii*, *tolimanensis*, *zentmyerii* y *flocossa*, y probablemente también las variedades *costaricensis* y *tilaranensis* (Knight, 2002).

Las tres razas de *P. americana* no están lo suficientemente diferenciadas como para ser consideradas especies diferentes, pero si pueden considerarse como subespecies o variedades botánicas (Bergh y Ellstrand, 1986; Storey *et al.*, 1986). Ya que las tres razas tienen un genoma similar ( $2n=24$ ), la hibridación entre ellas ocurre con facilidad y sus híbridos obtienen ventajas de adaptación climática, así como características agronómicas mejoradas (Bergh, 1992).

El llamado aguacate antillano es un árbol de tierras bajas cálidas y húmedas en bosques de Centroamérica, con una estación seca corta. Por otra parte, el presunto hábitat nativo de los aguacates mexicanos es a mayor altitud (1,400 a 2,500 msnm) y más frío, con temperaturas medias anuales de 14.2 a 19.8°C,

precipitación pluvial de 665 a 1562 mm, y un período seco invierno-primavera de unos 6 a 8 meses (Wolstenholme y Whiley, 1999). El presunto hábitat nativo de los aguacates guatemaltecos, presenta las condiciones menos extremas comunes a las tierras altas de los trópicos, con temperaturas frescas a lo largo del año, descritas como 'tierras templadas húmedas' (Papadakis, 1966).

### **2.1.3. Domesticación**

Evidencias arqueológicas señalan que el aguacate era consumido por los pueblos nativos desde hace casi 10,000 años y su cultivo se habría iniciado posiblemente hace unos 6,000 años (Storey *et al.*, 1986; Schieber y Zentmyer, 1992). Según Kopp (1966), el origen de las actuales formas de aguacate es incierto debido a su estrecha conexión con representantes de civilizaciones antiguas del área México-Guatemala-Honduras, quienes valoraban mucho sus frutos. Eso es por lo tanto un problema de Etnobotánica.

Gama y Gómez (1992), mencionan que la domesticación del aguacate ocurrió hace miles de años, cuando los antiguos pobladores movieron plantas de su medio silvestre hacia la cercanía de sus sitios de morada a huertos, y las semillas ahí obtenidas fueron regresadas al medio silvestre.

### **2.1.4. Enfermedades del aguacate**

El aguacate presenta enfermedades severas que en casos extremos provocan la muerte del árbol y en general, una disminución en la producción que varía del 10 al 40% y una reducción en la calidad entre un 15 y 30% (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001).

Las enfermedades de mayor importancia económica son seis y a continuación se mencionan por su nombre común y el o los microorganismos que las causan: 1) la antracnosis del fruto, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, 2) la roña del fruto, *Sphaceloma persea* Jenkins, 3) anillamiento del fruto causado por el complejo de bacterias y hongos *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Clavibacter* (*Corynebacterium*) sp., *Alternaria* sp., *Diplodia* sp., *Dothiorella* sp., y

*Pestalotia* sp., 4) la tristeza o pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi*, 5) el cáncer de tronco y ramas *Fusarium epishaeria* Snyder y Hansen, *P. boehmeriae* Sawada y *Nectria galligena* Cayley, y 6) enfermedades de poscosecha, *Diplodia natalensis* Pole evans, *Rhizopus nigricans* Ehr., *Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *F. roseum*, *C. gloeosporioides* Penz y *S. persea* Jenkins (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001).

La enfermedad más devastadora del cultivo de aguacate a nivel mundial es la producida por el oomiceto *P. cinnamomi* conocida como “tristeza del aguacate” o “pudrición de la raíz”, que ataca la raíz del árbol, el cual se debilita y generalmente muere. Se ha reportado que esta enfermedad ataca al aguacate en unos 70 países (Pegg *et al.*, 2002).

Se considera que el control de esta enfermedad debe ser integral, combinando el control químico con fungicidas, las podas severas al follaje, la adición de materia orgánica al suelo y proporcionando un mejor drenaje a éste para evitar los excesos de humedad en el ambiente donde se desarrollan las raíces. El control integral resulta demasiado caro y generalmente antieconómico, por esta razón es primordial la búsqueda del control genético a través de portainjertos resistentes al ataque del oomiceto ya que se considera que es la mejor alternativa en el largo plazo (Menge *et al.*, 1992; Kamoun *et al.*, 1999; Zilberstaine y Ben-Ya'akov, 1999).

De las tres razas de aguacate utilizadas como portainjertos, la Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) ha mostrado tener una mayor tolerancia e incluso resistencia moderada a *P. cinnamomi* (Zentmyer y Lewis, 1976; Zentmyer, 1978; Coffey, 1987) y esta es la razón por la cual se utilizan portainjertos de esta raza para injertar los cultivares comerciales como el ‘Hass’. Con la excepción de México, de manera general el uso de portainjertos de reproducción clonal tolerantes a la enfermedad es en la actualidad una práctica cada vez más común; sin embargo, cuando las condiciones ambientales son favorables al desarrollo del oomiceto, incluso esos portainjertos se pueden ver severamente afectados por el patógeno.

## 2.2. EL PATÓGENO (*Phytophthora cinnamomi* Rands)

En el género *Phytophthora* (vocablo Griego que significa ‘destructor de plantas’) se ubican algunos de los fitopatógenos más devastadores de las plantas dicotiledóneas. Algunos tienen un rango restringido de hospederos, como *P. infestans*; sin embargo, provoca fuertes pérdidas económicas en plantas de la familia *Solanaceae*, concretamente en cultivos de papa y tomate. Otros como *P. cinnamomi*, tienen un rango muy amplio, Zentmyer (1985) reportó originalmente casi 1,000 hospederos aunque actualmente se le conocen más de 3,000 especies hospederas (unas 2,000 de ellas tan sólo en Australia), todas ellas plantas leñosas, árboles o arbustos, tanto cultivadas, ornamentales y silvestres (Coffey, 1984; Hardham, 2005).

*Phytophthora* es un oomiceto — Reino *Chromista*, Phylum *Oomycota*, Orden *Peronosporales*, Familia *Peronosporaceae*, Género *Phytophthora* (Birch y Whisson, 2001; Hardham, 2005).

Se han descrito unas 75 especies de *Phytophthora* (G. Abad, comunicación personal) entre las que destaca *P. infestans*, que ataca la papa y otras especies de la familia *Solanaceae* y fue causante de la peor hambruna en Europa a mediados del siglo XIX (Kamoun *et al.*, 1999).

En el pasado, *Phytophthora* se consideraba como hongo, debido a su hábito de crecimiento filamentosos en estado vegetativo y la formación de esporas para su reproducción asexual y sexual (Latijnhovers *et al.*, 2003). Sin embargo, existen remarcables diferencias morfológicas y fisiológicas entre los hongos y los oomicetos. Estos últimos son diploides, sus hifas no tienen septos y la mayoría de los oomicetos son (parcialmente) auxótrofos para esteroides ya que sus membranas contienen lípidos con estructuras inusuales y ácidos grasos de cadena larga, que presumiblemente reemplazan a los esteroides en las membranas del micelio. Los oomicetos sintetizan lisina por la ruta del ácido  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélico, mientras que los hongos sintetizan ese aminoácido por la llamada ruta  $\alpha$ -aminoadípica. Las paredes celulares de la mayoría de los

oomicetos consisten principalmente de 1,3- $\beta$ -glucanos, algunos 1,6- $\beta$ -glucanos y 1,4- $\beta$ -glucanos (celulosa), la quitina que es un constituyente mayor de las paredes celulares de los hongos, ha sido detectada en pequeñas cantidades en solamente unos pocos oomicetos (Erwin y Ribeiro, 1996).

Adicionalmente, análisis bioquímicos conjuntamente con análisis filogenéticos de las secuencias génicas de ARN ribosomal (rRNA) (Kumar y Rzhetsky, 1996; Paquin *et al.*, 1997), de aminoácidos de proteínas de las mitocondrias (Lang *et al.*, 1999) y de genes cromosómicos que codifican proteínas (Baldauf *et al.*, 2000), sugieren que los oomicetos tienen poca relación taxonómica con los hongos filamentosos y que están estrechamente relacionados con las algas café (cromofitas) y con otros taxones que poseen pelos flagelares tubulares (mastigonemas), en un ensamble taxonómico conocido como *Estramenópilos* (Barr, 1992; Patterson y Sogin, 1992).

### **2.2.1. Biología y ecología de *P. cinnamomi***

En el ciclo de la enfermedad de *P. cinnamomi* (Figura 1), las principales estructuras de infección de *P. cinnamomi* son las zoosporas que son liberadas de los esporangios. Las zoosporas son células sencillas con dimensiones de unos 9 a 15 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), carentes de pared celular, biflageladas, mótils, que nadan hacia las raíces jóvenes de los potenciales hospederos en una respuesta quimiotáctica a los exudados de las raíces (generalmente aminoácidos y azúcares). Al alcanzar la raíz del hospedero, se adhieren a las raicillas, forman una pared celular, se enquistan y germinan sobre ellas. El proceso de enquistamiento implica la pérdida de motilidad a través de la eliminación de los dos flagelos, y la secreción de material incluyendo un adhesivo el cual pega las zoosporas a la superficie de la raíz y después de unos 5 minutos, la formación de una pared celular celulósica (Hardham, 1998). La germinación de los quistes ocurre unos 20 a 30 minutos después del enquistamiento. Los tubos germinativos pueden crecer por aproximadamente 1 h en ausencia de nutrientes exógenos. En la cercanía de una raíz, crecen quimiotrópicamente hacia ella, penetrando la superficie entre las células epidérmicas. La penetración ocurre alrededor de 24 h después de la infección

(Zentmyer, 1961). Unas 6 h después de la penetración, el tejido de la raíz alimentadora muere (Coffey, 1984), y el oomiceto crece dentro de ese tejido necrótico por algunos días. Cuando las reservas alimenticias del tejido de la raíz se agotan, el patógeno es estimulado a esporular. Se forman dos tipos de esporas: esporangios y clamidosporas. Dos a tres días después del inicio de la infección, el patógeno puede esporular otra vez, formando esporangios sobre la superficie de la raíz y liberando más zoosporas en la rizosfera. De esta manera el inóculo se amplifica rápidamente (Hardham, 1998).

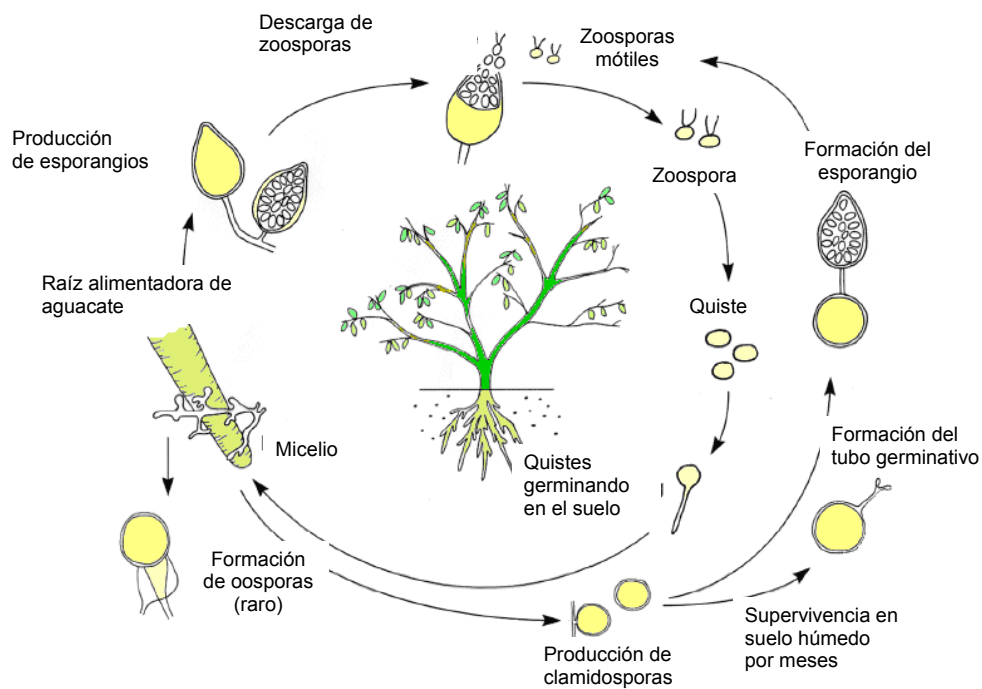


Figura 1. Ciclo de la enfermedad de la pudrición de la raíz de aguacate, causada por *Phytophthora cinnamomi* (adaptado de: Pegg et al., 2002).

Los esporangios son estructuras con un diámetro de 20-50  $\mu\text{m}$ , pueden sobrevivir por días y aún semanas bajo condiciones de suelo húmedo. También pueden liberar zoosporas móviles, las que nadan a una velocidad de entre 100 y 200  $\mu\text{m/s}$  y su movilidad puede alcanzar varios centímetros antes de enquistarse (Hardham, 1998), pero debido a su movimiento aleatorio y los obstáculos que representan las partículas del suelo, rara vez avanzan más de 1 cm, aunque obviamente esto puede significar un desarrollo considerable de la enfermedad dentro del sistema de raíces alimentadoras de un árbol de aguacate infectado (Coffey, 1984). Bajo condiciones de suelo húmedo y cálido,

se presenta una rápida proliferación de zoosporas dentro del sistema radical del árbol.

Las clamidosporas son generalmente esféricas, son células multinucleadas y que funcionan como esporas resistentes de latencia que pueden sobrevivir en condiciones adversas por varios años debido a sus gruesas paredes y sus reservas de lípidos. Se forman en el suelo, arena gruesa, o tejido vegetal durante períodos secos y permanecen latentes hasta que las condiciones del ambiente circundante son adecuadas para su germinación. Sin embargo, son sensibles a temperaturas congelantes y condiciones secas del suelo de larga duración. Estas esporas germinan bajo condiciones cálidas húmedas en respuesta a un incremento en los exudados de las raíces. Ya sea dentro del tejido del hospedero o en el suelo, germinan produciendo esporangios o hifas y forman la siguiente generación (Cahill, 1998).

*P. cinnamomi* puede sobrevivir en material vegetal muerto, esta fase saprofitica puede conducir a un incremento en la población del patógeno, aunque las especies de *Phytophthora* tienen una habilidad saprofitica limitada, lo que significa que exhiben un crecimiento pobre y una habilidad competitiva baja en la presencia de otros microorganismos del suelo. Son invasores primarios más que secundarios, y atacan solamente tejidos saludables, intactos, o con heridas recientes y no invaden tejidos previamente invadidos por otros microorganismos (Cahill, 1998). También puede sobrevivir en el suelo como micelio, esporangio, quistes de zoosporas, clamidosporas y ocasionalmente oosporas, con apoyo de sustrato orgánico. El micelio puede sobrevivir hasta por 6 años en suelo húmedo (Zentmyer y Mircetich, 1966) y los quistes de zoosporas pueden sobrevivir al menos 6 semanas (MacDonald y Duniway, 1978).

La fase sexual del ciclo de vida de *P. cinnamomi* ocurre con mucho menos frecuencia que el ciclo asexual ya que es heterotálico y tiene tipos de apareamiento A1 y A2 (Zentmyer y Mircetich, 1966; Kamoun, 2000). Los oogonios y los anteridios, las únicas células haploides de *Phytophthora*, pueden desarrollarse cuando los dos tipos de apareamiento entran en contacto,



pero la autofertilización puede ser inducida, con ciertos estímulos como por ejemplo exudados de raíces de aguacate (Zentmyer, 1979) o la presencia de *Trichoderma* spp. (Brasier, 1975). La fertilización resulta en la formación de oosporas, células altamente resistentes que pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo. En condiciones de laboratorio, es difícil conseguir que las oosporas de *P. cinnamomi* germinen. El tipo de apareamiento A2 es el predominante en huertos de aguacate en todo el mundo. Se han reportado aislamientos del tipo A1 recuperados en huertos de aguacate de California (EEUU), China, Madagascar y Papúa Nueva Guinea (Hardham, 1998).

Considerando elementos del clima, principalmente temperaturas, *P. cinnamomi* se desarrolla mejor en áreas de climas templados benignos o subtropicales, no desarrolla o su supervivencia se ve comprometida con temperaturas del suelo por debajo de 5-6°C, o altas temperaturas por arriba de 34-36°C. Las temperaturas óptimas están en el rango de 21-27°C. Las temperaturas fuera del rango óptimo, probablemente sean inhibitorias a la producción de zoosporas y esporangios. Bajo condiciones de baja humedad del suelo, el patógeno no sobrevive o no se disemina con rapidez. Los períodos de abundante humedad en el suelo, promueven la producción de esporangios, liberación de zoosporas e invasión de raíces hospederas. Sin embargo, en un suelo continuamente saturado de agua, con bajas concentraciones de oxígeno el desarrollo se detiene. La enfermedad se produce con mayor rapidez bajo condiciones de suelo con pH ligeramente ácido o neutro (Zentmyer, 1985).

La enfermedad es más severa en suelos poco profundos con drenaje pobre, y con baja densidad de microorganismos antagonísticos en el suelo. La topografía plana u ondulada puede favorecer la enfermedad, ya que existe una alta correlación entre ésta, la pendiente del suelo, la profundidad de la capa impermeable, y las características hidrológicas importantes como la textura del suelo y la densidad (Marks y Smith, 1991).

### **2.2.2. Difusión del patógeno**

Bajo condiciones húmedas las zoosporas móviles del patógeno pueden ser movidas pasivamente en el agua de riego y en la que corre sobre la superficie del terreno. Las zoosporas liberadas de esporangios en raíces infectadas son capaces de moverse con la pendiente o el movimiento lateral del agua a considerable profundidad (Shearer y Tippett, 1989). Ya que estas esporas pueden permanecer móviles por más de 24 h, tal movimiento pasivo del patógeno puede causar una significativa difusión de la enfermedad dentro de un huerto de aguacate. Adicionalmente, el suelo ya contaminado con *P. cinnamomi* tiene raíces enfermas que contienen micelio y clamidosporas, y estas estructuras son altamente infectivas. El movimiento físico de suelo mojado es un método común de difusión de la enfermedad, tanto dentro de un huerto, como de un huerto a otro (Coffey, 1984).

### **2.2.3. Síntomas y control de la enfermedad**

Los síntomas incluyen una muerte regresiva de las ramas de los árboles, marchitez y amarillamiento de las hojas y finalmente una defoliación completa. Con frecuencia, cuando aparecen esos síntomas en la parte aérea de la planta, es porque muchas de las raíces alimentadoras ya han sido destruidas. Las hojas de los árboles infectados son pequeñas, verde pálido, a menudo marchitas, y frecuentemente tienen sus puntas color café. El follaje es escaso, los nuevos crecimientos son generalmente ausentes, pero si ocurrieran, las nuevas hojas son pequeñas y decoloradas. Las pequeñas ramas en la parte superior del árbol sufren una muerte regresiva, provocando que otras ramas queden descubiertas y sufran quemaduras del sol. Los árboles enfermos frecuentemente producen una abundante cosecha de frutos muy pequeños (Faber y Marais, 2001).

Las pequeñas raíces alimentadoras de los árboles enfermos pueden estar ausentes en estados avanzados de la enfermedad; si estuvieran presentes, comúnmente están ennegrecidas, quebradizas y muertas. La ausencia de raíces alimentadoras impide la absorción de humedad, y el suelo bajo los

árboles enfermos permanece húmedo aún cuando al árbol parece marchito. Las raíces del árbol son más susceptibles en suelos húmedos, ya que están estresadas por un reducido suministro de oxígeno y esto hace que produzca más exudado que es atractivo para las zoosporas (Ribeiro, 1978; Faber y Marais, 2001).

En la actualidad, en algunos países donde los huertos de aguacate son severamente afectados por *P. cinnamomi*, se practica un control integrado que conjuga las siguientes actividades: a) medidas sanitarias para evitar la dispersión del patógeno desde el vivero, dentro de huertos y entre huertos; b) también se toman medidas para evitar el humedecimiento prolongado del suelo con acciones tales como mejorando el drenaje del suelo, y controlando el agua de riego; c) la aplicación al suelos de fungicidas tales como Alliette (aluminio tris fosfonato) y Metalaxilo, y d) el uso de portainjertos tolerantes o parcialmente resistentes tales como Barr Duke, Duke 6, 7, y 9, Thomas y Toro Canyon, todos ellos de la raza Mexicana (Faber y Marais, 2001).

Adicionalmente se ha recurrido a la solarización del suelo, para atrapar el calor radiante del sol con películas de polietileno claro, extendidas sobre la superficie del suelo bajo los árboles de aguacate, para incrementar la temperatura del mismo arriba de 45°C, y se ha demostrado que el método es efectivo para tratar suelos infectados. Además del efecto inhibitorio directo del calor sobre *P. cinnamomi*, la solarización también promueve una más alta población de microflora tolerante al calor, antagonista al patógeno (López-Herrera *et al.*, 1997; Pegg *et al.*, 2002).

Ya que algunos portainjertos expresan resistencia parcial por la rápida recuperación de sus raíces alimentadoras a una tasa mayor a la que el patógeno las destruye, se sugiere aplicar un programa de nutrición balanceada para ayudar al reemplazo de las raíces dañadas por el patógeno. La incorporación de calcio ( $\text{Ca}^+$ ) al suelo es también importante ya que se ha demostrado que este elemento reduce la severidad de la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi* (Lee y Zentmyer, 1982). El  $\text{Ca}^+$  es un ión importante en la estructura de la pared celular, particularmente la lamela media y así

reduce la actividad de las enzimas producidas por el patógeno que degradan la pared celular. El  $\text{Ca}^+$  también ayuda a estabilizar la permeabilidad de la membrana e interferir con la exudación de carbohidratos y aminoácidos que atraen a las zoosporas hacia las raíces. También induce un enquistamiento prematuro de las zoosporas y así niega el acceso de ellas a las raíces alimentadoras (Messenger-Routh *et al.*, 1996).

Los portainjertos comerciales mencionados anteriormente no han sido consistentes en su desempeño en diferentes ambientes y solo han mostrado tolerancia o resistencia parcial a nivel de campo en ensayos realizados en California, España, Israel, Australia y Sudáfrica y se puede decir que a la fecha no existen disponibles portainjertos con resistencia completa a nivel comercial, capaz de permanecer sanos sin tratamientos con fungicidas (Newett *et al.*, 2002). Se considera como el portainjerto más resistente dentro de ese nivel a 'Martin Grande', que está compuesto de la descendencia de tres "francos" (árboles obtenidos de semilla), conocidos como G755A, G755B y G755C y que son producto de una hibridación natural entre *Persea guatemalensis* y *P. schiedeana* (Schieber y Zentmyer, 1977; Ellstrand *et al.*, 1986). Sin embargo, al injertar la variedad comercial 'Hass' sobre ellos, los rendimientos son muy bajos, posiblemente debido al excesivo vigor del portainjerto (Newett *et al.*, 2002). El portainjerto 'Thomas' (raza Mexicana de *P. americana*) tiene una resistencia similar a 'Martin Grande' y le siguen Duke 6, Duke 7, y Barr Duke, todos de raza Mexicana.

Un enfoque reciente en aguacate, ha sido la identificación de agentes de control biológico (biocontrol) en los llamados suelos supresivos a la enfermedad. La aplicación directa de agentes de biocontrol parece ser una práctica prometedora para reducir la pudrición de la raíz del aguacate causada por *P. cinnamomi*. Los propágulos de este patógeno sirven como alimento para varios organismos del suelo, incluyendo hongos, bacterias y amibas. Adicionalmente, las especies de *Phytophthora* han mostrado limitada habilidad saprofitica, con pobre crecimiento, por su baja habilidad competitiva en presencia de otros microorganismos del suelo (Cahill, 1998; Pegg *et al.*, 2002).

En los llamados suelos supresivos a *P. cinnamomi*, se han identificado algunos agentes de biocontrol como *Trichoderma aureovirde*, *T. harzianum*, *Gliocladium virens* e *Hyphodontia alutacea*, dañando las clamidosporas del patógeno y así reduciendo la supervivencia del inóculo en el suelo, con lo que ayudan parcialmente a reducir el daño de la enfermedad a largo plazo. Sin embargo, no son capaces de impedir la infección y muerte de los árboles individuales de aguacate. Así que se podrían utilizar para destruir estructuras de supervivencia en el suelo para facilitar el replante de nuevos árboles y como apoyo para otros tipos de control. Recientemente en algunos laboratorios se han encontrado otros dos microorganismos, *Rosella* spp. y *Lytobacter mycophilus*, conocidos parásitos de hongos, que atacan directamente y matan a *P. cinnamomi* (Menge *et al.*, 2002).

### **2.3. LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO**

Debido a que las plantas ofrecen un ambiente nutritivo, ellas deben minimizar el daño causado por el inevitable ataque de hongos, bacterias, oomicetos, virus, y nemátodos fitopatógenos. El contacto entre una planta y un microorganismo potencialmente fitopatógeno, puede resultar en una infección, la colonización de los tejidos de la planta, y el desarrollo de una enfermedad, situación conocida como interacción compatible y se considera que la planta es susceptible. Por otra parte, la planta puede responder rápidamente montando defensas exitosas que suprimen la actividad del patógeno, evitando la enfermedad, en un tipo de interacción incompatible, y la planta resulta resistente.

Las plantas, en la naturaleza generalmente son resistentes a la mayoría de los patógenos. La habilidad de un patógeno para causar enfermedad en una planta hospedera es usualmente la excepción, no la regla (Staskawicz, 2001). Esto se debe a que las plantas tratan de defenderse a sí mismas, a través de una combinación de defensas preformadas e inducidas. Entre las defensas preformadas, las barreras estructurales (físicas) tales como cutículas cerosas y los compuestos antimicrobianos preformados (constitutivos), proveen una protección inespecífica contra un amplio rango de patógenos. Sobre esta línea

basal de defensa del hospedero están los escudos de defensa inducibles (Bonas y Lahaye, 2002) activados por el reconocimiento de los patógenos (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

En mamíferos, la maquinaria de defensa implica el intrincado sistema inmune, el cual está basado en células altamente especializadas que son distribuidas por un sistema circulatorio. A diferencia de los animales las plantas no tienen un sistema circulatorio y por lo tanto no pueden descansar en un sistema especializado inmune proliferativo. Las células vegetales no tienen movimiento y las respuestas de defensa son autónomas, así que cada célula puede percibir y responder al ataque de microorganismos. Cada célula de la planta ha de ser capaz de defenderse, aún cuando esta defensa es coordinada localmente y sistémicamente entre células (Michelmore y Meyers, 1998). Las interacciones incompatibles ocurren debido a que las plantas tienen la habilidad innata para reconocer patógenos potencialmente invasores, y montar defensas exitosas, suprimiendo su desarrollo y dispersión. De manera inversa, los patógenos exitosos causan enfermedad (interacciones compatibles) debido a que son capaces de evadir el reconocimiento, o suprimir los mecanismos de defensa del hospedero, o ambos (Staskawicz, 2001).

Los mecanismos de defensa de la planta se pueden dividir en dos grandes grupos: 1) las defensas pasivas que son preformadas o constitutivas, y 2) las defensas activas que son inducidas. A su vez, ambos grupos se pueden subdividir en defensas físicas o estructurales y defensas químicas. Las defensas pasivas se encuentran en la planta independientemente de si ésta es desafiada o no por un patógeno (Tierens *et al.*, 2001). Las defensas activas requieren de la inducción por el ataque de un patógeno, o la acción de un 'inductor' (elicitador, en inglés, que en este contexto se define como: un estímulo físico, químico o biológico, que desencadena respuestas de defensa en las plantas). Generalmente las defensas activas son dependientes de la transcripción y traducción de genes que se activan tras la percepción o reconocimiento de moléculas codificadas por genes del patógeno, o de inductores generales, no específicos, tales como la quitina (Felix *et al.*, 1993) o ergosterol de los hongos (Granado *et al.*, 1995) que son componentes

importantes de la llamada inmunidad innata. En mamíferos esos inductores generales se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP; por sus siglas en inglés), es decir, el reconocimiento de moléculas que no le son propias a la célula animal y que actúan como inductores (Gómez-Gómez y Boller, 2002). En ocasiones las moléculas producto de la destrucción que el patógeno provoca en la cutícula o la pared celular de la célula vegetal, pueden actuar como inductores (Heath, 2000).

Después del reconocimiento del patógeno por parte de la planta, se desencadenan cascadas de señalización, que activan algunas rutas de defensa. Varias moléculas de señalización están involucradas en las respuestas corriente abajo, incluyendo el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno. La activación sucesiva de componentes de cascadas de transducción de señales, eventualmente conduce a la expresión de genes de defensa y de protección, tales como proteínas relacionadas a patogénesis, glutatión-S-transferasas, peroxidasas, inhibidores de proteinasas y la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos (Thatcher *et al.*, 2005).

Las respuestas de defensa también pueden ser divididas en: resistencia de no hospedero, donde una planta es resistente a todas las razas de un patógeno, y resistencia de hospedero, donde una planta es resistente a algunas, pero no todas las razas de un patógeno (Heath, 2000). Sin embargo, los dos tipos de resistencia tienen un considerable traslape, con plantas que responden de manera similar en interacciones de no hospedero y de hospedero y varios componentes de las rutas de señalización son comunes para ambos tipos de resistencia (Thordal-Christensen, 2003).

La interacción entre un potencial fitopatógeno y una planta puede tener diferentes consecuencias. Cuando un patógeno virulento infecta una planta, éste prolifera ya sea intra o intercelularmente y genera síntomas de enfermedad. Durante la infección se pueden activar genes de la planta conocidos como genes de resistencia a enfermedades (genes *R*) que pueden funcionar para impedir el desarrollo del patógeno. Sin embargo, cuando un patógeno avirulento infecta una planta, con frecuencia provoca una muerte

rápida de células y la síntesis de compuestos antimicrobianos en el sitio de infección, que restringe el crecimiento del patógeno y lo torna avirulento (Dong, 1995). Como resultado ocurre una necrosis visible llamada respuesta hipersensible (RH) (Lamb, *et al.*, 1989; Dixon y Lamb, 1990). La RH implica la expresión localizada de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), y causa una muerte celular programada (PCD) en el hospedero, y deposición de callosa en el sitio de infección (Vogel *et al.*, 2002), además de glóbulos extracelulares conteniendo compuestos fenólicos los cuales se depositan cerca de las células que muestran la RH, y pueden funcionar en el reforzamiento de la pared celular (Vleeshouwer *et al.*, 2000). Con la RH se forma una zona de células muertas alrededor del sitio de infección, ocurre síntesis de ácido salicílico y una acumulación de agentes antimicrobianos, como las proteínas PR (quitinasas y glucanasas) y fitoalexinas (Dangl *et al.*, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Mittler *et al.*, 1999), también se da una perturbación del  $Ca^{2+}$  citosólico en el disparo de los mecanismos de defensa y en la mediación del establecimiento de la inmunidad sistémica (Delledone *et al.*, 2001).

La aparición de una respuesta hipersensible no solamente restringe el crecimiento del patógeno sino también precede, y puede ser la causa directa de la activación de un proceso de señalización que conduce a la expresión sistémica de una colección de genes PR y una resistencia no específica, reforzada y duradera contra un amplio rango de patógenos, conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR; Kuc, 1982; Ryals, 1994). Por lo tanto, una planta expuesta a un patógeno avirulento puede ser “inmunizada” contra una variedad de patógenos virulentos.

A partir de los resultados de Flor (1956, 1971) quien estudió la genética de la interacción entre la planta de lino y el patógeno *Melampsora lini*, se obtuvo una sustancial comprensión sobre las interacciones genéticas que controlan la resistencia de las plantas a las enfermedades, ya que se estudió concurrentemente la herencia de la resistencia en el hospedero y de la virulencia en el patógeno. Como resultado de estas investigaciones, se formuló la hipótesis de gen-por-gen. En su forma más simple, esta hipótesis establece que las plantas contienen genes de resistencia (*R*) sencillos, normalmente



dominantes, que reconocen específicamente patógenos que contienen genes complementarios de avirulencia (*avr*). Estos pueden ser definidos como genes del patógeno que codifican para una proteína que es condicionalmente reconocida directa o indirectamente sólo por aquellas plantas que contienen el gene *R* complementario. El reconocimiento específico resulta en la inducción de la expresión de genes de defensa y la inhibición del crecimiento del patógeno. Sin embargo, si la planta no contiene el gene *R*, el patógeno es aún capaz de causar enfermedad a la planta a pesar de contener el gen de avirulencia (Staskawicz, 2001).

La interpretación bioquímica mas sencilla de la hipótesis gen-por-gen, implica una interacción de un receptor y un ligando, entre productos de los genes *R* de la planta, y los correspondientes productos de los genes *avr* derivados de los patógenos. De hecho se ha demostrado una interacción directa entre proteínas Avr y proteínas R, aunque sólo en dos patosistemas: 1) la interacción entre la proteína Pto que es una proteína cinasa serina/treonina (producto del gene de resistencia *Pto* de tomate), y la proteína AvrPto producto del gen de avirulencia *avrPto* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996); 2) la interacción entre la proteína Pi-ta, una proteína R de la clase NBS-LRR-CC (producto del gene *Pi-ta* del arroz) y la correspondiente proteína AVR-Pita, producto del gene *avrPita* de *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.*, 2000). Sin embargo, el aislamiento y caracterización funcional de varios genes *R* de las plantas que confieren resistencia a una variedad de virus, bacteria, oomicetos, hongos, nemátodos e insectos, sugiere que la situación probablemente sea más compleja en muchas interacciones planta-patógeno (Dangl y Jones, 2001; Parker, 2003; Van der Hoorn *et al.*, 2002; Van der Biezen y Jones, 1998). Varios estudios han proporcionado evidencia de que las proteínas R son componentes de complejos mayores de percepción de señal, pero esas proteínas no necesariamente tienen que unirse directamente a sus correspondientes proteínas Avr (Holt *et al.*, 2003; Van der Hoorn *et al.*, 2002; Axtell y Staskawiks, 2003; Mackey *et al.*, 2002; Luderer *et al.*, 2001).

Esos estudios han conducido a la elaboración de la 'hipótesis de la guardia', la cual predice que las proteínas Avr actúan como factores de virulencia que

contactan sus blancos correspondientes de la patogenicidad en las plantas hospedadas, o aún plantas no hospedadas, pero funcionan como inductores de la resistencia específica de cultivar solamente cuando la proteína R complementaria es reclutada a un complejo funcional de percepción de señal (Dangl y Jones, 2001; Holt *et al.*, 2003; Bonas y Lahaye, 2002; Van der Hoorn *et al.*, 2002; Van der Biezen y Jones, 1998). El modelo de la hipótesis de la guardia sugiere los siguientes posibles escenarios. Primero, probablemente las proteínas R son parte de un complejo multiproteínico que debería incluir las proteínas que son el blanco de los factores de virulencia del patógeno. Segundo, las proteínas Avr, presumiblemente actuando como factores de virulencia, tienen como blanco específicamente una o más proteínas del hospedero. Esos blancos son probables socios de las proteínas R. Tercero, la perturbación de esos blancos celulares de los factores de virulencia, pueden o no ser requeridos para virulencia, Cuarto, en cualquier caso, la perturbación del blanco conduce a una activación de las proteínas R. Quinto, las proteínas R, se unen ya sea constitutivamente a su(s) socio(s) y enseguida se disocian después de la modificación del complejo por el efector del patógeno, o bien, forman una nueva interacción con un blanco celular que conduce a la activación (Belkhadir *et al.*, 2004)

Tras el reconocimiento del patógeno se desencadenan las respuestas de defensa con rápido flujo de iones, el estallido oxidativo extracelular, la reprogramación transcripcional dentro y alrededor de los sitios de infección y en la mayoría de los casos la respuesta hipersensible (Nimchuk *et al.*, 2003). Se considera que la suma de esos eventos conduce a la detención del crecimiento del patógeno (Belkhadir *et al.*, 2004).

En ausencia de un reconocimiento específico del patógeno, también ocurre una respuesta de defensa basal, la cual aparentemente es manejada por los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), tales como flagelina y lipopolisacáridos (Gómez-Gómez y Boller, 2002). En plantas, los PAMPs son más conocidos como inductores generales (no específicos). La respuesta de defensa basal se traslapa significativamente con la defensa mediada por proteínas R, pero es temporalmente más lenta y de

más baja amplitud. La defensa basal no prohíbe la colonización por el patógeno, pero limita la extensión de su difusión (Glazebrook, 1997). Así aparentemente, la acción de las proteínas R acelera y amplifica las respuestas de defensa basal innata. En contraste a la defensa basal de amplio espectro, no específica, la resistencia de las plantas a enfermedades mediada por genes R, controla niveles altos de resistencia, comúnmente específicos a cepas o razas específicas de patógenos (Ellis y Dodds, 2003).

Un componente tanto de la respuesta de defensa basal como la mediada por genes R, es la generación de una barrera física al patógeno consistente en la deposición de una papila de callosa en el sitio de intento de penetración del patógeno, con lo cual se logra un reforzamiento de la pared celular (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Dangl y Jones, 2001; Turner *et al.*, 2002).

### **2.3.1. Defensas químicas**

La mayoría de las plantas producen metabolitos secundarios ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta a stress o al ataque de patógenos. Algunos compuestos antimicrobianos preformados (fitoanticipinas) que están presentes constitutivamente en plantas sanas, representan barreras químicas naturales a la infección y podrían proteger a las plantas contra el ataque de un amplio rango de bacterias, hongos, virus, nemátodos y oomicetos potencialmente fitopatógenos (Osbourn, 1996). En contraste, compuestos antimicrobianos inducidos (fitoalexinas), no están presentes en plantas sanas, sino que son biosintetizados en respuesta al ataque de patógenos o estres abiótico como parte de una respuesta de defensa de la planta, y están restringidos al tejido colonizado por los patógenos, y a las células circundantes al sitio de infección (Paxton, 1981; Hammerschmidt, 1999).

Algunos metabolitos secundarios tales como glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, y ciertas saponinas, están almacenados en células vegetales como precursores inactivos, pero son rápidamente convertidos en antibióticos biológicamente activos por enzimas de la planta en respuesta al ataque de

patógenos. Estos compuestos también pueden ser considerados esencialmente como 'preformados', ya que las enzimas vegetales que los activan ya están presentes en tejidos saludables de la planta, pero están separadas de sus sustratos por compartimentalización, habilitando una rápida activación sin requerir la transcripción de nuevos productos de los genes (Van Etten *et al.*, 1994; Morrisey y Osbourn, 1999).

Aunque los inhibidores preformados están, por definición, ya presentes en plantas sanas a niveles donde ejercen una actividad antimicrobiana, sus niveles se pueden incrementar posteriormente en respuesta a desafío por patógenos (Prusky y Keen, 1995; Bais *et al.*, 2005). Algunos compuestos antimicrobianos pueden estar presentes constitutivamente en una parte de la planta, pero pueden ser inducidos como fitoalexinas en otros órganos (Van Etten *et al.*, 1994).

Se han reportado varios compuestos constitutivos de bajo peso molecular en plantas saludables que no han sido desafiadas por patógenos, los cuales inhiben el crecimiento de hongos *in vitro*, y por ello han sido involucrados como fitoprotectores antimicrobianos (Grayer y Harborne, 1994; Osbourn, 1996).

Los compuestos antimicrobianos de origen vegetal (fitoanticipinas y fitoalexinas), constituyen un diverso arreglo de diferentes clases de compuestos, incluyendo saponinas, fenoles, ácidos hidroxámicos cíclicos, glicósidos cianogénicos, isoflavonoides, sesquiterpenos, derivados de indol que contienen azufre, resorcinoles, dienos entre otros (Papadopoulou *et al.*, 1999).

#### **2.3.1.1. Modo de acción de compuestos naturales y sintéticos con acción fungicida**

Los fungicidas pueden ser clasificados de varias maneras: por su modo de acción (cómo afecta al patógeno), por su actividad en cuanto a sitios donde actúan (en un solo sitio o en varios, dentro de la célula del hongo), por su movilidad dentro de la planta (de contacto o sistémicos), o por su papel en la protección (preventivos o curativos).

El modo de acción de un fungicida describe cómo el compuesto químico afecta al hongo patógeno. Por ejemplo, algunos fungicidas inhiben una enzima específica en una ruta metabólica, otros dañan la membrana celular, y otros reaccionan con enzimas que contienen azufre. Es importante conocer el modo de acción de los fungicidas que se estén usando, de manera que se deberían aplicar fungicidas con diferentes modos de acción en un programa de control de enfermedades, para retardar el desarrollo de resistencia a fungicidas (Robertson, 2005).

Los productos naturales vegetales biológicamente activos contra microorganismos fitopatógenos, no han sido tan ampliamente estudiados en su modo de acción, como ha ocurrido con los compuestos sintéticos que se utilizan intensivamente en medicina humana y veterinaria, así como en la protección de cultivos.

El modo o mecanismo de acción de compuestos fungicidas tanto de origen natural como sintéticos, cae dentro de alguna de las siguientes clasificaciones (Ghanoum y Rice, 1999; Fernández-Northcote *et al.*, 2000; Ware y Whitacre, 2004; McGrath, 2004; Robertson, 2005; FRAC, 2005):

- A. Afectan la síntesis de ácidos nucleicos.
- B. Afectan la mitosis y la división celular.
- C. Afectan la respiración.
- D. Interfieren con la síntesis de aminoácidos y proteínas.
- E. Afectan la transducción de señal.
- F. Afectan la síntesis de lípidos y de la membrana celular.
- G. Inhiben la síntesis de esterol en las membranas.
- H. Inhiben la síntesis de glucanos.
- I. Inhiben la síntesis de melanina en la pared celular.
- J. Inducen la defensa de la planta hospedera.
- K. Poseen actividad multi sitio.
- L. Modo de acción desconocido.

Cowan (1999) hace una interesante revisión sobre productos vegetales como agentes antimicrobianos, y describe el modo de acción de metabolitos secundarios de las plantas, elaborando una clasificación de acuerdo a los grandes grupos de esos metabolitos (fenilpropanoides, fenoles, alcaloides, terpenoides)

**Fenoles y polifenoles.** Fenoles sencillos y ácidos fenólicos. Se considera que el modo de acción es la inhibición de la enzima  $\beta$ -glucano sintasa (inhibidores de la síntesis de glucanos) probablemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo, ó a través de interacciones inespecíficas con las proteínas (Mason y Wasserman, 1987).

**Quinonas.** Forman complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos en las proteínas, que frecuentemente conducen a la inactivación de la proteína y a su pérdida de función. Los blancos probables son las adhesinas, polipéptidos de la pared celular y enzimas ligadas a la membrana (Stern *et al.*, 1996).

**Flavonas, flavonoides y flavonoles.** Su actividad probablemente se debe a su habilidad para formar complejos con proteínas solubles y extracelulares y con las paredes celulares de las bacterias, similar a las quinonas. Los flavonoides más lipofílicos también pueden trastornar las membranas de los microorganismos (Tsuchiya *et al.*, 1996). Algunos flavonoides (como la glicirhizina) inhiben la respiración en virus (Watanbe *et al.*, 1996); La hesperetina reduce la reproducción intracelular de virus; catequina inhibe la infectividad y quercetina es muy efectiva para reducir también la infectividad.

**Taninos.** Estos compuestos forman complejos con las proteínas a través de las denominadas 'fuerzas inespecíficas' tales como el enlace del hidrógeno y efectos hidrofóbicos, así como la formación de enlaces covalentes (Haslam, 1996; Stern *et al.*, 1996). De esta manera su modo de acción como se describió para las quinolonas, puede estar relacionado con su habilidad para inactivar las adhesinas, enzimas, envoltura nuclear, transporte de proteínas, etc. También forman complejos con polisacáridos (Ya *et al.*, 1988).

Se ha determinado también que los taninos condensados se enlazan con las paredes celulares de bacterias ruminales impidiendo el crecimiento y la actividad de proteasas (Jones *et al.*, 1994). Algunos taninos pueden ser inhibitorios a las transcriptasas inversas de los virus (Kaul *et al.*, 1985; Nonaka *et al.*, 1990).

**Cumarinas.** Los ácidos hidroxicinámicos relacionados con cumarinas parecen ser inhibitorios a bacterias gram-positivas (Fernández *et al.*, 1996), mientras que algunas fitoalexinas que son derivados hidroxilados de cumarinas, se presume son antifúngicos (Hoult y Paya, 1996).

**Terpenoides y aceites esenciales.** Chaurasia y Yvas (1977), reportaron que el 60% de los derivados de aceites esenciales que examinaron eran activos contra hongos, mientras que 30% lo era contra bacterias. Así mismo, el triterpenoide ácido betulínico inhibió el HIV. El mecanismo de acción de los terpenoides no es totalmente entendido, pero se especula que involucra el trastorno de la membrana por los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999).

**Alcaloides.** El mecanismo de acción de los alcaloides altamente aromáticos tales como la berberina, se atribuye a su habilidad para intercalarse con ADN (Phillipson y O'Neill, 1987).

**Lectinas y polipéptidos.** Su mecanismo de acción puede ser la formación de canales de iones en la membrana de los microorganismos (Terras *et al.*, 1993; Zhang y Lewis 1997).

**Otros compuestos:** Quinolonas, ejercen su acción bactericida a través de la inhibición de la enzima ADN girasa; Polienos, perturban la función normal de la membrana citoplásmica de los hongos debido a su unión específica al ergosterol de las membranas (Cowan, 1999); Alcoholes racémicos tipo neolignanós, puede ser que actúen inhibiendo la síntesis o el ensamble de los polímeros de la pared celular de los hongos (Zacchino *et al.*, 1998).

### 2.3.2. Interacción aguacate-*Phytophthora*

El reconocimiento es el paso inicial en cualquier interacción directa planta-microorganismo. Este reconocimiento del hospedero por parte de *Phytophthora*, se ha enfocado en la acción de reconocer las características químicas, eléctricas y físicas de las raíces de las plantas por parte de las zoosporas. Tanto los factores específicos del hospedero tales como isoflavonas y factores no específicos de hospederos, tales como aminoácidos, calcio y campos eléctricos, tienen influencia sobre la taxia de las zoosporas, el enquistamiento, la germinación del quiste y el quimiotropismo de las hifas, en guiar al patógeno a sitios potenciales de infección (Tyler, 2002).

El reconocimiento del patógeno por parte de la maquinaria de defensa del hospedero ha sido analizado usando enfoques bioquímicos y genéticos. Los enfoques bioquímicos han identificado inductores (de parte de *Phytophthora*) de la respuesta de defensa del hospedero y en algunos casos los receptores correspondientes en el hospedero. Algunos inductores, tales como los glucanos y los ácidos grasos, tienen un amplio rango de hospederos, mientras que otros como las elicinas (típicas del género *Phytophthora*), tienen rangos restringidos de hospederos. La mayoría de los inductores identificados parecen contribuir primariamente a la resistencia básica o de no hospedero. El análisis genético ha permitido identificar genes de resistencia (*R*) del hospedero y genes de avirulencia (*Avr*) del patógeno. Por ejemplo, un gene *Avr* de *Phytophthora*, *Avr1b* de *P. sojae*, ha sido clonado y caracterizado; codifica un inductor secretado, que dispara un amplio sistema de respuesta de defensa en plantas de soya que portan el gene complementario *R*, *Rps1b* (Tyler, 2002).

Las zoosporas de *P. cinnamomi* son atraídas a las raíces de aguacate por los exudados de éstas, constituidos principalmente de los aminoácidos asparagina y glutamina. Las zoosporas son atraídas específicamente a heridas, si las hay, o bien justo detrás de la cofia de la raíz (Pegg *et al.*, 2002). Cuando las zoosporas hacen contacto con la raíz, pierden sus flagelos y forman pequeños quistes esféricos. Los quistes germinan para formar la hifa de infección, que



invade la corteza de la raíz intracelularmente. A su vez, el aguacate reconoce a *P. cinnamomi* por la liberación de éste de inductores conocidos como  $\alpha$ -cinnamomin y  $\beta$ -cinnamomin (Pernollet *et al.*, 1993; Kamoun *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1999). Generalmente estos inductores provocan respuestas de defensa de la planta, que se manifiestan por la respuesta hipersensible.

Se han reportado casos que pueden ilustrar la resistencia sistémica inducida, ya que en plantas de aguacate cv. Topa-Topa susceptibles a *P. cinnamomi*, al ser inoculadas con dos tipos de cepas, una de alta virulencia (AV) y otra de baja virulencia (BV), las primeras manifestaron la enfermedad y murieron, mientras que las plantas inoculadas con la cepa BV, aunque manifestaron síntomas leves de la enfermedad, ésta no prosperó. Estas mismas plantas que habían sido previamente inoculadas con la cepa BV, fueron posteriormente inoculadas con la cepa AV y como consecuencia las plantas susceptibles mostraron resistencia a la cepa AV (Pinkas *et al.*, 1992).

Por otra parte, con la aplicación de inductores como el benzotiadiazol y agentes de biocontrol como *Trichoderma hamatum* 382 (T382), se provocó una resistencia inducida en pepino contra *P. capsici* (Khan *et al.*, 2002) y algo similar ocurrió cuando se utilizó ácido benzoico como inductor, confiriendo resistencia inducida en *Banksia attenuata* contra *P. cinnamomi* (Williams *et al.*, 2002).

### **2.3.3. Compuestos preformados contra oomicetos**

De los compuestos clasificados como fitoanticipinas, varios han mostrado actividad inhibitoria tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* contra oomicetos y algunos de ellos han sido involucrados en la defensa de las plantas contra las enfermedades. Ejemplos de metabolitos secundarios sobresalientes contra los oomicetos, son los siguientes: 1) Alcaloides ceveratrum que son alcaloides esteroidales biológicamente activos contra *Plasmopara halstedii* (Oros *et al.*, 1999), se postula que estos alcaloides interactúan con la membrana celular, alterando su integridad y/o su función; los alcaloides más activos de este grupo fueron la cevacina y la cevadina. 2) Proteínas inactivadoras de ribosomas

(RIPs), algunas de las cuales han sido aisladas de *Mirabilis expansa* con actividad contra *Pythium irregulare* así como contra bacterias, que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas por su actividad de N-glicosidasa cortando selectivamente un residuo de adenina en un sitio conservado del ARNr 28S; esto impide la unión del factor de elongación 2 con el consecuente arresto de la síntesis de proteínas; se menciona que las RIPs también tienen amplia actividad antiviral contra virus de ARN y ADN de las plantas (Vivanco *et al.*, 1999). 3) Ácidos anacárdicos reportados por Begum *et al.* (2002) extraídos de frutos de *Ginkgo biloba* inhibieron la movilidad de zoosporas de *Aphanomyces cochlioides* provocando enseguida la lisis de las mismas. 4) Nicotinamida, como el principio activo de extractos de hojas de *Amaranthus gangeticus* y de extractos de cotiledones de chícharo (*Pisum sativum*) provocaron un inhibición total de la movilidad de las zoosporas de *Aphanomyces cochlioides* (Shimai *et al.*, 2002). 5) Proteínas básicas e hidrofóbicas (filoplaninas) obtenidas por el lavado de hojas de una planta (1068) de *Nicotiana tabacum*, inhibieron la germinación de esporas de *Peronospora tabacina* y por tanto la infección. Se evidenció que esas proteínas se producen solamente en la célula apical de los tricomas glandulares (Shepherd *et al.*, 2005).

#### **2.3.4. Compuestos preformados contra *Phytophthora***

En años recientes se han aislado de plantas algunos compuestos preformados biológicamente activos contra oomicetos y se ha evaluado su eficacia en el control específico de representantes del género *Phytophthora*. Por ejemplo, glicósidos esteroidales extraídos de rizomas de *Dioscorea* que inhibieron el crecimiento de zoosporas de *P. infestans* (Vasiukova *et al.*, 1977); ocatina, una proteína PR-10 obtenida de la cutícula y capas de peridermis de tubérculos de *Oxalis tuberosa*, con inhibición del crecimiento de hifas de *P. cinnamomi* (Flores *et al.*, 2002); vainillina y umbeliferona de peciolo de *Hevea brasiliensis* que suprimieron la germinación de zoosporas de *P. meadii* (Jayasuriya *et al.*, 2003); afinina, una alcalamida de raíces de *Heliopsis longipes*, inhibidor del crecimiento de las hifas de *P. infestans* (Molina-Torres *et al.*, 2004); patatina-J, una hidrolasa lípido acil no específica (actividad lipolítica) de tubérculos de

papa, con fuerte inhibición de las zoosporas de *P. infestans* (Sharma *et al.*, 2004).

### 2.3.5. Metabolitos secundarios de aguacate biológicamente activos

También se han aislado varios metabolitos secundarios biológicamente activos de aguacate (*Persea americana* Mill.). Algunos de ellos han demostrado diferentes tipos de actividades:

1. **Antifúngica:** Cuatro compuestos aislados de la cáscara de frutos inmaduros de aguacate identificados como: 1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-ino, 1,2,4- trihidroxiheptadeca-16-eno, y 1-acetoxi-2-4-dihidroxi-16-ino, (este último ya se había detectado previamente en semillas de aguacate) y el más potente 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicoso-12,15-dieno, poseen notable actividad contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Adikaram *et al.*, 1991; Kobiler *et al.*, 1993; Prusky y Keen, 1993; Domergue *et al.*, 2000).
2. **Bactericida:** Un extracto de semillas de aguacate exhibió actividad contra algunas bacterias Gram-positivas, siendo el compuesto más activo del extracto un compuesto alifático de cadena larga, 1,2,4-trihidroxi-n-heptadeca-16-eno (Neeman *et al.*, 1970).
3. **Insecticida:** Un aceite extraído de las células del idioblasto del mesocarpio del aguacate, fue tóxico contra larvas de *Spodoptera exigua* y se identificó como (12Z, 15Z) -1- acetoxi- 2- hidroxio-4 - oxo- heneicoso- 12, 15- dieno (persina) (Rodríguez-Saona *et al.*, 1998; Rodríguez-Saona y Trumble, 2000),
4. **Antiviral:** Algunos extractos de hojas de aguacate tanto acuosos como metanólicos, tuvieron actividad moderada contra el HIV-1 (virus de la inmunodeficiencia humana) en pruebas *in vitro* (Wigg *et al.*, 1996). Una infusión de hojas de aguacate mostró una fuerte inhibición del virus del herpes tipo 1 (HSV-1); se aislaron los monoglicósidos flavonol y kaempferol, así como quercetina y otros derivados. Las sustancias aisladas fueron menos activas que la infusión (de Almeida *et al.*, 1998).

5. **Antioomiceto:** Zaki y Col. (1973), reportaron haber encontrado en extractos de órganos (Hojas, frutos y raíces) de *Persea borbonia*, una especie incompatible con *P. americana*, un compuesto químico que era tóxico a *Phytophthora cinnamomi*. Posteriormente el compuesto fue aislado y caracterizado, y se le dio el nombre de borbonol. Este compuesto es un carbohidrato de cadena larga con un anillo lactona, y se postuló que la presencia de ese compuesto podría ser la base de la resistencia a *P. cinnamomi*, y que las especies de *Persea* con bajas o nulas concentraciones de borbonol en sus raíces serían susceptibles (Zaki *et al.*, 1980).

Wehner y col. (1981), obtuvieron extractos de hojas y brotes de varios cultivares de aguacate para detectar la presencia de borbonol y algunos otros compuestos fungitóxicos. Compararon los extractos obtenidos con un extracto crudo de borbonol, extraído de *Persea borbonia* para evaluar su actividad contra *P. cinnamomi* y otros hongos fitopatógenos. Se efectuaron análisis de espectrofotometría y de cromatografía en capa fina (TLC), y si se presentara alguna fracción absorbiendo luz ultravioleta (UV) a 254 nm, y con un factor de corrida (*Rf*) de 0.55, eso sería un indicio de la presencia de borbonol en los extractos de aguacate (Zaki *et al.*, 1980). Los resultados de TLC mostraron que a *Rf*= 0.55 se encontró una banda o fracción con actividad fungitóxica, aunque débil comparada con otras fracciones. Se encontró una fracción con una inhibición pronunciada del crecimiento de varios hongos en un *Rf* de valor cercano a cero. En el caso de los extractos del cultivar (cv.) Edranol, que es moderadamente resistente a *P. cinnamomi*, se presentó una fracción con inhibición pronunciada a un *Rf* de 0.3. Ninguna de las fracciones mencionadas absorbió UV a 254 nm, pero si la hubo en otro árbol de aguacate (que había escapado en campo al ataque de *P. cinnamomi*), y la fracción tuvo un *Rf* de 0.55, y aunque esta fracción presentó alguna actividad inhibitoria, también la presentó otra fracción con *Rf* de 0.72.

La discusión de estos resultados indicó que todos los extractos probados, incluyendo el extracto crudo de borbonol, tuvieron un efecto inhibitorio calificado de moderado hacia *P. cinnamomi*. También hubo indicaciones de que

en los árboles de aguacate evaluados existen otros compuestos fungitóxicos, además de borbonol, y que esos compuestos son diferentes en estructura y actividad. Dichos compuestos no fueron identificados en esa investigación.

Posteriormente, Wehner y col. (1982), obtuvieron extractos de hojas, cáscara y pulpa del fruto, semillas y raíces de diferentes árboles de aguacate, y los evaluaron contra *P. cinnamomi*, así como contra hongos que producen enfermedades en la raíz y en fruto poscosecha. Los resultados mostraron que los mayores efectos fungitóxicos provenían de los extractos de hojas, seguido por extractos de mesocarpio del fruto, raíz, semilla y cáscara del fruto, en ese orden. Se concluyó que los extractos fungitóxicos estuvieron presentes en todos los árboles evaluados. La actividad inhibitoria podría ser atribuida a más de un compuesto, y que esos compuestos se presentaron en diferentes partes de la planta, mas bien que en diferentes árboles. Tomando los resultados específicos de fungitoxicidad a *P. cinnamomi*, los mayores efectos en promedio en todos los árboles, fue el de los extractos de raíces, y los de menor efecto, los de la cáscara del fruto.

#### **2.4. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS RESISTENTES A PATÓGENOS**

Existen diversos métodos para poder seleccionar materiales vegetales resistentes a insectos, bacterias, hongos y virus. Previo a los desafíos específicos entre plantas y patógeno, puede ser útil contar con información derivada de la caracterización de las plantas candidato. Generalmente en los bancos de germoplasma constituidos por colecciones de campo, se realiza una caracterización agromorfológica por medio de una lista de descriptores cuidadosamente seleccionados, acompañada de evaluaciones agronómicas tempranas (Jaramillo y Baena, 2000). Aunque con menor frecuencia, también se realizan caracterizaciones químico biológicas cuando se busca la resistencia a insectos y mamíferos herbívoros, así como a patógenos, para detectar aquellos productos naturales que sean repelentes, disuasivos de la alimentación, de sabor amargo, o definitivamente tóxicos para los consumidores. La caracterización genético molecular se ha utilizado con

frecuencia para estudios taxonómicos y de filogenia, así como para estudios evolutivos, aunque en los últimos años también se han utilizado para detectar genes análogos de resistencia a enfermedades.

#### **2.4.1. Caracterización agromorfológica**

Los recursos genéticos se conservan para utilizarlos, y ello solo es posible si se conocen sus características y posibles usos. La información que nos permite conocer el germoplasma y determinar su utilidad, proviene de tomar y analizar un conjunto de datos sobre el germoplasma, en diversas etapas de la conservación pero principalmente durante la caracterización y la evaluación.

La caracterización y la evaluación son actividades complementarias que consisten en describir los atributos cualitativos y cuantitativos de las accesiones de una misma especie para diferenciarlas, determinar su utilidad, estructura, variabilidad genética y relaciones entre ellas, y localizar genes que estimulen su uso en la producción o en el mejoramiento de cultivos. La caracterización del germoplasma consiste en describir sistemáticamente las accesiones de una especie a partir de características cualitativas que se asume son de alta heredabilidad y no varían con el ambiente (Jaramillo y Baena, 2000).

La caracterización se realiza en una población representativa de las accesiones y mediante una lista de descriptores (características) y los instrumentos para registrarlos. El material a caracterizar se siembra en campo en unidades debidamente identificadas y en condiciones de manejo uniformes. Establecidas las poblaciones objetivo, se observan las características de la especie en las diversas etapas de desarrollo y se registra la expresión a partir de un conjunto seleccionado de descriptores. Los datos se toman y se registran de manera sistemática ordenada y consistente, para facilitar su posterior análisis estadístico, y para que la información que se obtenga en diferentes regiones a partir de los mismos descriptores sea comparable y compatible (Franco e Hidalgo, 2003).

Tradicionalmente, la evaluación de las diferencias morfológicas ha sido utilizada para medir la diversidad que existe entre y dentro de poblaciones de las especies en estudio. Esas medidas tienen la ventaja de que son fácilmente realizables, no requieren un equipo sofisticado y son la apreciación más directa de un fenotipo. Por tanto, están al alcance para uso inmediato, lo que es un atributo importante. Sin embargo, las determinaciones morfológicas deben ser efectuadas por un experto de la especie, están sujetas a cambios debido a factores ambientales, pueden variar en las diferentes etapas de desarrollo de las plantas, y su número es limitado (de Vicente y Fulton, 2003).

La caracterización agromorfológica de accesiones de aguacate de bancos de germoplasma, ha conducido a la clasificación taxonómica de las mismas y su agrupación en especies, y subespecies o variedades botánicas. Adicionalmente se han identificado características agronómicas que serían ventajosas (tamaño y forma de fruto, época de cosecha, etc.) en siembras comerciales de esas accesiones (Sánchez-Pérez, 1999; Campos-Rojas *et al.*, 2006).

#### **2.4.2. Caracterizaciones química y bioquímica (proteica)**

Para superar algunas limitaciones de los marcadores morfológicos en la caracterización de germoplasma, se han desarrollado otros tipos de marcadores tanto a nivel químico y proteico (del fenotipo) como a nivel de ADN (del genotipo).

La caracterización química ha sido ampliamente utilizada en quimiotaxonomía, es decir, para diferenciar especies, subespecies, variedades botánicas, poblaciones e híbridos (Scora y Bergh, 1992; Otto y Wilde, 2001) en el reino vegetal. También ha permitido identificar metabolitos secundarios que están estrechamente relacionados con la defensa de la planta contra herbívoros y microorganismos fitopatógenos como ya se describió en el apartado de defensas químicas de las plantas. Se considera importante la caracterización química del aguacate ya que las variantes químicas detectadas se pueden relacionar con la susceptibilidad a plagas y enfermedades (Anaya *et al.*, 2001).

Rincón–Hernández (2005) caracterizó químicamente el mismo banco de germoplasma mencionado en este trabajo y encontró que existe una correlación positiva entre el contenido de estragol de las hojas y la resistencia a la agalla de la hoja del aguacate (*Trioza anceps* Tuthill).

Los marcadores proteicos se conocen también como marcadores bioquímicos, aunque existe una tendencia creciente a incluirlos en una clase común bajo la denominación de ‘marcadores moleculares’. Los marcadores proteicos utilizados para la caracterización (proteínas de almacenamiento de la semilla e isoenzimas) se obtienen mediante electroforesis, aprovechando las propiedades migratorias de las proteínas y de las enzimas, y se detectan mediante tinciones histoquímicas específicas de las enzimas que se quieren analizar.

La detección de polimorfismos —o sea, las diferencias detectables para un marcador determinado en un grupo de individuos— en los marcadores proteicos, es una técnica que comparte algunas de las ventajas de los marcadores morfológicos. Sin embargo, los marcadores proteicos están también limitados por la influencia del ambiente y de los cambios que ocurren en las diferentes etapas del desarrollo. Aún así, las isoenzimas son un complemento robusto del análisis morfométrico sencillo de la variación.

#### **2.4.3. Caracterización molecular**

Los polimorfismos del ADN pueden detectarse en el ADN nuclear y en el ADN de los organelos; este último se encuentra en las mitocondrias y en los cloroplastos. Los marcadores moleculares afectan a la molécula de ADN como tal, y se consideran por ello, medidas objetivas de la variación. No están sujetos a las influencias ambientales, las pruebas con ellos pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo de las plantas, y tienen el potencial de hallarse en número ilimitado porque abarcan todo el genoma, lo que representa su mejor atributo (de Vicente y Fulton, 2003).



En los últimos años la Biología Molecular ha permitido el desarrollo de poderosas herramientas mediante la cual se pueden hacer análisis taxonómicos, descartando algunas de las limitaciones de la taxonomía tradicional. Una de las principales herramientas es el uso de marcadores genéticos o moleculares, los cuales se basan en la detección de polimorfismos en el ADN, producto de los diversos mecanismos que operan en forma natural para causar cambios en el mismo, logrando detectar desde un simple cambio en un par de bases hasta cambios en gran escala como inversiones, translocaciones o eliminaciones (Cloutier y Landry, 1994).

Entre las técnicas más desarrolladas se encuentran las del Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (Bostein *et al.*, 1980); el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Vos *et al.*, 1995); y el de DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD's) (Williams *et al.*, 1990). Estas dos últimas basadas en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada por Mullis *et al.*, (1986).

La técnica de RAPD's genera marcadores que pueden ser usados para diferenciar cepas y variedades indistinguibles morfológicamente (Koller *et al.*, 1993). Esta técnica se utiliza para generar patrones que se consideran huellas para aplicarlos a programas de mejoramiento, identificación de cultivares, así como establecer relaciones taxonómicas, la construcción de mapas genéticos y la determinación de parentesco, entre otras aplicaciones (Welsh y McClelland, 1990).

En el mejoramiento genético de plantas, los marcadores moleculares, principalmente los AFLP's y los SSR's (Repeticiones sencillas de secuencias) o microsatélites, se están utilizando en la determinación de diversidad genética y el mejoramiento de caracteres agronómicos específicos. Se utilizan para elegir los progenitores adecuados en las hibridaciones, para mapear/etiquetar bloques de genes asociados a caracteres económicamente importantes (loci de caracteres cuantitativos), que a su vez permiten la selección asistida por marcadores en retrocruzamientos, pedigríes, y programas de mejoramiento de poblaciones (Mohan *et al.*, 1997).

La identificación y mapeo de marcadores ligados a resistencia a organismos dañinos como insectos, hongos, bacterias, nemátodos y virus, permiten incorporar dicha resistencia de unas variedades a otras en las principales especies cultivadas. También los marcadores moleculares se pueden utilizar para descubrir de manera efectiva y explotar eficientemente, las relaciones evolutivas entre organismos a través de comparación de genomas (Hash y Bramel-Cox, 2000).

Recientemente se han desarrollado otros marcadores moleculares estrechamente relacionados con genes de resistencia a enfermedades, conocidos como RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphism) con los cuales se ha logrado identificar genes de resistencia a enfermedades específicas en cebada, trigo y arroz (Chen *et al.*, 1998a; Chen *et al.*, 1999, 2002; Collins *et al.*, 2001; Chen, 2002).

La técnica molecular con RGAP's utiliza electroforesis de alta resolución y detección sensible de fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos basados en dominios conservados de genes vegetales de resistencia a enfermedades. La técnica tiene la posibilidad de desarrollar marcadores directos para genes de resistencia a enfermedades. Estos marcadores RGAP se han utilizado para determinar relaciones genéticas de germoplasma en trigo, cebada, arroz y otros cultivos. La técnica también ha resultado exitosa para desarrollar marcadores moleculares para genes que confieren resistencia a varias enfermedades en diferentes cultivos. En muchos casos, los marcadores RGAP co-segregan completamente con genes de resistencia y han sido mapeados en las mismas regiones cromosómicas que los loci para caracteres cuantitativos de resistencia. Algunos marcadores RGAP tuvieron alta homología de secuencia con genes de resistencia de plantas que en el pasado han sido clonados, sugiriendo que la técnica es útil para una eficiente clonación de genes de resistencia a enfermedades.

Hasta el año 2003 se habían clonado al menos unas dos docenas de genes de resistencia a enfermedades (genes *R*) en diversas especies vegetales (Deng y

Gmitter, 2003). Con la caracterización de esos genes se hicieron descubrimientos importantes. Se encontró que los genes R comparten motivos comunes tales como repeticiones ricas en leucina (LRR), sitios de unión de nucleótido (NBS), y dominios cinasa serina/treonina, y esto ofrece amplias oportunidades para aislar secuencias similares en otras especies vegetales (Yan *et al.*, 2003).

Secuencias específicas de ADN genómico amplificadas por iniciadores degenerados basados en esos motivos son conocidas como genes análogos de resistencia (RGAs). El enfoque RGA ha sido usado para aislar genes de resistencia de las plantas y desarrollar marcadores moleculares. Leister y colaboradores (1996) obtuvieron productos de PCR en papa que eran homólogos a conocidos genes de resistencia, y ligados al locus de resistencia a nemátodos *Gro1*, y al locus de resistencia al tizón tardío *R7*. Similarmente, Kanazin y col. (1996) mapearon varios loci RGA que eran cercanos a conocidos genes de resistencia en soya. Yu y col. (1996), mapearon RGAs en la vecindad de conocidos genes para resistencia a potivirus (*Rsv1* y *Rpv*), pudrición de la raíz por *Phytophthora* (*Rps1*, *Rps2*, y *Rps3*) y mildiu polvoriento (*rmd*) en soya. Feuillet y col. (1997), aislaron un gene candidato *LrK10* para resistencia a la roya de la hoja en trigo. Muchos de esos RGAs están estrechamente ligados, o cosegregan con loci de resistencia a enfermedades conocidos (Kanazin *et al.*, 1996; Leister *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 2000); como tales, ellos representan lo último en marcadores moleculares para resistencia a enfermedades en plantas (Michelmore, 1996). Varios RGAs han facilitado la clonación de la longitud total de genes *R* funcionales, incluyendo el gene *Dm3* de lechuga que confiere resistencia a 'mildiu vellosa' (*Bremia lactucae*; Meyers *et al.*, 1998), y el gene *Rpp8* de *Arabidopsis*, que es responsable de la resistencia a *Peronospora parasitica* (Aarts *et al.*, 1998). Por lo tanto, los RGAs proveen valiosos recursos de secuencias para utilizar el enfoque de genes candidato para clonar genes *R* (Pflieger *et al.*, 2001).

Chen y col. (1998a), mejoraron el enfoque RGA usando electroforesis de alta resolución y detección sensible para separar los productos de PCR amplificado con iniciadores basados en secuencias conservadas de genes de resistencia

ya clonados. Posteriormente, la técnica fue denominada como polimorfismo de genes análogos de resistencia (RGAP) (Chen *et al.*, 1998b). La técnica RGAP ha sido exitosamente usada para desarrollar marcadores moleculares para genes que confieren resistencia a la roya lineal de la hoja, y otras enfermedades del trigo y cebada (Chen *et al.*, 1998b, 1999; Toojinda *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001).

En la planta de aguacate se han utilizado varios tipos de marcadores moleculares con diferentes objetivos. Por ejemplo, se han utilizado los microsatélites (SSRs) para análisis de parentesco con el fin de estimar el flujo de genes de variedades comerciales hacia poblaciones de criollos (Birnbaum *et al.*, 2003), así como para identificar marcadores co-transmitidos con factores genéticos que confieren características agronómicas deseables (rendimiento) (Clegg, 2005), o para determinar la incidencia y efectividad de la autofecundación y la polinización cruzada en variedades de aguacate, analizando la progenie (Davenport *et al.*, 2005).

Para encontrar relaciones filogenéticas entre accesiones de los bancos de germoplasma de aguacate, tanto dentro de cultivares como entre especies de *Persea*, se han utilizado solos, o en combinación, microsatélites, RAPDs y minisatélites (VNTRs), (Schnell *et al.*, 2003; Huanosto-Magaña, 2000; Mhameed *et al.*, 1997). Los VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats), también se han utilizado para estimar el nivel de heterocigocis en las progenies de autofecundaciones y cruzamientos de cultivares de aguacate (Mahmeed *et al.*, 1996). Sharon y colaboradores (1997, 1998), utilizaron SSRs, RAPDs y minisatélites, para elaborar mapas de ligamiento y detectar QTLs (Quantitative Trait Loci), estudiando 8 caracteres del fruto de aguacate.

A la fecha no se tiene conocimiento de reportes respecto a que se estén utilizando RGAPs en aguacate.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

Dentro de la raza Mexicana de aguacate, se encuentran individuos con capacidad de inhibición del crecimiento del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands.

#### **3.2. OBJETIVOS**

##### **3.2.1. Objetivo General**

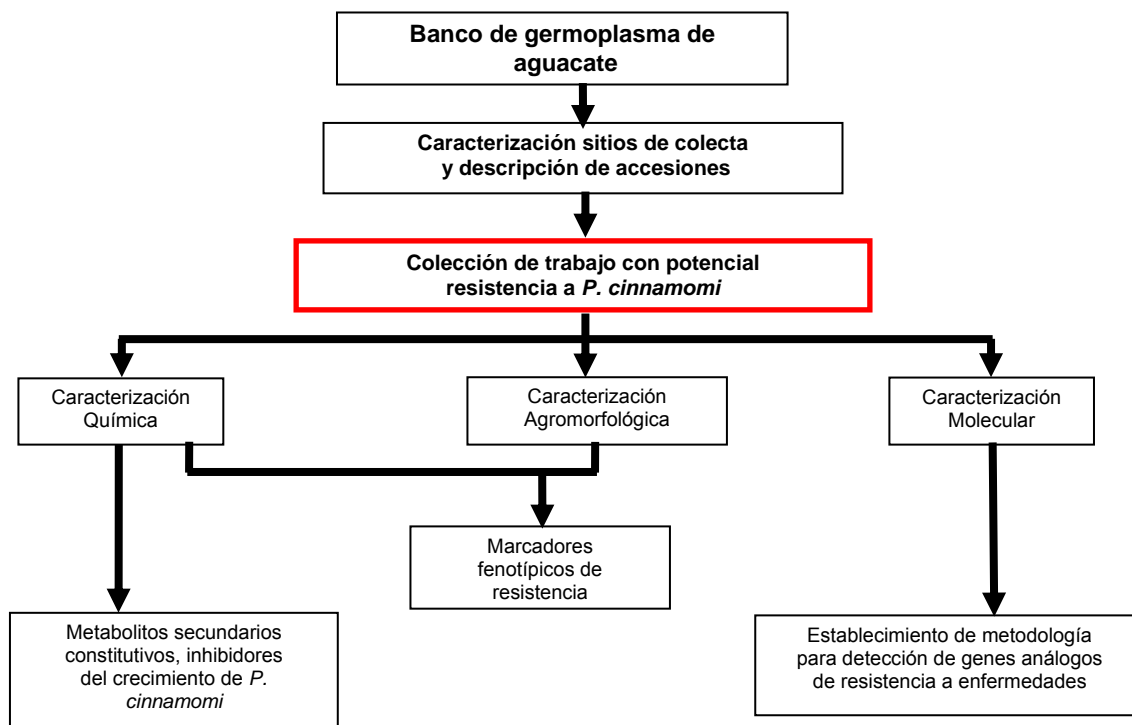
Identificar marcadores agromorfológicos químicos o moleculares, en aguacate de raza Mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) asociados con la capacidad de inhibición del crecimiento y desarrollo del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands.

##### **3.2.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar agromorfológicamente el material genético del Banco de Germoplasma del INIFAP en Michoacán y seleccionar una colección núcleo en búsqueda de marcadores fenotípicos asociados a la capacidad de inhibición de *P. cinnamomi*.
2. Identificar fitoanticipinas o fitoprotectores preformados que inhiban el desarrollo de *P. cinnamomi* en genotipos de aguacate.
3. Estandarizar la metodología para identificar genes candidatos de resistencia a *P. cinnamomi* en genotipos de aguacate de la colección núcleo.

## IV. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 4.1. Diagrama general de la estrategia metodológica



### 4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.2.1. Banco de germoplasma de aguacate

El banco de germoplasma de aguacate (*Persea americana* Mill.) de INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Forestales y Pecuarias), está ubicado en el área de influencia de los Campos Experimentales Agrícolas Forestales y Pecuarios (CEFAP) Uruapan y Valle de Apatzingán, consta de un total de 628 accesiones caracterizadas parcialmente.

#### 4.2.2. *Phytophthora cinnamomi* Rands

Las cepas de *P. cinnamomi* fueron proporcionadas por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Agrobiología de la UMSNH. De un total de 17 cepas, de acuerdo a un ensayo anterior realizado por Ochoa-Ascencio

(comunicación personal), se seleccionó la más virulenta para utilizarla en este estudio. Las cepas de *P. cinnamomi* fueron mantenidas en medio PDA (Papa Dextrosa Agar, BIOXON, México) en cajas de Petri a 25° C ± 1° C, con resiembras cada 15 días.

### **4.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA COLECCIÓN NÚCLEO**

#### **4.3.1. Método de extracción**

Se colectaron raíces sanas de 48 árboles de aguacate (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) preseleccionados de acuerdo a los descriptores agromorfológicos (ver sección de resultados adicionales). Un grupo de raíces fueron congeladas de inmediato en nitrógeno líquido y otro grupo se congeló 5 h después. Posteriormente en laboratorio se tomó una muestra de 1 g de raíz congelada de cada material y se molieron en mortero hasta su pulverización. El polvo resultante fue sometido a extracción con 10 ml de metanol-cloroformo (2:1), con agitación vigorosa y continua. Posteriormente los extractos se colocaron en embudos de separación agregando 10 ml de agua destilada agitando vigorosamente tres veces y después manteniéndolos en reposo por un tiempo de 15 a 30 min para permitir la separación de las fases acuosa y orgánica. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones. Ambas fases se aislaron y fueron centrifugadas separadamente (10 min, 5000 x g) para remover los residuos vegetales, para después someterlas a evaporación hasta sequedad bajo vacío a 45° C. Para ambas fases, el residuo fue disuelto en 500 µl de etanol absoluto. Los extractos de raíces fueron almacenados a 4° C para su posterior análisis.

#### **4.3.2. Ensayos *in vitro***

Los bioensayos *in vitro* fueron realizados por el método de difusión de extracto en placa, cultivando fragmentos de micelio sobre el centro de la placa, para observar el efecto de cada extracto sobre el desarrollo de micelio. Fragmentos de micelio de *P. cinnamomi* (0.2 mm<sup>2</sup>) se colocaron en el centro de una caja de petri (4.5 cm de diámetro) previamente adicionada con 50 µl de cada extracto o fracción en la superficie del medio de cultivo PDA. Se monitoreó el crecimiento

del micelio a 25° C por 15 días. Como control se utilizó etanol absoluto (50 µl) y los tratamientos se condujeron con cinco repeticiones. El crecimiento del micelio alcanzó su máximo a ocho días del inicio del cultivo y se consideró un crecimiento igual al diámetro de la caja de petri como 0% de inhibición.

#### **4.3.3. Purificación parcial de los compuestos activos**

Los extractos de las accesiones de aguacate que mostraron los porcentajes de mayor inhibición sobre el oomiceto, fueron analizados por cromatografía de capa fina para la separación de compuestos, utilizando placas de Gel de Sílice (60 Sigma®, 20 x 20) bajo el sistema de solventes metanol-cloroformo (2:1) en una cámara de cromatografía. En cada sistema de separación se utilizó un volumen de 500 µl de cada extracto, las placas (cubiertas) se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a irradiación con luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) para observar las bandas de los compuestos mayoritarios, determinando el factor de corrida (*R<sub>f</sub>*) para cada una de las bandas. Las diferentes bandas fueron eluidas con el solvente de extracción (10 ml de metanol-cloroformo, 2:1), denominándolas fracciones. Cada fracción fue evaporada hasta sequedad al vacío a 45° C y disuelta en 500 µl de etanol absoluto, cada una fue analizada por espectrofotometría y utilizada posteriormente en los bioensayos, para determinar las más activas. La fracción más activa fue analizada por estudios de cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM).

#### **4.3.4. Análisis por espectrofotometría**

Cada muestra de extracto de raíz de las accesiones de aguacate fue analizada por espectrofotometría en un rango de ultravioleta a luz visible (200-800 nm) en un espectrofotómetro Beckman DU 640 para observar el patrón de absorbencia de cada una de ellas y comparar el número de crestas importantes entre todos los extractos. Por otra parte, cada fracción fue sometida a este estudio para determinar la absorbencia máxima y observar su pureza en comparación a los extractos crudos.



#### **4.3.5. Análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)**

El análisis CG-EM se llevó a cabo en un espectrómetro Hewlett Packard 5973 usando una columna capilar de 30 m de largo y un diámetro interno de 0.25 mm. Se utilizó el siguiente programa: temperatura del inyector de 240° C hasta la interfase de 260° C, una temperatura inicial del horno de 50° C durante 1 min, incrementando 20° C por min, hasta alcanzar los 200° C y manteniéndose a esta temperatura por 8 min con 30 s, con un tiempo total de 30 min. Los picos detectados del compuesto mayoritario presente en la fracción purificada del extracto con la más alta actividad antioomiceto, fueron identificados por sus datos de retención y sus patrones de fragmentación. Los espectros de masas fueron finalmente comparados con las bibliotecas de computadora MS, Wiley 138 L.

#### **4.4. Establecimiento de una metodología para detección de genes análogos de resistencia (RGAs) a enfermedades en aguacate.**

Con el objeto de evaluar la posibilidad de encontrar genes análogos de resistencia a enfermedades (RGAs) en el genoma de aguacate, se desarrolló un procedimiento por medio del cual a partir del aislamiento de ADN de accesiones seleccionadas de aguacate (entre las que presentaron mayor inhibición del oomiceto en la caracterización química), se recurrió al proceso de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como iniciadores oligonucleótidos específicamente diseñados, es decir, oligonucleótidos basados en dominios conservados de genes de resistencia a enfermedades (genes *R*).

Como primer paso se necesitó estandarizar el protocolo de extracción de ADN de aguacate, ya que la experiencia nos mostró que los protocolos existentes rendían resultados inconsistentes. Se sintetizaron los oligonucleótidos degenerados en base a las secuencias de genes *R* ya clonados, tomando las experiencias de otros investigadores (Leister *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998b; Ramalingam *et al.*, 2003). Posteriormente se procedió a estandarizar el

protocolo de PCR para la amplificación de los fragmentos de ADN aislados con los iniciadores diseñados, y al final se corrió el análisis de electroforésis en gel de agarosa para detectar los polimorfismos.

## V. RESULTADOS

**Inhibition of mycelia growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*  
Rands with root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var.  
*drymifolia*).**

**Inhibición del crecimiento del micelio de *Phytophthora cinnamomi* Rands. con extractos de raíces de aguacate Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).**

**Inhibition of mycelia growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands with root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*).**

José de La Luz Sánchez Pérez<sup>1</sup>§, Ma. Guadalupe Jaimes Lara<sup>1</sup>, Joel Edmundo López Meza<sup>2</sup> and Rafael Salgado Garciglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Edif. B3, C.P. 58030, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

<sup>2</sup> Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apdo. Postal 53, Administración Chapultepec, C.P. 58262 Morelia, Michoacán, México.

§ Autor para correspondencia: [jolusanchez@msn.com](mailto:jolusanchez@msn.com)

## ABSTRACT

The aim of this research was to identify active compounds against the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands in rootstocks of Mexican or “criollo” avocado plants (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). According to environment and site descriptors, 48 accessions with potential resistance to *P. cinnamomi* were selected from the INIFAP-México avocado germplasm bank to obtain aqueous and organic root extracts. Only organic extracts inhibited the mycelia growth of *P. cinnamomi*. Seven root extracts exhibited 50 to 100% mycelia growth inhibition. Extracts from accessions 765-01 and 773-01 showed a 100% inhibition, which were fractionated by thin-layer chromatography on silica gel plates and six fractions were detected under UV light. Fractions IV and V from both extracts with *R<sub>f</sub>* values 0.85 and 0.9 respectively, exhibited 100% *in vitro* inhibition against mycelia growth of *P. cinnamomi*. Fraction IV showed a maximum absorbance of 245 nm under UV light and was analyzed by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrum) in order to identify the active compound. Our results show the presence of a compound (derived from some phytosterol), identified as Stigmastan-3,5-dien (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>), which completely inhibited mycelia growth of *P. cinnamomi* at 100 ppm concentration. The constitutive presence of that active principle from avocado roots offer possibilities for identification and selection of potential resistant plants to *P. cinnamomi*.

**Keywords:** *Persea americana*, *Phytophthora cinnamomi*, antioomycete, inhibition, steroid.

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar compuestos biológicamente activos contra el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands en portainjertos de plantas de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Se seleccionaron 48 accesiones de aguacate del banco de germoplasma de INIFAP ubicado en Michoacán, en base a las condiciones ambientales de los sitios de colecta, de las cuales se obtuvieron extractos de raíz tanto acuosos como orgánicos. Solamente los extractos orgánicos mostraron inhibición *in vitro* del micelio de *P. cinnamomi*. Siete extractos presentaron inhibición del crecimiento del micelio en un rango de 50 a 100%. Los extractos de las accesiones 765-01 y 773-01 exhibieron una inhibición de 100%, los cuales fueron fraccionados por cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice, detectando 6 fracciones bajo luz UV. Las fracciones IV y V de ambos extractos, con valores de *R<sub>f</sub>* de 0.85 y 0.90 respectivamente, mostraron inhibición del 100%. La fracción IV presentó una absorbencia máxima de 245 nm, por lo que fue analizada por la técnica de CG-MS (Cromatografía de gases-Espectrometría de masas) para identificar el compuesto activo. Los resultados demostraron la presencia del compuesto (derivado de un fitosterol), Estigmastan-3,5-dieno (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>), que inhibió completamente el crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* a una concentración de 100 ppm. La presencia constitutiva de este compuesto activo en raíces de aguacate, ofrece posibilidades para la identificación y selección de plantas con potencial resistencia a *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** *Persea americana*, *Phytophthora cinnamomi*, antioomiceto, inhibición, esteroide.

## INTRODUCTION

The oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands. is the causal agent of avocado root rot, the most destructive and important disease of avocado (*Persea americana* Mill.) orchards worldwide (Pegg *et al.*, 2002). *P. cinnamomi* has the ability to cause massive fine feeder roots death under wet or flooded conditions as consequence of its short generation time and high reproductive capacity. The control of this pathogen requires a combination of many practical management procedures designed to reduce pathogen activity and increase host resistance during critical infection periods. Complementary management practices should include prevention, cultural, biological and chemical control and rootstock resistance (Coffey and Guillemet, 1987; Erwin and Ribeiro, 1996). The most effective control of this pathogen is achieved when all these strategies are used in an integrated management system. Some avocado rootstocks express tolerance to root rot by the rapid regeneration of active feeder roots; while in others, the progress of infection in the root is inhibited by other factors (Phillips *et al.*, 1987).

Unfortunately, the moderate resistance expressed by existing rootstocks is not adequate by itself to provide disease control under ideal environmental conditions for root rot. The long term and ultimate solution to *Phytophthora* root rot is to select or breed resistant rootstocks (Coffey, 1992; Menge *et al.*, 1992; Pegg *et al.*, 2002).

Most plants are resistant to diverse pathogens because 1) produce passive barriers that pathogens are not able to overcome, and 2) activate successful defense(s) mechanisms that arrest pathogen development. Active responses of disease require signal recognition/transduction, followed by gene activation; whereas passive defenses involve inhibitory plant surface chemicals, thick cuticle, lignified tissues, and phytoanticipins. Active defenses are characterized by the production of antimicrobial proteins, phytoalexins, hypersensitive response, and systemic acquired resistance (VanEtten *et al.*, 1994; Gwinn *et al.*, 2000). Antimicrobial compounds from plant origin consist of a diverse array of different secondary metabolites classes, including saponins, phenolics, cyclic hydroxamic acids,

cyanogenic glycosides, isoflavonoids, sesquiterpenes, sulfur-containing indole derivatives, etc. (Papadopoulou *et al.*, 1999).

Several natural compounds biologically active have been isolated from avocado tissues. Antifungal and insecticidal activity from secondary metabolites obtained from idioblast cells, exocarp and mesocarp of unripe fruits, have been widely documented (Prusky *et al.*, 1982; Prusky and Keen, 1993; Oberlies *et al.*, 1998; Domergue *et al.*, 2000; Rodríguez-Saona and Trumble, 2000). Compounds isolated from avocado fruit and seeds have demonstrated antibacterial activity (Néeman *et al.*, 1970). Estragole, found in leaf oil in Mexican avocados, has insecticide properties (King and Knight, 1987). Additionally, antiviral activity of compounds from avocado leaves has been also reported (Wigg *et al.*, 1996; de Almeida *et al.*, 1998). To date, compounds biologically active from avocado roots (*P. americana* var. *drymifolia*) have not been evaluated in the last 25 years.

In order to identify compounds in avocado roots with activity against the *P. cinnamomi*, a total of 48 accessions with potential resistance, according to environment and site descriptors, were selected for chemical analysis. In this work we report the isolation, purification and partial characterization of an antioomycete constitutive compound, present in the organic fraction of avocado roots (*P. americana* var. *drymifolia*). This compound has structural similarity to sterols and shows *in vitro* activity against mycelia growth from a virulent strain of *P. cinnamomi*.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Plant material.** 628 accessions from the INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) avocado germplasm bank in Uruapan, Michoacán, México, were screened on a provenance basis, according to their environment and site descriptors (IPGRI, 1995). The descriptors used were soil texture, soil drainage, temperature, rainfall and overall vegetation surrounding. The collected sites showed favorable environment to *P.*



*cinnamomi* development, namely, 1) moist temperate or subtropical climates, 2) disturbed locations by human activities, 3) soils with deficient drainage, and 4) the presence of other known hosts of the oomycete (Zentmyer, 1985). This screening allowed us to select a group of 48 genotypes with potential resistance to the pathogen. The plant material was then subjected to chemical analysis in search for inhibitory metabolites to *P. cinnamomi* growth.

**Phytophthora isolates.** *P. cinnamomi* isolates from infected avocado plants were kindly provided by Faculty of Agrobiology (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México). The *P. cinnamomi* isolates were routinely grown on potato dextrose agar (PDA, BIOXON, México) plates at 25° C ± 1° C.

**Metabolites extraction.** Immediately after sampling, raw extracts from healthy feeder roots segments were obtained from the 48 accessions of avocado plants and stored at -20°C. Frozen tissue (1 g fresh weight) was crushed on a mortar, adding liquid nitrogen until pulverization. The resulting powder was subjected to extraction with 10 ml of methanol-chloroform (2:1), under vigorous and continuous shaking. Then, the extracts were placed in a separatory funnel, adding 10 ml of distilled water, shaking vigorously three times, and then were settled for 15-30 min to allow the separation of aqueous and organic phases. The procedure was repeated three times. Both phases were centrifuged separately (10 min 5000 x g) to remove plant residues, and then evaporated to dryness under vacuum to 45°C. The root extracts were dissolved in 500 µl of absolute ethanol and stored at 4°C for further analysis.

**In vitro assays.** Mycelium fragments of *P. cinnamomi* isolate (0.2 mm<sup>2</sup>) were placed at the center of a plate (4.5 cm diameter), and 50 µl of each extract or fraction was added superficially over the culture medium. The growth of *P. cinnamomi* at 25°C was monitored for 15 days. 50 µl of absolute ethanol were used as a control. The 48 treatments were performed in 5 replicates. The growth of *P. cinnamomi* reaches its maximum at 8 days of culture and was considered as 0 % of inhibition.

**Determination and purification of active compounds.** 100 µl of root extracts from the avocado accessions that showed maximum inhibition (100 %) were subjected to separation by thin layer chromatography (TLC) (Silica gel 60, Sigma®) using methanol-chloroform (2:1). The plaque (covered) was dried at room temperature and then irradiated with ultraviolet light (UV) of short (254 nm) and long wave (352 nm) to observe the bands of the majority compounds. The *R<sub>f</sub>* was calculated for each band. Six different fractions (bands) were obtained and then eluted with extraction solvent (10 ml methanol-chloroform, 2:1). Each fraction was evaporated to dryness under vacuum to 45°C and dissolved in 100 µl of absolute ethanol. The fractions were analyzed by spectrophotometry and then utilized for bioassays.

**Spectrophotometry.** Each sample extract of the 48 avocado accessions was analyzed by spectrophotometry in the visible-ultraviolet spectrum in a Beckman DU 640 spectrophotometer. Maximum absorbance was also determined in purified fractions and their purity was compared with the extracts.

**Gas chromatography-Mass spectrometry.** The GC-MS was achieved in a Hewlett Packard 5973 spectrometer, using a 30 m long capillary column and 0.25 mm of internal diameter. The following program was used: temperature of injector 240°C until the interface of 260°C; an initial temperature of the oven of 50°C during 1 min, increasing 20°C per minute until reaching 200°C, and maintained to this temperature for 8 min 30 s, with an overall time of 30 min. Peaks from compounds with the highest antioomycete activity were identified by retention time (*R<sub>f</sub>*) and fragmentation pattern. The mass spectra were finally compared with Wiley 138.L computer MS libraries.

Because the INIFAP avocado germplasm bank records do not register any background about the possible presence of secondary metabolites related to chemical defense against soil pathogens, no controls were included in this research. The work is a screening rather a comparative study.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this work, according to environment and site descriptors, we selected 48 out of 628 accessions of avocado germplasm with potential resistance to *P. cinnamomi*.

Table 1. Avocado genotypes evaluated for resistance against *Phytophthora cinnamomi*

Accession	Pedigree	Relevant characteristics				Accession	Pedigree	Relevant characteristics			
		SR	CS	SS	CL			SR	CS	SS	CL
037-02	16UPN-14-02	PaM	by	lr	sch	518-03	17CTC-03-03	PaM	by	lr	scsh
056-02	16QDR-13-02	PaM	wh	wi	tsh	524-02	11CMF-21-02	PaM	by	lr	scsh
061-01	16QDR-18-01	PaM	wh	wi	tsh	531-01	12MTL-05-01	MxW	by	lr	scsh
064-02	16BCN-02-02	PaM	mk	lr	tsh	533-01	21ATX-03-01	PaM	by	lr	tsh
066-01	11CLY-01-01	PaM	mk	lr	scsh	582-01	16ZCR-03-01	PaM	by	lr	sch
084-02	16ZTR-02-02	PaM	mk	lr	scsh	643-01	15TNG-08-01	PaM	by	lr	tsh
139-01	16TGB-06-01	PaM	mk	lr	tsh	668-01	07SLU-01-01	Ps	mk	lr	n.a.
203-02	16TGB-11-02	PaM	mk	lr	tsh	700-03	07SCB-04-03	Pt	wh	wi	tsh
209-04	15VAB-04-04	PaM	by	lr	tsh	713-03	27CAR-19-03	Ps	wh	wi	ch
223-03	15MLN-07-03	PaM	by	lr	scsh	744-01	Duke 6	PaM	ro	brm	n.a.
245-01	20ETL-02-01	PaM	by	lr	scss	745-01	Duke 7	PaM	ro	brm	n.a.
277-02	24TZL-19-01	PaM	by	lr	sch	746-01	Thomas	PaM	ro	brm	n.a.
285-02	24TQN-01-01	PaM	by	lr	csch	747-01	Barr Duke	PaM	ro	brm	n.a.
292-03	28MAN-07-03	PaM	by	lr	csch	748-01	G755C	GxPs	ro	brm	n.a.
293-04	28MAN-08-04	PaM	by	lr	csch	749-01	G755B	GxPs	ro	brm	n.a.
310-01	21HUA-07-01	PaM	by	lr	th	750-01	G755A	GxPs	ro	brm	n.a.
316-02	21ZAC-04-02	PaM	by	lr	th	751-01	PT3	PaM	ro	brm	n.a.
320-02	21AHN-02-02	PaM	mk	lr	sch	752-01	PI-116	PaM	ro	brm	n.a.
321-03	21ZPX-01-03	PaM	mk	lr	th	753-01	PR-5	PaM	ro	brm	n.a.
329-04	30JLG-01-04	PaM	by	lr	th	754-01	PR-1	PaM	ro	brm	n.a.
417-01	28CMP-03-02	WxM	by	lr	sch	755-01	P4	PaM	ro	brm	n.a.
482-01	07SCB-01-01	PaM	by	lr	tsh	757-01	P1	PaM	ro	brm	n.a.
493-03	16SFA-12-03	PaM	by	lr	tsh	765-01	PRMX-01	PaM	ro	brm	tsh
517-02	17CTC-02-02	PaM	fl	lr	scsh	773-01	PRMX-02	PaM	ro	brm	tsh

**SR:** Species and races

**PaM:** *P. americana*, Mexican race  
**PaG:** *P. americana*, Guatemalan race  
**PaW:** *P. americana*, West Indian race  
**Ps:** *P. schiedeana*  
**Pt:** *P. tolimanensis*  
**WxM:** West Indian x Mexican (natural hybrid)  
**MxW:** Mexican x West Indian (natural hybrid)  
**GxPs:** Guatemalan x *P. schiedeana*, (natural hybrid)

**CS:** Collecting source

**wh:** Wild habitat  
**fl:** Farm land  
**by:** Backyard  
**mk:** Market  
**ro:** Research organization

**SS:** Status of sample

**wi:** Wild  
**we:** Weedy  
**brm:** Breeding/research material  
**lr:** Landrace  
**ac:** Advanced cultivar

**CL:** Climate

**sch:** Semi-warm, humid  
**tsh:** Temperate, semi-humid  
**scsh:** Semi-warm, semi-humid  
**scss:** Semi-warm, semi-dry  
**csch:** Warm, semi-humid  
**th:** Temperate, humid  
**ch:** Warm, humid  
**n.a.** Not available

Table 1 shows the 48 accessions selected for chemical analysis. The avocado clonal rootstocks Duke 6, Duke 7, Thomas, Barr-Duke, and the Martin Grande set (G755A, G755B and G755C, natural hybrids between *Persea americana* var. *guatemalensis* and *Persea schiedeana*) (Schieber and Zentmyer, 1977), which have moderated resistance to *P. cinnamomi* were included in this group. With exception of the Martin Grande group, the remnant accessions were derived of “criollo” type avocados (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Whit the objective to identify active compounds in roots from Mexican avocado, raw extracts were obtained from roots of the 48 accessions and tested against *P. cinnamomi*. The avocado root extracts that showed the highest antioomycete activity were obtained from organic phase, and are described in Table 2.

Table 2. Inhibitory activity of different organic root extracts of *Persea americana* var. *drymifolia* on mycelia growth of *P. cinnamomi*.

<b>Accession</b>	<b>Inhibition (%)<sup>a</sup></b>
417-01	50
209-04	50
285-02	75
061-01	75
531-01	75
765-01	100
773-01	100

<sup>a</sup> Average of three replicates

Root extracts from 417-01 and 209-04 accessions showed an inhibition of 50% on mycelium growth after 8 days. Extracts from another group showed 75% of inhibition (accessions 285-02, 061-01 and 531-01). Only the 765-01 and 773-01 accessions showed a 100% of inhibition on

mycelium growth (Figure 1). The growth of *P. cinnamomi* reaches its maximum at 8 days of culture according to radial growth in plate diameter (4.5 cm). This criteria was considered as 0% of growth inhibition (Figure 1). The 50% of inhibition was considered when the radial growth of mycelia shows a diameter <2.5 cm. The root extracts with less <50% *P. cinnamomi* growth inhibition were considered without antioomycete activity (data not shown). Total aqueous extracts inhibited the oomycete growth <50% and they were not included to further characterization.

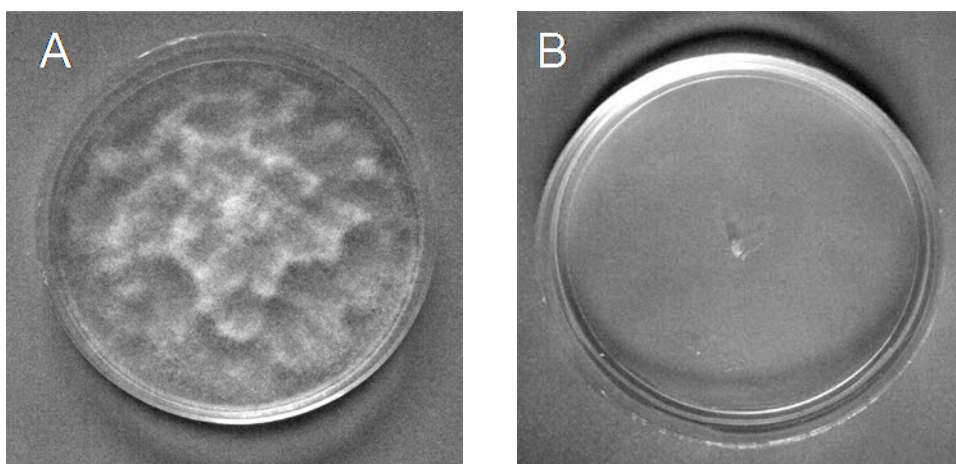


Figure 1. Inhibition of *Phytophthora cinnamomi* mycelia growth after 8 days on culture: A) Control, without extracts (absolute ethanol only). B) Growth inhibition in presence of 765-01 extract. This effect was considered as 100% of inhibition.

In order to purify and identify the active compounds with inhibitory effects from 765-01 and 773-01 avocado accessions, the roots extracts were subjected to TLC chromatography on silica gel plates and detected under UV light, followed by activity-guided fractionation to give an antioomycete active principle. This analysis allowed the identification of six fractions which were recovered and then evaluated by *in vitro* assays (Table 3). The two fractions with *R<sub>f</sub>* values 0.85 and 0.90, exhibited 100 % inhibition on mycelium growth of *P. cinnamomi* at 100 ppm concentration. Fraction V showed two different peaks with maximum absorbance at 234 and 245 nm, and the fraction IV showed just one peak which was detected at 245 nm, indicating us the presence of a bioactive purified compound.

With the purpose to assess the chemical nature of the active compound, fraction IV was subjected to GC-MS analysis. The chemical characteristics of the major metabolite with activity against *P. cinnamomi* from accessions 765-01 and 773-01 were: *R<sub>f</sub>* value, 0.85 by TLC in methanol-chloroform (2:1); soluble in most organic solvents, such as methanol, ethanol, chloroform and ethyl acetate, but was poorly soluble in water; UV-Vis (methanol)  $\lambda_{\text{max}}$ , 245 nm; GC-MS, molecular ion [M (% relative intensity)] at *m/z* 396 (92), base peak at *m/z* 41 (62) and major fragment ions at *m/z* 381 (32) and 355 (10). The metabolite fragmentation patterns detected by GC-MS (retention time of 34.82) representing roughly about 95% of the extract (Figures 2A and 2B), and presents a molecular formula of C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>, (MW=396) which was clearly identified as Stigmastan-3,5-dien in a Library search.

Table 3. Inhibition of mycelia growth by root extracts from 765-01 and 773-01 avocado accessions, separated by thin layer chromatography (TLC).

Fraction	<i>R<sub>f</sub></i> value	Inhibition (%)	
		765-01	773-01
I	0.3	0	0
II	0.6	0	0
III	0.75	100	50
IV	0.85	100	100
V	0.9	100	100
VI	0.95	0	0

During plant-microbe interaction, plants activate defense mechanisms such as constitutive chemical compounds (phytoanticipins) such as phenols, phenolic glycosides, unsaturated lactones, sulphur compounds, saponins, cyanogenic glycosides, glucosinolates, alkylated resorcinols, dienes and others natural compounds (Osborn, 1996). Plants also produce pathogen induced metabolites (phytoalexins), such as phenylpropanoid derivatives, flavonoid-

and isoflavonoid-derivatives, sesquiterpenes, polyketides, and others (Hammerschmidt, 1999). Many of these compounds exhibit inhibitory activity either *in vitro* or *in vivo* assays against oomycetes, and some of them are implicated in plant disease defense.

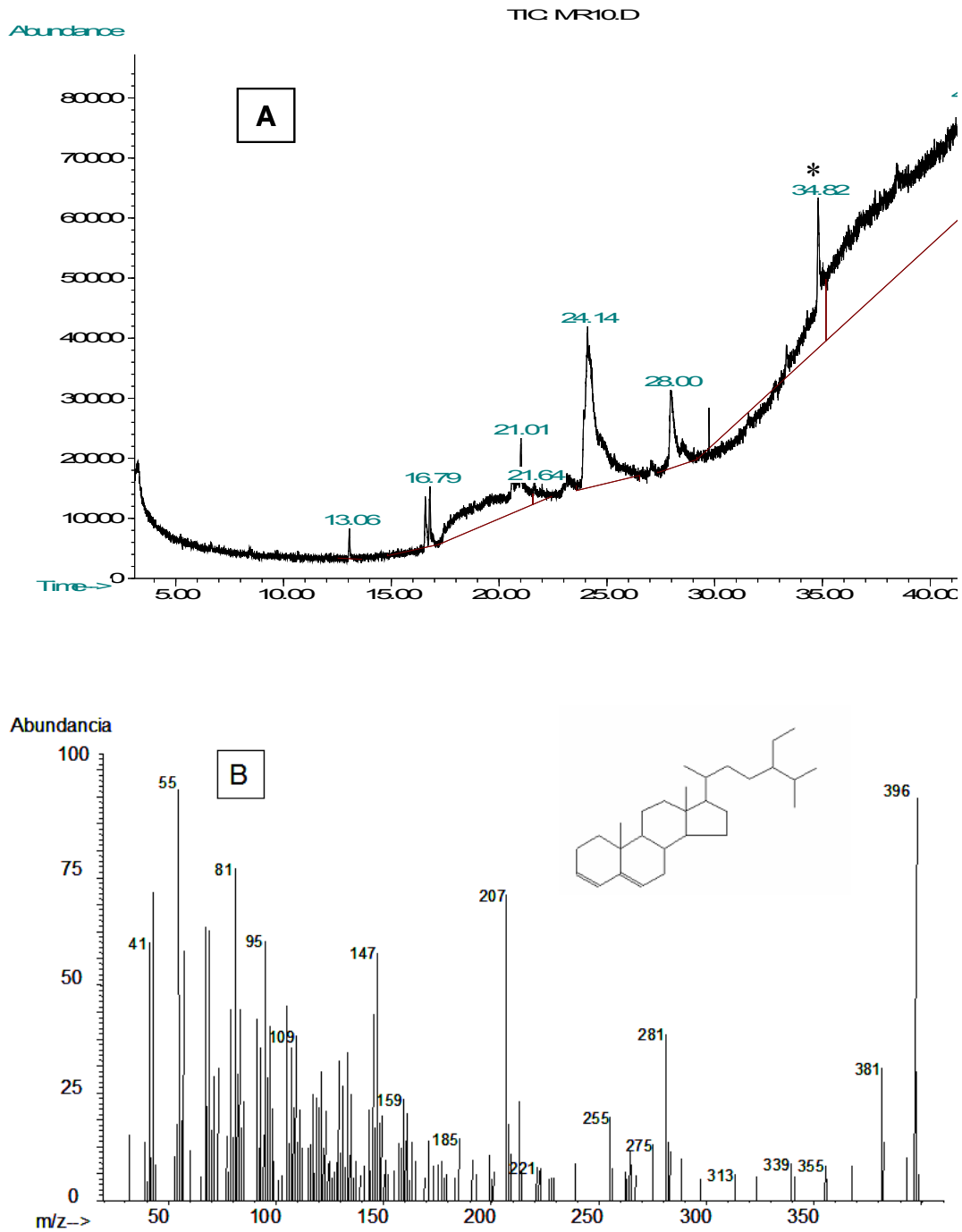


Figure 2. Ion chromatogram **A** and mass spectra **B** for  $m/z$  396 of the major metabolite in both 765-01 and 773-01 avocado accessions. The asterisk on ion chromatogram indicates the peak from which spectrum was taken.

In this work, with the established methods of collecting site and chemical-biological characterization, seven genotypes of avocado were selected which show tolerance or resistance to the oomycete *P. cinnamomi*. Genotypes 765-01 and 773-01 showed the highest antioomycete activity. The inhibitory compounds from these genotypes were isolated from the organic fraction of avocado roots, which were not previously exposed to any pathogen challenge neither biotic or abiotic agent, so soluble compounds are present in healthy plants in their active form (Filippone *et al.*, 1999, 2001).

When the avocado roots were sampled for this study, they suffered mechanical injury. It's widely known that wounding plant tissues elicit defense responses in order to healing the wounds, and prevent attack of opportunistic pathogens (Choi *et al.*, 1994; Cheong *et al.*, 2002; Nishiuchi *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2004). However, in this work, the sampled roots were frozen immediately; in this way, is very improbable that wounded root tissues had have enough time to biosynthesize defense compounds. So, we are confident that extracts of such roots contained preformed compounds only.

According to their biological and chemical features, the metabolites in the organic fraction from avocado roots can be phytoanticipins related to steroids which could be involved in defense of avocado against pathogen attacks such as *P. cinnamomi*.

Zentmyer (1976) communicated the existence of a unique chemical compound from *Persea borbonia* roots, that was toxic to *Phytophthora*. The chemical was isolated and characterized as a long chain hydrocarbon with a lactone ring, and named it *borbonol*. Additional tests were run on the borbonol content of several species of *Persea* and varieties of avocado. A positive correlation was found between borbonol contents and resistance to *Phytophthora cinnamomi* (Zentmyer *et al.*, 1977)



Sitosterol and stigmasterol, the probable intermediates of stigmastan-3,5-dien, have been implicated as chemical defenses against some bacterial and fungal pathogens (Kiprono *et al.*, 2000; Abreu *et al.*, 2002; El-Shazly *et al.*, 2002; Mitova *et al.*, 2003), and as inhibitors of DNA polymerase beta liase (Prakash Chaturvedula *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Additionally, Wang and Maas (1997), reported that strawberry roots resistant to *Phytophthora fragariae*, had higher levels of sitosterol than susceptible roots.

Other compounds with structural similarity to stigmastan-3,5-dien have been reported as antimicrobials (Zhao *et al.*, 2005), or with antiviral activity (Wachsman *et al.*, 2002). There is a patented antibacterial compound which includes stigmastan-3,5-dien and a pharmaceutical carrier. (<http://www.freepatentsonline.com/EP1461055.html>).

## **CONCLUSIONS.**

The avocado accessions 765-01 and 773-01, both of them from the Mexican avocado race, contain at least one preformed compound (phytoanticipin) that completely inhibits the mycelia growth of *P. cinnamomi*, that potentially could provide resistance of avocado rootstocks to such pathogen.

This is the first report about *in vitro* biological activity of stigmastan-3,5-dien as a constitutive compound extracted from avocado roots with inhibitory action against mycelia from the aforementioned oomycete.

## **LITERATURE CITED**

Abreu, P. M.; Rosa, V. S.; Araujo, E. M.; Canda, A. B.; Kayser, O.;K.-U. Bindseil, K.U.;

Siems, K. and Seemann A.. 1998. Phytochemical analysis and antimicrobial evaluation of *Detarium microcarpum* bark extracts. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 3:107-109.

- Castillo, M. C.; Martínez, C.; Buchala, A.; Métraux, J.-P. and León, J. 2004. Gene-specific involvement of  $\beta$ -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135:85-94.
- Cheong, Y. H.; Chang, H.-R.; Gupta, R.; Wang, X.; Zhu, T. and Luan, S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129:669-677.
- Choi, D.; Bostock, R. M.; Avdiushko, S. and Hildebrand, D. F. 1994. Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen- responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proceedings. of the National Academy of Science of USA*, 91:2329-2333.
- Coffey, M. D. and Guillemet, F. B. 1987. Avocado rootstocks. *California Avocado Society Yearbook*, 71:173-179
- Coffey, M. D. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. In: Kumar, J.; Chaube, H. S.; Sigh, U. S. and Mukhopadhyay (eds.) *Plant diseases of international importance, Volume III. Diseases of fruit crops*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 423-444.
- de Almeida, A. P.; Miranda, M. M. F. S.; Simoni, I.C.; Wigg, M.D.; Lagrota, M.H.C. and Costa, S.S. 1998. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (*Lauraceae*) leaf infusion. *Phytotherapy Research* 12:562-567.
- Domergue, F.; Helms, G.L.; Prusky, D. and Browse, J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54:183-189.
- El-Shazly, A.; Dorai, G. and Wink, M.. 2002. Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *Tanacetum santolinoides* (DC.) Feinbr. and Fertig. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c:620-623.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota, U.S.A., 562 pp.

- Filiponne, M. P.; Ricci, J. D.; de Marchese, A. M.; Farias, R. N. and Castagnaro, A. 1999. Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters*, 459:115-118.
- Filiponne, M. P.; Diaz-Ricci, J. C.; Castagnaro, A. P. and Farias, R. N. 2001. Effect of fragarin on the cytoplasmic membrane of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:925-928.
- Gwinn, K.D.; Greene, S.H.; Green, J.F. and Trently, D. 2000. Host defenses. In: Trigiano, R.N.; Windham, M.T. and Windham, A.S. (eds.), *Plant Pathology: Concepts & Laboratory Exercises*. CRC Press Chapter twenty-eight, pp. 257-264.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.
- IPGRI, 1995. Descriptors for avocado (*Persea spp.*). International Plant Genetic Resources Institute., Rome, Italy. 52pp
- King, J. R. and Knight, R.J. 1987. Occurrence and assay of estragole in the leaves of various avocado cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 35:842-844.
- Kiprono, P. C.; Kaberia, F.; Keriko, J. M. and Karanja, J. 2000. The *in vitro* antifungal and antibacterial activities of  $\beta$ -sitosterol from *Senecio lyratus* (*Asteraceae*). *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c:485-488.
- Li, S. S.; Gao, Z.; Feng, X.; Jones, S. H. and Hecht, S. M. 2004. Plant sterols as selective DNA polymerase beta lyase inhibitors and potentiators of bleomycin cytotoxicity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12:4253-4258.
- Menge, J.A.; Guillemet, F.B.; Campbell, S.; Johnson, E. and Pond, E. 1992. The performance of rootstocks tolerant to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* under field conditions in Southern California. *Proceedings of the Second World Avocado Congress*. pp 53-59.
- Mitova, M.; Taskova, R.; Popov, S.; Berger, R. G.; Krings, U. and Handjieva N. 2003. GC/MS analysis of some bioactive constituents from *Carthamus lanatus* L. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58c:697-703.

- Néeman, I.; Lifshitz, A. and Kashman, Y. 1970. New antibacterial agent isolated from the avocado pear. *Journal of Applied Microbiology*, 19:470-473.
- Nishiuchi, T.; Shinshi, H. and Suzuki, K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 279:55355-55361.
- Oberlies, N.H.; Rogers, L.L.; Martin, J.M. and McLaughlin, J.L. 1998. Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. *Journal of Natural Products*, 61:781-785
- Osbourn, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8:1821-1831.
- Papadopoulou, K.; Melton, R. E.; Leggett, M.; Daniels, M. J. and Osbourn, A. E. 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 96:12923-12928.
- Pegg, K. G.; Coates L. M.; Korsten, L. and Harding, R. M. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: Whiley, A.W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. (eds.), *Avocado: Botany, production and uses*. CABI Publishing, pp. 299-338.
- Phillips, D.; Grant, B. R. and Weste, G. 1987. Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 77:691-698.
- Prakash Chaturvedula, V. S.; Gao, Z.; Hecht, S. M.; Jones, S. H. and Kingston D. G. 2003. A new acylated triterpenoid from *Couepia polyandra* that inhibits the lyase activity of DNA polymerase beta. *Journal of Natural Products*, 66:1463-1465.
- Prusky, D. and Keen, N. T. 1993. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease*, 77:114-119.
- Prusky, D.; Keen, N.T.; Sims, J.J. and Midland, S.L. 1982. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. *Phytopathology*, 72:1578-1582.

- Rodríguez-Saona, C. and Trumble, J.T. 2000. Secretory avocado idioblast oil cells: evidence of their defensive role against a non-adapted insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94:183-194.
- Schieber, E. and Zentmyer, G. A. 1977. Collecting *Persea schiedeana* in Guatemala. *California Avocado Society Yearbook*, 61:91-94
- VanEtten, H. D.; Mansfield, J. W.; Bailey, J. A. and Farmer, E. E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. *The Plant Cell*, 6:1191–1192.
- Wachsman, M. B.; Ramirez, J. A.; Galagovsky, L. R. and Coto, C. E. 2002. Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 13:61-66.
- Wang, S. Y. and Maas, J. L. 1997. Relation of membrane lipid content in strawberry roots to red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance. *Acta Horticulturae (ISHS)* 439:863-868.
- Wigg, M.D.; Al-Jabri, A.A.; Costa, S.S.; Race, E.; Bodo, B. and Oxford, J.S. 1996. In vitro virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 7:179-183.
- Zentmyer, G.A. 1976. Soil-borne pathogens of avocado. In: Sauls, J.W.; Phyllips, R.L. and Jackson, L.K. (eds.). *Proceedings of the First International Tropical Fruit Short Course*, Gainesville Fla., pp 75-82.
- Zentmyer, G.A. 1985. Origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *California Avocado Society Yearbook*, 69:89-94
- Zentmyer, G.A.; Guillemet, F.B.; Harjung, M.K. and Zaki, A.I. 1977. Resistance to *Phytophthora* root rot. *California Avocado Society Yearbook*, 61:76-80.
- Zhao, C. C.; Shao, J. H.; Li, X.; Xu, J. and Zhang, P. 2005. Antimicrobial constituents from fruits of *Ailanthus altissima* SWINGLE. *Archives of Pharmacal Research*, 28:1147-1151.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This research was financially supported from 2003 to 2005 by the research fund of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC/2.10 SGR).

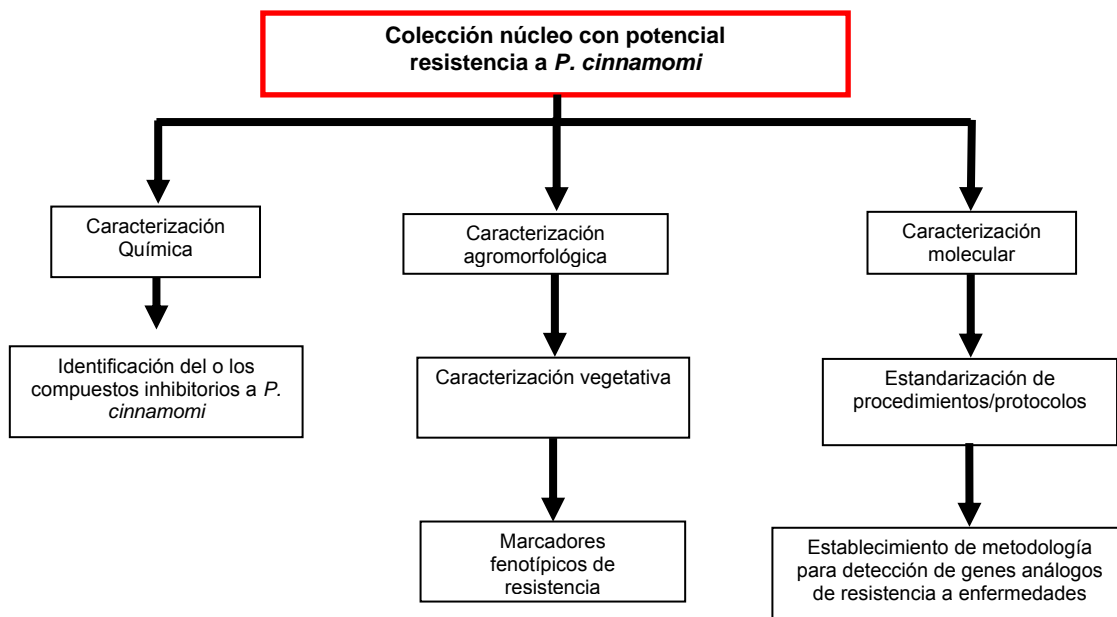
## **VI. RESULTADOS ADICIONALES**

### **IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA DEL AGUACATE RAZA MEXICANA (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) AL OOMICETO *Phytophthora cinnamomi* Rands.**

#### **6.1. INTRODUCCIÓN**

En este apartado se presentan resultados adicionales que no se mencionaron en el capítulo anterior, y que son relevantes para el análisis completo de esta investigación.

## 6.2. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



### 6.2.1. Caracterizaciones de sitios de colecta y agromorfológica

Para detectar materiales de aguacate que a través del tiempo pudieran haber sido sometidos a presión de selección por parte del patógeno *P. cinnamomi*, se caracterizaron los sitios de colecta en función de las variables clima y suelo, así como la fuente de recolección, utilizando descriptores de IPGRI (1995).

En el inicio se utilizaron descriptores de pasaporte, que consisten en proporcionar la información básica que se utiliza para el manejo general de la accesión y describe los parámetros que se deben observar cuando se recolecta originalmente la accesión, incluyendo el registro en el banco de germoplasma y cualquier otra información de identificación. Enseguida se hizo uso de los descriptores del sitio y el medio ambiente, que describen los parámetros específicos del sitio de colecta y su medio ambiente. Esa información también ayuda en la interpretación de resultados cuando se realizan pruebas de caracterización y evaluación. Esos descriptores incluyen entre otros, ubicación geográfica (coordenadas), climas, suelos, vegetación circundante, etc. Para caracterizar adecuadamente la información de clima y suelo, en este trabajo se



utilizaron tanto la cartografía como los medios electrónicos del INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática), apoyado con la clasificación climática propuesta por García (1988).

Posteriormente, se usaron descriptores de caracterización (IPGRI, 1995; UPOV, 1997), que permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos. Generalmente se trata con caracteres altamente heredables, que pueden ser detectados fácilmente a simple vista, y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además se incluye un número limitado de caracteres adicionales que son deseables según el consenso de los usuarios de un cultivo en particular (en este caso aguacate). Para ello se utilizan los tipos de descriptores botánico-taxonómicos y los agromorfológicos (también conocidos como morfoagronómicos).

Al efectuarse la colecta de materiales de aguacate y especies afines, o recibirse donaciones de los mismos, se estableció el proceso de caracterización con la descripción de las colectas y de los sitios donde se colectaron (Cuadros A1 y A2 del Anexo A).

### **6.2.2. Estandarización de un método para la detección de genes análogos de resistencia a enfermedades en aguacate criollo**

Como primer paso se necesitó estandarizar el protocolo de extracción de ADN de aguacate, ya que la experiencia mostró que los protocolos existentes rendían resultados inconsistentes. Para las evaluaciones se utilizaron oligonucleótidos diseñados en base a las secuencias de genes *R* ya clonados, tomando los reportes de otros investigadores (Cuadro 1) (Leister *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Ramalingam *et al.*, 2003). Posteriormente se procedió a estandarizar el protocolo de PCR para la amplificación de los fragmentos de ADN correspondientes a posibles genes *R* y al final se realizó el análisis de electroforésis en gel de agarosa para detectar los productos amplificados.

**Extracción de ADN.** De hojas de aguacate jóvenes (coloración rojiza a alimonada) se extrajo ADN con el método CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil

Amonio, Sigma) con modificaciones (Wilkie, 1990). Se pesaron 0.5 g de tejido por muestra, y se molieron en un mortero adicionando Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Enseguida se colocó 0.1 g del material pulverizado en un tubo Eppendorf adicionando 1 ml de buffer CTAB 2X (100 mM Tris, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 40 mM 2-β-mercaptoetanol, 2% CTAB, pH 8); se dejaron reposar las muestras a temperatura ambiente por 10 min. Después de lo cual se mezcló la muestra y se incubó en baño María a una temperatura de 60° C durante 20 min agitando intermitentemente. Finalizada la incubación se adicionaron 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) agitando por 5 min hasta homogeneizar la mezcla. Enseguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se colectó la fase acuosa en un tubo Eppendorf y se le agregaron dos terceras partes del volumen final de isopropanol frío, mezclando perfectamente y dejando reposar por 30 min a una temperatura de -20° C. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ADN. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 200 µl de agua desionizada estéril (dde) y se hizo una limpieza con bromuro de etidio como se describe a continuación.

A los 200 µl finales del paso anterior se le adicionaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y 140 µl de acetato de amonio 7.5 M. Se mezcló perfectamente y se adicionaron 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezclaron suavemente y enseguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 min y se colectó la fase acuosa en un nuevo tubo (aproximadamente 350 µl). Posteriormente se adicionaron 2 volúmenes de etanol frío (aproximadamente 700 µl), mezclando suavemente y se incubó durante 5 min en hielo, para enseguida centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y luego descartar el sobrenadante. La pastilla de ADN fue lavada con 500 µl de etanol 70% durante 2 min eliminando después el etanol y dejando secar la pastilla. El ADN se resuspendió en 100 µl de agua. La concentración fue determinada por comparación con estándares de concentración en electroforesis sobre gel de agarosa.

**Amplificación del ADN por medio de PCR.** Los iniciadores utilizados están diseñados en base a secuencias conservadas de genes de resistencia de la

clase NBS-LRR y Kinasa (Leister *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Ramalingam *et al.*, 2003) y se muestran en el Cuadro 1. Es importante mencionar que para estandarizar los protocolos de la amplificación de ADN genómico, se llevó a cabo en principio con las especies vegetales que fueron la base para el diseño de los iniciadores (*Arabidopsis*, tabaco, tomate y arroz) y posteriormente con aguacate. La estandarización del método se realizó inicialmente con los reactivos y cantidades para la técnica de PCR registrados en el Cuadro 2. El programa inicial en el termociclador se especifica en el Cuadro 3.

Cuadro 1. Descripción de los iniciadores (oligonucleótidos) utilizados para amplificar genes de resistencia de varias especies de plantas.

Iniciadores	Dominio (gene)	Planta	Secuencias
AS1	NBS ( <i>N</i> , <i>RPS2</i> )	Tabaco y <i>A. thaliana</i>	5'-CAA CGC TAG TGG CAA TCC-3'
AS3	NBS ( <i>N</i> , <i>RPS2</i> )	<i>A. thaliana</i>	5'-IAG IGC AGI GGI AGI CC-3'
NLRR-for	LRR ( <i>N</i> )	Tabaco	5'-TAG GGC CTC TTG CAT CGT-3'
NLRR-rev	LRR ( <i>N</i> )	Tabaco	5'-TAT AAA AAG TGC CGG ACT-3'
NLRR-INV1	LRR ( <i>N</i> )	Tabaco	5'-TGC TAC GTT CTC CGG G-3'
NLRR-INV2	LRR ( <i>N</i> )	Tabaco	5'-TCA GGC CGT GAA AAA TAT-3'
Pto Kin-1	Cinasa ( <i>Pto</i> )	Tomate	5'-GCA TTG GAA CAA GGT GAA-3'
Pto Kin-2	Cinasa ( <i>Pto</i> )	Tomate	5'-AGG GGG ACC ACC ACG TAG-3'
S1	NBS ( <i>RPS2</i> )	<i>A. thaliana</i>	5'-GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG-3'
S2	NBS ( <i>RPS2</i> )	<i>A. thaliana</i>	5'-CAI CAI AAI GGI TGI GGI GG-3'
XLRR-for	LRR ( <i>Xa21</i> )	Arroz	5'-CCG TTG GAC AGG AAG GAG-3'
XLRR-rev	LRR ( <i>Xa21</i> )	Arroz	5'-CCC ATA GAC CGG ACT GTT-3'
XLRR-INV1	LRR ( <i>Xa21</i> )	Arroz	5'-TTG TCA GGC CAG ATA CCC-3'
XLRR-INV2	LRR ( <i>Xa21</i> )	Arroz	5'-GAG GAA GGA CAG GTT GCC-3'

Cuadro 2. Reactivos y cantidades utilizados en la técnica de PCR para la amplificación de ADN de aguacate.

ADN	5 $\mu$ l (100-300 ng)
Oligo 3'	1 $\mu$ l (10 pmol)
Oligo 5'	1 $\mu$ l (10 pmol)
Buffer 10X	2 $\mu$ l
Cloruro de Magnesio	0.65 $\mu$ l (1.5 mM)
dNTPs 2 mM	2 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa	1 unidad
Agua dde	2.35 $\mu$ l
SUMA: 20.00 $\mu$ l	

Cuadro 3. Especificaciones del programa inicial del termociclador para el estudio de PCR.

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo	
30	94	1 min	desnaturalización
	50	30 s	alineación
	72	90 s	extensión

El programa se fue adecuando y modificando hasta obtener la amplificación del ADN que pudo ser observada en gel de agarosa, probando las siguientes variantes durante el proceso de estandarización:

1. Cantidad de ADN de aguacate: 150, 200, 250 y 300 ng de aguacate.
2. MgCl<sub>2</sub>: de 1 a 3 mM.
3. Ciclos de PCR: 30 y 35.
4. Temperaturas de la fase de alineamiento: 45, 47, 50, 52 y 55° C.

### 6.3. RESULTADOS

El proceso de selección en el banco de germoplasma de aguacate, basado en la caracterización del sitio de colecta y datos de pasaporte de las accesiones,

permitió preseleccionar 48 de las 628 accesiones examinadas, las cuales potencialmente son candidatos a poseer resistencia hacia *P. cinnamomi*. En el Cuadro 4 se muestran las 48 accesiones seleccionadas con potencial de resistencia al oomiceto. Con excepción del grupo Martín Grande (accesiones G755A, G755B y G755C) todas las demás son derivadas de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). De estas accesiones, 20 son planta de vivero, 22 están plantadas en una colección de campo (huerto banco de germoplasma) en terrenos del área protegida Parque Nacional Lic. Eduardo Ruíz del Municipio de Uruapan, Mich., y el resto, 6 accesiones, están en otra colección de campo ubicada en el Campo Experimental Valle de Apatzingán del INIFAP, en el Municipio de Parácuaro, Mich.

### **6.3.1. Caracterización agromorfológica**

Como resultado de la caracterización agromorfológica se obtuvo la clasificación taxonómica de las colectas. Se encontraron colectas de aguacate con sus tres variedades hortícolas (variedades botánicas, razas o subespecies), así como híbridos naturales entre ellas, además de las especies afines *Persea schiedeana* y *P. tolimanensis* (Cuadro 5). Para esa clasificación se utilizaron principalmente los descriptores de fruto y semilla y de manera adicional, descriptores de la caracterización vegetativa (hojas maduras y brotes, y hojas jóvenes). En el Anexo A (Cuadros A4 y A5) se presentan los resultados de la caracterización de la fase vegetativa de los materiales en estudio. Estos resultados permitieron los análisis correspondientes para efectuar una búsqueda de marcadores fenotípicos vegetativos que pudieran estar asociados con la capacidad de inhibición de *P. cinnamomi*.

Cuadro 4. Materiales de aguacate seleccionados (colección núcleo) por medio de la caracterización de sitios de colecta.

		Características relevantes						Características relevantes			
Accesión	Pedigrí	ER	FR	EM	CL	Accesión	Pedigrí	ER	FR	EM	CL
037-02	16UPN-14-02	PaM	By	lr	sch	518-03	17CTC-03-03	PaM	by	lr	scsh
056-02	16QDR-13-02	PaM	Wh	wi	tsh	524-02	11CMF-21-02	PaM	by	lr	scsh
061-01	16QDR-18-01	PaM	Wh	wi	tsh	531-01	12MTL-05-01	MxW	by	lr	scsh
064-02	16BCN-02-02	PaM	Mk	lr	tsh	533-01	21ATX-03-01	PaM	by	lr	tsh
066-01	11CLY-01-01	PaM	Mk	lr	scsh	582-01	16ZCR-03-01	PaM	by	lr	sch
084-02	16ZTR-02-02	PaM	mk	lr	scsh	643-01	15TNG-08-01	PaM	by	lr	tsh
139-01	16TGB-06-01	PaM	mk	lr	tsh	668-01	07SLU-01-01	Ps	mk	lr	n.a.
203-02	16TGB-11-02	PaM	mk	lr	tsh	700-03	07SCB-04-03	Pt	wh	wi	tsh
209-04	15VAB-04-04	PaM	by	lr	tsh	713-03	27CAR-19-03	Ps	wh	wi	ch
223-03	15MLN-07-03	PaM	by	lr	scsh	744-01	Duke 6	PaM	ro	brm	n.a.
245-01	20ETL-02-01	PaM	by	lr	scss	745-01	Duke 7	PaM	ro	brm	n.a.
277-02	24TZL-19-01	PaM	by	lr	sch	746-01	Thomas	PaM	ro	brm	n.a.
285-02	24TQN-01-01	PaM	by	lr	csch	747-01	Barr Duke	PaM	ro	brm	n.a.
292-03	28MAN-07-03	PaM	by	lr	csch	748-01	G755C	GxPs	ro	brm	n.a.
293-04	28MAN-08-04	PaM	by	lr	csch	749-01	G755B	GxPs	ro	brm	n.a.
310-01	21HUA-07-01	PaM	by	lr	th	750-01	G755A	GxPs	ro	brm	n.a.
316-02	21ZAC-04-02	PaM	by	lr	th	751-01	PT3	PaM	ro	brm	n.a.
320-02	21AHN-02-02	PaM	mk	lr	sch	752-01	PI-116	PaM	ro	brm	n.a.
321-03	21ZPX-01-03	PaM	mk	lr	th	753-01	PR-5	PaM	ro	brm	n.a.
329-04	30JLG-01-04	PaM	by	lr	th	754-01	PR-1	PaM	ro	brm	n.a.
417-01	28CMP-03-02	WxM	by	lr	sch	755-01	P4	PaM	ro	brm	n.a.
482-01	07SCB-01-01	PaM	by	lr	tsh	757-01	P1	PaM	ro	brm	n.a.
493-03	16SFA-12-03	PaM	by	lr	tsh	765-01	PRMX-01	PaM	ro	brm	tsh
517-02	17CTC-02-02	PaM	fl	lr	scsh	773-01	PRMX-02	PaM	ro	brm	tsh

**Claves de: Características relevantes**

**ER:** Especies y razas

**PaM:** *P. americana*, Raza Mexicana  
**PaG:** *P. americana*, Raza Guatemalteca  
**PaW:** *P. americana*, Raza Antillana  
**Ps:** *P. schiedeana*  
**Pt:** *P. tolimanensis*  
**WxM:** Antillana x Mexicana (híbrido natural)  
**MxW:** Mexicana x Antillana (híbrido natural)  
**GxPs:** Guatemalteca x *P. schiedeana*, (híbrido natural)

**FR:** Fuente de recolección

**wh:** Hábitat silvestre  
**fl:** Terreno del agricultor  
**by:** Huerto de traspatio  
**mk:** Mercado  
**ro:** Instituto de investigación

**EM:** Estado de la muestra

**wi:** Silvestre  
**we:** Maleza  
**brm:** Material de mejoramiento/investigación  
**lr:** Cultivar nativo (criollo)  
**ac:** Cultivar avanzado

**CL:** Clima

**sch:** Semicálido, húmedo  
**tsh:** Templado, semihúmedo  
**scsh:** Semicálido, semihúmedo  
**scss:** Semicálido, semiseco  
**csch:** Cálido, semihúmedo  
**th:** Templado, húmedo  
**ch:** Cálido, húmedo  
**n.a.:** No disponible

Cuadro 5. Clasificación taxonómica de las 628 accesiones de aguacate colectadas entre 1996 y 2002.

<b>Especies y mezclas</b>	<b>Número</b>
<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	288
<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> con <i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	7
<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> con <i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	6
<i>Persea americana</i> var. <i>Guatemalensis</i>	90
<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i> con <i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	34
<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i> con <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	9
<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i> con <i>Persea schiedeana</i>	3
<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	90
<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i> con <i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	35
<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i> con <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	8
<i>Persea schiedeana</i>	47
<i>Persea tolimanensis</i>	6
No clasificadas	5
<b>Total</b>	<b>628</b>

### **6.3.2. Búsqueda de marcadores fenotípicos relacionados a resistencia (inhibición de *P. cinnamomi*)**

En ocasiones existen características fenotípicas que están ligadas con resistencia a enfermedades. Un ejemplo es la necrosis del ápice de la hoja en trigo, que se liga con una resistencia moderada a la enfermedad conocida como mancha moteada, causada por el hongo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem, sin. *Helminthosporium sativum*. Este marcador fenotípico se está usando para facilitar la selección de plantas resistentes (Joshi *et al.*, 2004). Otro ejemplo, es el de la característica morfológica de hoja erecta en trigo, que está estrechamente asociada con la resistencia a la misma enfermedad de la mancha moteada (Joshi y Chand, 2002).

En nuestro estudio, con el objeto de determinar si alguna de las características morfológicas vegetativas pudiera utilizarse como marcador morfológico de resistencia (inhibición del crecimiento) a *P. cinnamomi*, se efectuó un análisis exploratorio tomando como base la caracterización vegetativa de las

accesiones 765-01 y 773-01 (cuyos extractos de raíces causaron una inhibición del 100%), comparándolas con el resto de las accesiones. Para ello se llevó a cabo un análisis de conglomerados con el software NCSS97 (Hintze, 2001).

En primer lugar se clasificaron los tipos de variables de la caracterización vegetativa de los materiales en estudio (Cuadro A3 del Anexo A). Se realizaron los análisis previos para encontrar el mejor método de agrupamiento y que presentara la mayor correlación cofenética, y se encontró que el mejor método de agrupamiento fue el de UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Average), que rindió la más alta correlación cofenética (0.894971). Los resultados del agrupamiento jerárquico se muestran en el Cuadro 6 y Figura 2. Se aprecia que se conformaron tres grupos o clusters. Las accesiones de mayor inhibición del oomiceto, 765-01 y 773-01, se agrupan en el cluster 3 junto con otras 15 accesiones que son muy parecidas morfológicamente, pero cuya inhibición varió de 0% a 75%.

### **6.3.3. Resultados adicionales de la caracterización química**

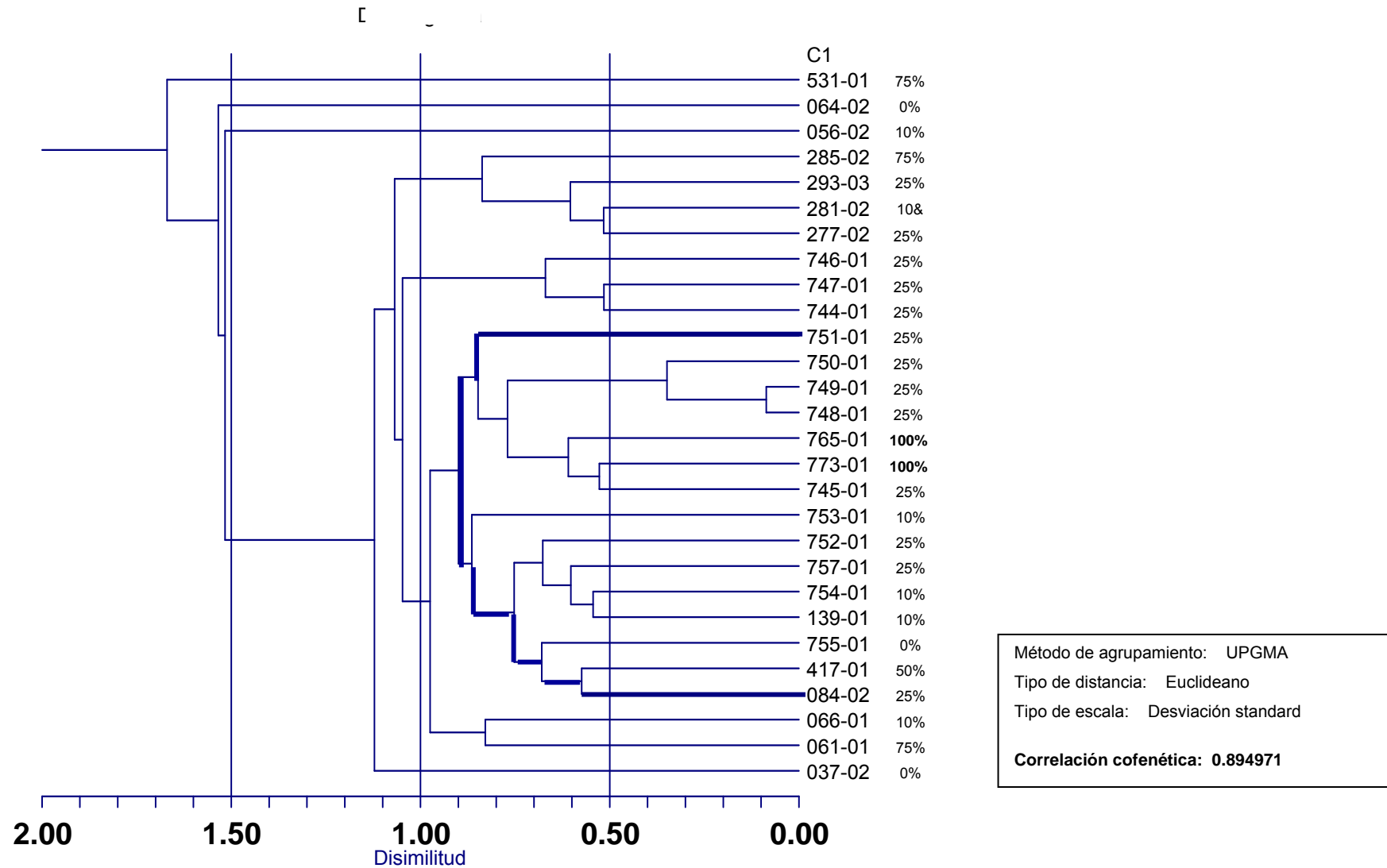
La inhibición del crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* mostró resultados diferentes, según si los extractos provenían de la fase acuosa o de la fase clorofórmica, y si las raíces habían sido congeladas inmediatamente después de la colecta o 5 h después. Los extractos de la fase acuosa prácticamente no presentaron inhibición sobre el crecimiento del oomiceto, pues de los 48 extractos de ambas fases, solamente uno (accesión 064-02) mostró una inhibición significativa del 75% en su fase acuosa, y los 47 restantes entre 0 y 25% en ambas fases (datos no mostrados). En cambio, de la fase clorofórmica, dos extractos inhibieron al 100%, tres lo hicieron al 75% y dos al 50%. Los 41 restantes presentaron inhibición entre 0 y 25% (Cuadro 7).



Cuadro 6. Análisis de conglomerados en base a la caracterización vegetativa y su relación con los porcentajes de inhibición a *P. cinnamomi*. Se destaca el grupo 3 en el cual se incluyen los dos extractos que mostraron inhibición del 100%, pero que se agrupan con otros 15 extractos con inhibición que va de 0 a 75%.

Grupo (Cluster)	No. de Accesoión	% de inhibición
1	744-01	25
1	746-01	25
1	747-01	25
2	277-02	25
2	281-02	10
2	285-02	75
2	293-03	25
3	061-01	75
3	066-01	10
3	084-02	25
3	139-01	10
3	417-01	50
3	745-01	25
3	748-01	25
3	749-01	25
3	750-01	25
3	751-01	25
3	752-01	25
3	753-01	10
3	754-01	10
3	755-01	0
3	757-01	25
3	<b>765-01</b>	<b>100</b>
3	<b>773-01</b>	<b>100</b>
	037-02	0
	056-02	10
	064-02	0
	531-01	75

Figura 2. Dendrograma del análisis de conglomerados de la caracterización vegetativa (Brotes y hojas jóvenes, y hojas maduras) y su relación con el porcentaje de inhibición de *P. cinnamomi*.



Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *P. cinnamomi* por los extractos de raíces de aguacate de la fase clorofórmica.

Accesión	Congelación inmediata	Congelación 5 h después	Accesión	Congelación inmediata	Congelación 5 h después
037-02	0	0	518-03	0	0
056-02	10	0	524-02	0	0
061-01	75	0	531-01	0	75
064-02	0	0 <sup>(1)</sup>	533-01	25	0
066-01	10	0	582-01	10	0
084-02	25	0	643-01	0	0
139-01	10	0	668-01	10	0
203-02	0	0	700-03	10	0
209-04	0	50	713-03	10	0
223-03	0	0	744-01	25	0
245-01	25	0	745-01	25	0
277-02	25	0	746-01	25	0
281-01	10	0	747-01	25	0
285-02	0	75	748-01	25	0
293-04	25	0	749-01	25	0
310-01	0	0	750-01	25	0
316-02	0	0	751-01	25	0
320-02	0	0	752-01	25	0
321-03	25	0	753-01	10	0
329-04	10	0	754-01	10	0
417-01	50	0	755-01	0	0
482-01	10	0	757-01	25	0
493-03	10	0	765-01	100	0
517-02	10	0	773-01	100	0

<sup>(1)</sup> Este extracto presentó una inhibición de 75% en la fase acuosa

### 6.3.3.1. Análisis estadístico de los resultados de inhibición

Para tener la seguridad de que el grado de inhibición del oomiceto por parte de los extractos de raíces de aguacate no fueron debidos al azar y verificar que los valores consignados (% de inhibición), ayudan a discriminar entre genotipos de aguacate con capacidad de inhibición y sin ella, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y la correspondiente separación de medias de tratamientos (accesiones).

Previamente, los valores de inhibición expresados en porcentaje fueron transformados a grados por medio de la transformación arco seno para cumplir con el requerimiento de que las muestras tienen una distribución aproximada a la normal (Bliss, 1937; Little y Hills, 1985). Con los valores transformados se

realizó el análisis de varianza y los resultados se presentan en el Cuadro 8. La hipótesis nula ( $H_0$ ) es que no existe diferencia entre medias de tratamientos.

Cuadro 8. Análisis de varianza de los valores de inhibición a *P. cinnamomi* por los extractos de raíces de aguacate.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F observado	F requerido	
					5%	1%
Total	143	61581.683				
Tratamientos	47	61492.489	1308.35	689.42	1.69	2.09**
Error	96	89.194	0.93			

\*\* Se rechaza  $H_0$

La separación de medias de tratamientos que se efectuó con la prueba de rango múltiple de Duncan (Harter, 1960) se presenta en el Cuadro 9, y se puede ver que la separación es muy marcada con los diferentes porcentajes de inhibición. Se aprecia claramente que los tratamientos (accesiones), se separan formando seis grupos de significancia. En el primer grupo (a) solo están las accesiones que inhibieron al 100%; en el segundo grupo (b) están las accesiones que inhibieron al 75%; en el tercero (c), las que inhibieron al 50%; en el cuarto (d), las que inhibieron al 25%; en el quinto (e), las que presentaron inhibición del 10%; y finalmente en el sexto grupo (f) las que no presentaron inhibición.

#### 6.3.4. Resultados adicionales de la identificación del metabolito activo

Tanto el extracto crudo como las fracciones con mayor acción inhibitoria contra *P. cinnamomi*, fueron analizados primeramente con espectrofotometría, realizando un barrido entre 200 y 800 nm, con el fin de comparar la presencia de grupos de compuestos entre el extracto y la fracción más activa; asimismo, se obtuvieron también espectros de extractos y fracciones no activas, para determinar las crestas indicativas del o los compuestos activos, por comparación cualitativa.

Cuadro 9. Separación de medias de tratamientos. Prueba de Rango Múltiple de Duncan\*.

<u>Accesión</u>		<u>Accesión</u>	
765-01	a	329-04	e
773-01	a	482-01	e
061-01	b	493-03	e
285-02	b	668-01	e
531-01	b	700-03	e
209-04	c	713-03	e
417-01	c	753-01	e
751-01	d	754-01	e
084-02	d	139-01	e
293-04	d	281-01	e
321-03	d	066-01	e
745-01	d	517-02	e
746-01	d	582-01	e
747-01	d	037-02	f
748-01	d	064-02	f
749-01	d	203-02	f
750-01	d	223-03	f
752-01	d	310-01	f
277-02	d	316-02	f
533-01	d	320-02	f
744-01	d	518-03	f
757-01	d	524-02	f
245-01	d	643-01	f
056-02	e	755-01	f

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí; medias con letras diferentes pertenecen a grupos diferentes de significancia

\*Significancia al 0.01

Posteriormente se realizó el análisis por CG-MS, para identificar los metabolitos presentes en el extracto activo de raíz de aguacate criollo y en la fracción activa.

#### 6.3.4.1. Espectrofotometría

Cada uno de los extractos que mostraron inhibición sobre el crecimiento de *P. cinnamomi* fueron sometidos a un análisis por espectrofotometría, encontrando diferencias claras entre ellos en cuanto al número de crestas observadas; sin embargo, se observó la presencia de una de ellas en todos los extractos, en un rango de absorbencia entre 230 y 246 nm (Figura 3A). Este patrón del espectro

no fue observado en muestras de extractos que no inhibieron a *P. cinnamomi* y en el obtenido de 064-02 (Figura 3B).

Con los espectros obtenidos de cada una de las fracciones se observó la calidad del fraccionamiento en comparación a los extractos, con crestas o picos máximos de absorbencia diferentes para cada una de ellos, desde 230 hasta 246 nm. La fracción 5, una de las más activas contra el oomiceto, presentó dos picos máximos a los 230 y 245 nm (Figura 3C); la fracción 4 solo un pico a los 245 nm (Figura 3D).

#### **6.3.4.2. Análisis por CG-MS**

Solamente el extracto crudo activo (accesión 765-01) y la fracción 4, la de mayor pureza y que presentó 100% de inhibición contra *P. cinnamomi*, fueron sometidos al análisis por cromatografía de gases (Figura 4A) y espectrometría de masas (Figura 4B), para identificar los metabolitos presentes en el extracto y el compuesto activo. Con este estudio pudieron identificarse los compuestos mayoritarios del extracto clorofórmico de raíces de aguacate criollo accesión 765-01, principalmente el ácido oleico y varios de sus derivados, así como el estigmastadieno (Cuadro 10).



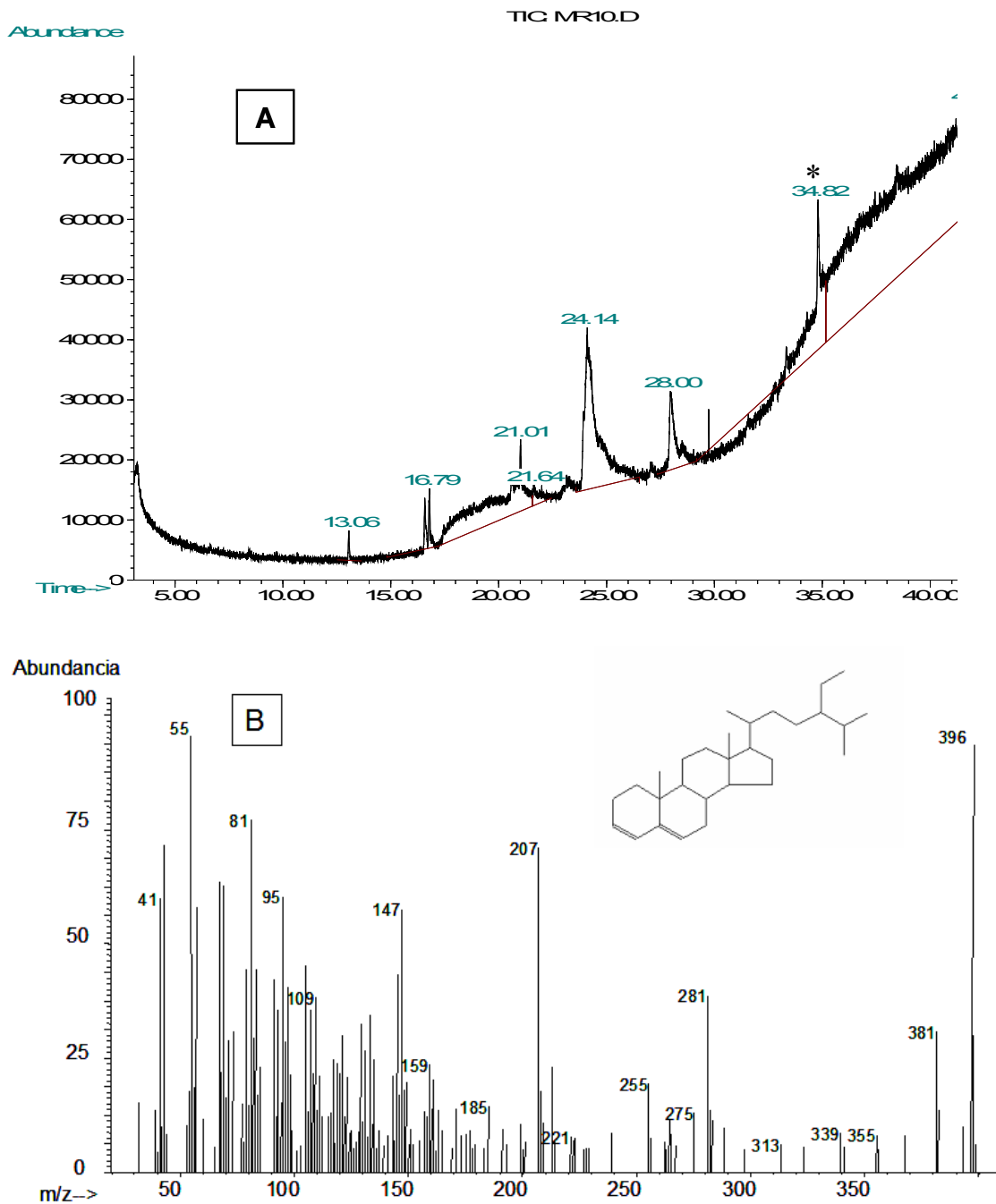


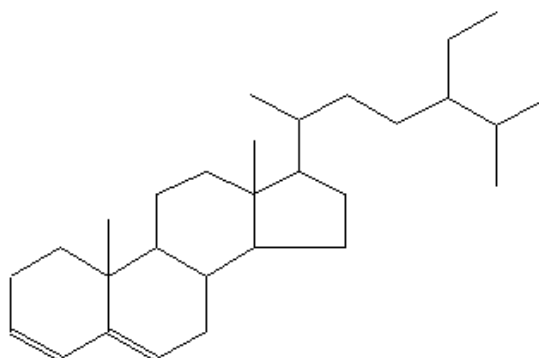
Figura 4. Cromatograma de los extractos de raíces de aguacate criollo (accesión 765-01) con mayor actividad antioomiceto (4A), y espectro de masas (4B) para  $m/z$  396 del metabolito mayoritario. El asterisco del cromatograma indica el pico del cual se tomó el espectro.



Cuadro 10. Metabolitos mayoritarios identificados en el extracto crudo de raíces de aguacate (accesión 765-01), por CG-MS.

No. de Pico	Metabolito	Tiempo de retención	Área
1	Ác. Decanóico	13.06	5607
2	Ác. 9-octadecenoico(Z)-,metil éster	16.79	51419
3	Ác. oléico	21.011	49259
4	13-tetradecenal	21.64	50378
5	9,17-octadecadienal	24.14	725108
6	2-metil-Z,Z-3-13-octadecadienol	28.00	216447
7	Estigmastan-3,5-dieno	34.823	44097

Con el resultado del análisis CG-MS de la fracción activa (ver Capítulo de RESULTADOS), se determinó la existencia de un pico mayoritario único, con un tiempo de retención a los 34.82 min, encontrando un 75% de pureza y por el peso molecular (396), el tipo de fragmentación y su absorbencia máxima a 245 nm, pudo constatar su estructura molecular, proponiendo como metabolito activo a estigmastan-3,5-dieno, compuesto derivado del estigmasterol (Figura 5).



Estigmastan-3,5-dieno 10351 1000214-16-4 38  
 Formula: C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>  
 MW: 396

Figura 5. Estructura propuesta del compuesto antioomiceto (Estigmastan-3,5-dieno) aislado del extracto de raíz de aguacate de la accesión 765-01.

### 6.3.5. Estandarización del método de detección de genes análogos de resistencia

En años recientes los genes de resistencia R se han identificado y clonado a partir de una gran variedad de plantas mono y dicotiledóneas, esto debido

básicamente a que las secuencias de los genes R poseen similitudes estructurales, y a que sus secuencias de aminoácidos comparten dominios o regiones que participan en la interacción proteína-proteína y en la transducción de señales. Con base a lo anterior se han diseñado oligonucleótidos degenerados para la búsqueda de estos genes en otras plantas; sin embargo, en aguacate no se han realizado este tipo de análisis.

Ante esta situación, en el presente trabajo se utilizaron 7 juegos de oligonucleótidos degenerados los cuales previamente han permitido la identificación y clonación de genes R en otras plantas (Cuadro 1). Los oligonucleótidos están dirigidos hacia los dominios ricos en leucina (LRR), de unión a nucleótido (NBS) y de cinasas. El tamaño de los productos de amplificación esperado está en el rango de los 300-600 pares de bases.

Para establecer las condiciones de amplificación y la generación de los productos predichos, se evaluaron inicialmente 6 juegos de oligonucleótidos utilizando para ello ADN genómico de plantas de tabaco, tomate y arroz, a partir de las cuales se han clonado genes R y que han servido como base para el diseño de los oligonucleótidos. Cuando se utilizaron las condiciones estándar de PCR sólo se logró obtener productos de amplificación dentro del rango esperado en las muestras de ADN de tabaco y arroz para los oligonucleótidos NLRR inv1/2 y XLRR for/rev, respectivamente (Figura 6A). Con el fin de mejorar los resultados de las amplificaciones se modificaron algunos de los parámetros de la reacción de PCR, obteniendo resultados positivos al aumentar la concentración de  $MgCl_2$  a 2 mM (Figura 6B) ya que se logró obtener productos de amplificación dentro del rango esperado con las combinaciones de oligonucleótidos AS1,3 y NLRR for/rev para tabaco y XLRR inv1/2 para arroz. Desafortunadamente no se logró obtener productos de amplificación en tomate aún con las modificaciones realizadas.

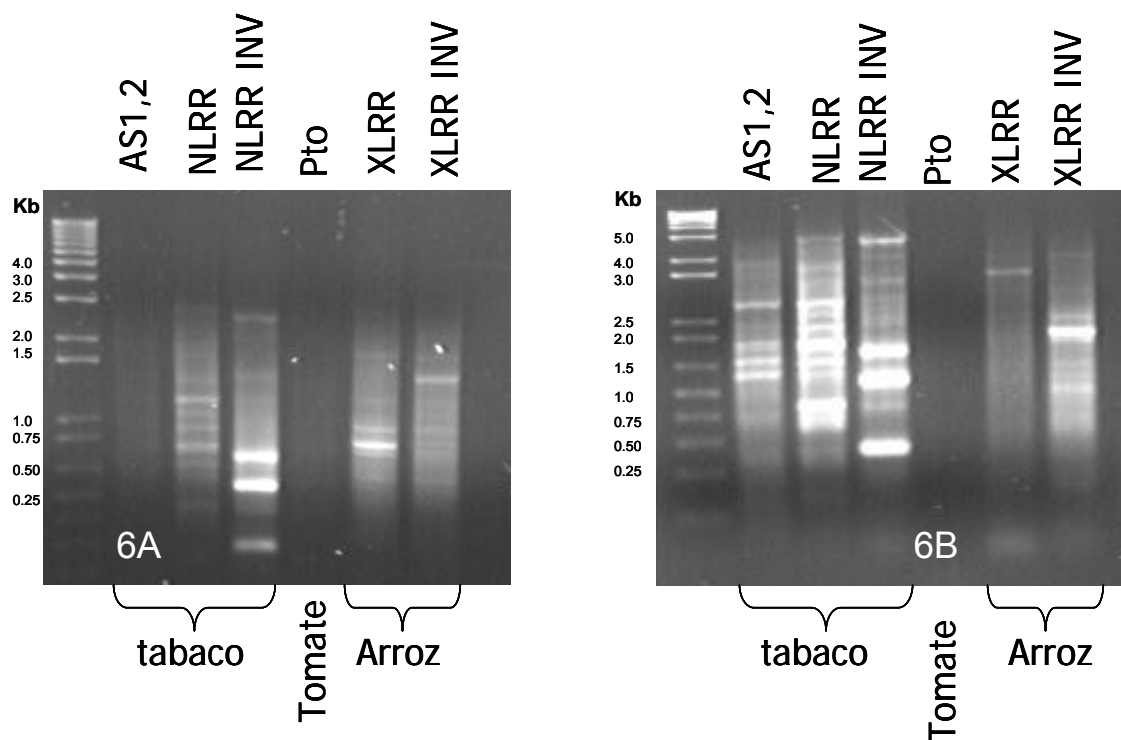


Figura 6. Productos de amplificación de ADN de genes R de diferentes plantas. Se utilizaron oligonucleótidos degenerados basados en dominios conservados de genes de resistencia a enfermedades de diferentes especies vegetales. Las condiciones para PCR fueron la estándar (6A), y con modificaciones en la concentración de  $MgCl_2$  (6B).

Una vez establecidas las condiciones de amplificación para el ADN genómico de tabaco y arroz, se procedió a realizar algunas pruebas de amplificación en aguacate. Se utilizaron 4 muestras de aguacate las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a los niveles de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora cinammomi*. Inicialmente se utilizaron los oligonucleótidos de arroz ya que fueron los que generaron un número menor de bandas en las pruebas de estandarización.

Los resultados con los oligonucleótidos XLRR se muestran en la figura 7. Las accesiones de aguacate evaluadas fueron las siguientes: accesión 064-02 (Aguacate 1), accesión 061-01 (Aguacate 2), accesión 531-01 (Aguacate 3) y accesión 285-02 (Aguacate 4). En los carriles 1 al 5 se utilizó el juego de iniciadores XLRR-inv1 y XLRR-inv2, y en los carriles 6 a 10 los iniciadores utilizados fueron el conjunto XLRR-for y XLRR-rev. El ADN de arroz utilizado como control corresponde a los carriles 5 y 10. Como se observa en la figura,

se obtuvieron los productos de amplificación esperados para los oligonucleótidos XLRR-inv1/2 y XLRR-for/rev de 0.8 y 1.6 kb, respectivamente. Solo se logró la amplificación de un producto de aproximadamente 1 kb en la muestra de aguacate 1 (accesión 064-02) con los oligonucleótidos XLRR-inv1/2. El resto de las muestras de aguacate no mostraron amplificación en las condiciones evaluadas.

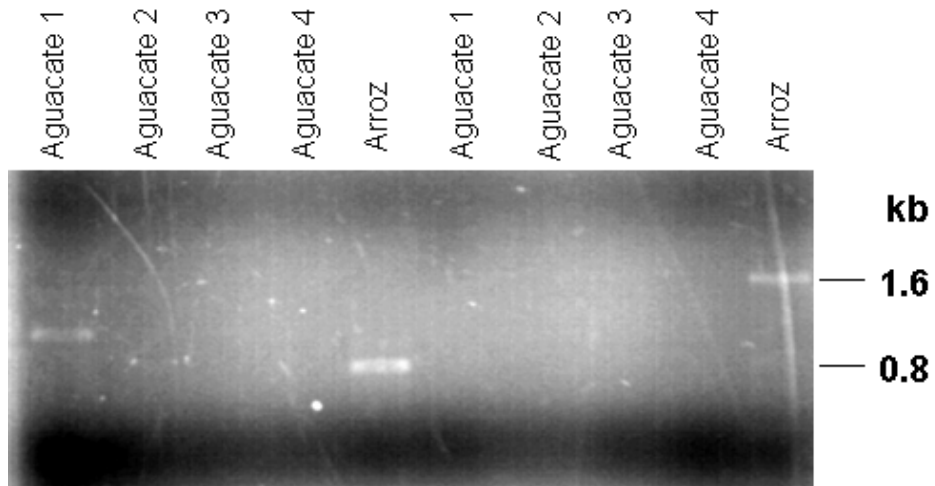


Figura 7. Productos de amplificación de ADN de genes R en aguacate. Se utilizaron los oligonucleótidos XLRR-inv1/2 y XLRR-for/rev de arroz. Se utilizaron condiciones estándar de PCR excepto que se usó 2 mM de  $MgCl_2$ .

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE COLECTA Y CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA

La caracterización que describe las colectas (Cuadro A1 del Anexo A) permite darles una identidad, por lo que comúnmente la información derivada se conoce como 'ficha de pasaporte', es en esta etapa que se asigna el número de accesión y el cuadro presentado contiene solamente la información mínima para la mencionada ficha (para una descripción más detallada véase IPGRI, 1995). La caracterización con descriptores de recolección y sitios de colecta (Cuadro A2 del Anexo A), proporciona valiosa información acerca del origen y características de las accesiones y sobre todo del medio ambiente donde se encontraron prosperando, permitiendo conformar áreas agroecológicas y épocas adecuadas de colecta.

Si la colecta consiste de frutos y/o semillas, se puede iniciar de inmediato una caracterización agromorfológica utilizando los descriptores pertinentes (Cuadro A3 del Anexo A). Si se colectan directamente varetas, se puede caracterizar la fase vegetativa del árbol donante. Las caracterizaciones floral y de fruto, y de semilla, solo se pueden efectuar en árboles que están terminando, o han superado la etapa fenológica de juvenilidad (etapa de desarrollo en que el árbol joven se mantiene exclusivamente en desarrollo vegetativo y no diferencia yemas para floración). Esa es la razón de porque no aparecen algunas de las accesiones en los cuadros de caracterización.

La caracterización de los sitios donde se colectan los recursos genéticos de aguacate, es una valiosa herramienta para el fitomejorador cuando se trata de seleccionar materiales cuyas características deseables están, de alguna forma, relacionadas con las variables del medio ambiente, sobre todo clima y suelo. En este trabajo, dicha caracterización condujo a la conformación de un grupo de accesiones del banco de germoplasma, que por el clima predominante y los suelos del sitio de colecta, existía una alta probabilidad de encontrar materiales que a través del tiempo hubieran interaccionado específicamente con el

oomiceto *P. cinnamomi*, y existiera la posibilidad de que esa interacción hubiera conducido a una evolución de mecanismos de defensa por parte de la planta de aguacate. Los resultados nos muestran que casi un 17% de los materiales seleccionados mostraron una inhibición del patógeno en una proporción mayor al 50% y se detectaron dos materiales con una inhibición del 100%. Esto confirma la utilidad de la caracterización de los sitios de colecta al permitir preseleccionar materiales de aguacate con las características deseables que busca el fitomejorador, además de permitir trabajar con un número manejable de materiales (48 accesiones) y no con toda la colección del banco de germoplasma (628 accesiones).

La caracterización agromorfológica con la cual se describieron los atributos cualitativos y cuantitativos de las accesiones de aguacate, permitió la clasificación taxonómica de las mismas (Cuadro 5) y también permitió apreciar que existe una amplia variabilidad genética en el banco de germoplasma del cual proceden las accesiones, y por otra parte se evidenciaron relaciones entre ellas (Sánchez-Pérez, 1999).

#### **7.1.1. Búsqueda de marcadores morfológicos asociados con la capacidad de inhibición a *P. cinnamomi*.**

El ideal de los genetistas dedicados al mejoramiento de plantas, siempre ha sido el de identificar fácilmente los individuos que poseen las características deseables que se buscan, con un examen sencillo del fenotipo. Las coloraciones, tamaño, forma y otras características fácil de detectar o de medir pueden ser indicadores de que una planta en particular es portadora de ciertos genes. Existen referencias de que algunas características morfológicas de la planta están genéticamente asociadas o ligadas a genes de resistencia a enfermedades. Por ejemplo en trigo, la característica 'necrosis de la punta de la hoja' (expresión del gene *Ltn*) está ligada con la tolerancia a las royas *Puccinia recondita* y *P. striiformis* (genes *Lr34* y *Yr18*, respectivamente; Singh, 1993); también en trigo, se ha demostrado la asociación de la misma 'necrosis de la punta de la hoja', y además la característica de 'hoja erecta' con la resistencia moderada a *Bipolaris sorokiniana* que produce la 'mancha moteada' (Joshi *et*

*al.*, 2004; Joshi y Chand, 2006), así como a la asociación entre la característica gluma de color rojo (gene *Rg2*) y la resistencia (gene *Dn4*) al áfido del trigo (*Diuraphis noxia*). En cebada, se encontró asociación entre la resistencia a *Fusarium graminearum* y las características ‘espigas de dos hileras’, ‘lemna púrpura’, y ‘resistencia al acame’ (Choo *et al.*, 2004).

También se han estudiado asociaciones entre las características morfológicas y resistencia o susceptibilidad a enfermedades de la raíz. Se ha reportado en cebada la asociación entre ‘cubierta lustrosa’ y ‘lemna púrpura’ con susceptibilidad a *Cochliobolus sativus* causante de la pudrición de la raíz (Kutcher *et al.*, 1996). En soya se encontró que el locus *Rps1* que confiere resistencia a *Phytophthora sojae*, está ligado a la característica ‘color de la cubierta de la vaina’ (Kilen, 1979; Gardner *et al.*, 2001); en chícharo se ha encontrado que la tolerancia a *Fusarium solani* (pudrición de la raíz), se asocia en buena medida con el ‘color púrpura de la flor’ (Hance *et al.*, 2004). En la búsqueda de marcadores ligados a la resistencia de chile a *Phytophthora capsici*, causante de la pudrición de raíz y tallo, además de marcadores moleculares, se han incluido marcadores morfológicos como ‘hábito erecto de crecimiento’, ‘forma elongada del fruto’ y ‘frutos en racimo en el nudo apical’ (Ogundiwin *et al.*, 2005). En la actualidad es práctica común la búsqueda de marcadores de resistencia a enfermedades de manera conjunta, tanto morfológicos como moleculares tales como AFLPs, RAPDs, SSRs y SCARs (Gardner *et al.*, 2001; Okubara *et al.*, 2002; Ogundiwin *et al.*, 2005).

En esta investigación, los descriptores utilizados en la caracterización agromorfológica, sirvieron como insumo para tratar de identificar características fenotípicas que pudieran estar relacionadas con la capacidad de los genotipos de inhibir a *P. cinnamomi*. Sin embargo, como muestran los resultados (Cuadro 6, Figura 2), los descriptores no presentaron ninguna relación entre la capacidad de inhibición y alguna característica agromorfológica. Esto puede deberse a que dichos descriptores fueron concebidos principalmente para encontrar diferencias y similitudes entre accesiones, desde las perspectivas taxonómica y agronómica. Por tanto, esto sugiere que en el caso del aguacate, en un futuro deberían probarse otros tipos de descriptores, o formas de

caracterización que sean más sensibles o adecuadas para encontrar marcadores de las características deseables que se están buscando, como en este caso, la resistencia a *P. cinnamomi*.

## **7.2. LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA**

### **7.2.1. Extractos inhibitorios preformados e inducidos**

Como se mencionó en el capítulo anterior, los extractos evaluados para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*, eran de dos clases: 1) los provenientes de la fase clorofórmica, y 2) los provenientes de la fase acuosa. También se mencionó que de los extractos de la fase acuosa, solamente uno de ellos (064-02) mostró una inhibición superior al 50%, del crecimiento del micelio del oomiceto.

En el Cuadro 7, se presentan separadamente los extractos de raíces de la fase clorofórmica, que fueron congeladas de inmediato y de raíces que se congelaron 5 h después de colectarlas. En este grupo de extractos sobresalen 7 que presentan una inhibición que va de 50 a 100%. Cuatro de ellos (de las accesiones 061-01, 417-01, 765-01 y 773-01), conforman un subgrupo (T0) proveniente de raíces congeladas inmediatamente después de la colecta, y otro subgrupo (T5) de 3 extractos (de las accesiones 209-04, 285-02 y 531-01) provienen de raíces congeladas 5 h después de la colecta.

Probablemente los 4 extractos del subgrupo T0, contenían compuestos preformados o constitutivos que inhibieron el crecimiento del oomiceto, aunque no necesariamente deberían ser los mismos compuestos en cada caso. Y se aprecia que los extractos de raíces de esas accesiones congeladas 5 h después, mostraron una menor capacidad de inhibición que los de congelación inmediata. Aquí podemos especular sobre dos alternativas referente a su capacidad de inhibición cuando las raíces se congelaron de inmediato:

- a) Todos esos extractos contenían el mismo compuesto inhibitorio (CH), pero solamente los extractos y el compuesto purificado de las



accesiones 765-01 y 773-01 (extractos de máxima inhibición; (EMI)) estaba en altas concentraciones de manera constitutiva, de tal manera que inhibieron al 100%, mientras que los extractos de las accesiones 061-01 y 417-01 contenían concentraciones menores del CH, ubicadas entre la concentración mínima inhibitoria (MIC), y la inhibición máxima.

- b) Los extractos de las accesiones 061-01 y 417-01 contenían CHs diferentes a los EMI, y su grado de inhibición estuvo en función de sus características químicas, y su actividad biológica (su capacidad inhibitoria), así como de su concentración.

El hecho de que los extractos de esas mismas 7 accesiones provenientes de raíces congeladas 5 h después no mostraran inhibición del crecimiento del patógeno, sugiere que la integridad de los compuestos inhibitorios fue afectada en el período de tiempo entre su colecta y su congelación, por los factores que caracterizan al deterioro fisiológico (alteración de membranas celulares, compartimentalización, estallido oxidativo, etc.) conduciendo a su degradación (Tanaka *et al.*, 1983; Lalaguna y Agudo, 1989; Wenham, 1995; Mittler *et al.*, 2004).

En lo referente al subgrupo de extractos T5, lo más probable es que los compuestos inhibitorios de esos 3 extractos (accesiones 209-04, 285-02 y 531-01) hubieran sido formados después de la colecta y hasta antes de su congelación 5 h después, posiblemente como consecuencia de las alteraciones metabólicas e inducción de rutas biosintéticas en los tejidos de la raíz, como respuesta de defensa a los daños mecánicos (heridas) sufridos por las raíces al colectarlas, y que incluyen la biosíntesis de variados compuestos de defensa contra herbívoros y patógenos (Koda, 1992; Reinbothe *et al.*, 1994; Benedetti *et al.*, 1998; León *et al.*, 2001; Gómez-Vázquez *et al.*, 2004). Esto último parece confirmarse, ya que los extractos de esas mismas tres accesiones que provenían de raíces congeladas de inmediato, no mostraron inhibición alguna. En este caso ya no se trata de compuestos preformados, sino inducidos.

Respecto al único extracto proveniente de la fase acuosa (accesión 064-02), que presentó una inhibición  $\geq 50\%$ , se puede decir que es el único extracto inhibitorio soluble en agua y que en virtud de que la inhibición de 75% se presentó en el extracto proveniente de raíces congeladas 5 h después de su colecta, es probable que no se trate de un compuesto preformado sino mas bien inducido, como es el caso de los extractos del subgrupo T5.

Debido a la característica del extracto de ser soluble en agua, es probable que él, o los compuestos inhibitorios, pertenezcan a grupos de compuestos antimicrobianos solubles en agua, tales como polipéptidos, lectinas, terpenoides o taninos (Cowan, 1999).

### **7.3. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIOOMICETO**

La posible estructura molecular del compuesto inhibitorio del crecimiento de micelio de *P. cinnamomi*, de acuerdo a los análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas, puede ser de un compuesto esteroidal, con una estructura típica de los fitoesteroles pero sin el radical -OH en el carbono 3 (Figura 5). Este compuesto probablemente puede ser derivado del estigmasterol o el  $\beta$ -sitosterol.

Los fitoesteroles (esteroles de las plantas) son miembros de la familia de los productos naturales conocidos como triterpenos, que incluye mas de 100 fitoesteroles y mas de 4000 otros tipos de triterpenos (Moreau *et al.*, 2002). De manera aproximada, una mezcla típica de fitoesteroles sería de 70% de sitosterol, 20% de estigmasterol, 5% de campesterol, y el restante 5% de otros fitoesteroles (Gunstone *et al.*, 1994). En general se considera que los fitoesteroles estabilizan las membranas de las células vegetales, con un incremento en la proporción esterol/fosfolípido que da una relativa mayor rigidez a la membrana (Itzhaki *et al.*, 1990). Sin embargo, los fitoesteroles individuales difieren en sus efectos sobre la estabilidad de las membranas. Se ha reportado que el estigmasterol en concentraciones o proporciones mayores respecto a los demás fitoesteroles produce un efecto de desorden en las membranas (Marsan *et al.*, 1996). Este cambio en proporciones

frecuentemente ocurre durante el proceso de senescencia (Stalleart y Geuns, 1994).

En investigaciones dirigidas a determinar la actividad biológica de los fitosteroles, se ha encontrado que el  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol como componentes de extractos crudos y aceites esenciales de diferentes especies vegetales, tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Kiprono *et al.*, 2000; Abreu *et al.*, 2002; El-Shazly *et al.*, 2002; Mitova *et al.*, 2003). Por otra parte, Li y col. (2004) y Prakash Chaturvedula y col. (2003) encontraron que de extractos crudos de *Cladogynus orientalis*, *Hymenache donacifolia* y *Heteropsis integerrima*, se aislaron los fitoesteroles estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucósido que presentaban inhibición sobre la ADN polimerasa beta. Wang y Maas (1997) reportaron que las raíces de fresa resistentes a *Phytophthora fragariae* contenían más  $\beta$ -sitosterol que las susceptibles.

También se ha reportado actividad biológica de productos con similitud estructural al compuesto activo aquí identificado. Los compuestos 5,alfa-estigmastano-3,6-dieno, y estigmastan-5-eno-3,beta,7alfa,20oxi-triol, aislados de frutos de *Alianthus altissima* (Swingle) mostraron actividad antimicrobiana (Zhao *et al.*, 2005). Wachsmann y col. (2002) reportan actividad antiviral de los compuestos: [(22S,23S)-3 $\beta$ -bromo-5 $\alpha$ ,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona], [(22R,23R)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahidroxi- $\beta$ -Homo-7-oxi-estigmastan-6-ona], [(22R,23R)-3 $\beta$ -fluoro-22,23-dihidroxiestigmastan-6-ona], [(22S,23S)-3 $\beta$ -fluoro-5 $\alpha$ ,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona] y [(22S,23S)-5 $\alpha$ -fluoro-3 $\beta$ ,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona], todos ellos derivados del brasicasterol. Aliotta y col. (1990), aislaron de *Typha latifolia* el compuesto estigmastan-4-eno-3,6-diol que inhibió el crecimiento de las microalgas *Synechococcus leopoliensis* y *Anabaena flosaquae*; Woldemichael y col. (2003) reportan que los esteroides 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiestigmastan-6,22-dieno-3 $\beta$ -ol, y estigmastan-4-eno-6 $\beta$ -ol-3-ona mostraron significativa actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*; Dumlu y Gürkan (2006) aislaron el compuesto esteroide estigmastan-1,5-dieno-3 $\beta$ -ol de la planta *Centaurea iberica* y demostraron que este compuesto presentó significativa actividad antioxidante y antimicrobiana. Finalmente, existe una patente donde se registra al compuesto estigmastan-3,5-dieno, sólo o

mezclado con otros compuestos, el cual junto con un portador farmacéutico posee actividad antibacteriana (<http://www.freepatentsonline.com/EP1461055.html>). En la revisión de literatura, no se encontraron más referencias específicas al compuesto estigmatan-3,5-dieno como un compuesto biológicamente activo.

Al momento de la colecta de las raíces de aguacate de la accesión 765-01, éstas sufrieron daño mecánico. Es ampliamente sabido que al sufrir heridas los tejidos vegetales se inducen respuestas de defensa, con objeto de sanar las heridas e impedir el ataque de patógenos oportunistas (Choi *et al.*, 1994; Durrant *et al.*, 2000; Cheong *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2004). Sin embargo, ya que esas raíces fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, es improbable que los tejidos de la raíz tuvieran el tiempo suficiente para biosintetizar compuestos de defensa (fitoalexinas). Así que se puede postular que los extractos de esas raíces contenían únicamente compuestos preformados.

En este trabajo, ya que el compuesto inhibitorio fue extraído de tejidos de raíces de aguacate, que no fueron expuestos previamente a ningún otro agente biótico o abiótico, se sugiere que es un compuesto soluble que está presente en forma activa en particular en algunas plantas de aguacate sanas (Filippone *et al.*, 1999). De acuerdo a las características químicas y biológicas, podemos especular que se trata de un compuesto del tipo de las fitoanticipinas, relacionado con metabolitos secundarios y estaría involucrado en la defensa de las raíces de aguacate contra el ataque de patógenos.

#### **7.4. EL USO DE RGAPs PARA IDENTIFICAR MARCADORES MOLECULARES DE GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES**

Como ha sido mencionado en el capítulo anterior, la amplificación PCR sólo se apreció en una de cuatro accesiones (accesión 064-02), cuando se utilizaron los iniciadores XLRR-inv1/inv2. Esos oligonucleótidos se diseñaron en base al gene *Xa21* de arroz, que confiere resistencia a todas las razas conocidas (Narayanan *et al.*, 2002) del tizón bacteriano (*Xanthomonas oryzae* pv.

*Oryzae*), y se trata de un gen cuyo producto es una proteína que consiste de un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRRs), un dominio transmembrana, y una cinasa serina/treonina con dominio intracelular.

No deja de llamar la atención que en aguacate se pudiera encontrar un gen análogo de resistencia a *Xa21*, que se encuentra en el genoma de una planta monocotiledónea, y que el gen sea responsable de resistencia a una bacteria. Sin embargo, mientras no tengamos un conocimiento más amplio del genoma del aguacate, y de las interacciones de la planta con patógenos compatibles e incompatibles, cualquier especulación sería aventurada.

Por otra parte, respecto a la carencia de amplificación de ADN en otros individuos (accesiones), y con otros oligonucleótidos, es probable que si la electroforesis se hubiera realizado sobre gel de poliacrilamida y tinción con plata para una mayor resolución como mencionan Chen y colaboradores, (1998a) se hubiera mostrado una mayor amplificación y polimorfismo del ADN de aguacate. También es probable que si los iniciadores se diseñaran en base a genes de resistencia a diversas especies de *Phytophthora* y en particular de especies que atacan la raíz de las plantas, se podría tener amplificación del ADN de otras accesiones de aguacate y con mayor polimorfismo.

Parece lógico que en un futuro se utilicen iniciadores diseñados a partir de genes *R* como la serie *Rps* (15 genes *R* en 8 loci; Sandhu *et al.*, 2004, 2005) de soya, que confieren resistencia a diferentes razas de *Phytophthora sojae*, patógeno que produce la pudrición de raíz y tallo.

## **7.5. RELEVANCIA PARA EL AGUACATE**

Algunos investigadores han postulado, desde un punto de vista evolutivo, que las defensas inducidas son más deseables que las constitutivas (preformadas), argumentando que todo tipo de defensa de la planta implica la desviación de recursos metabólicos para la biosíntesis de compuestos de defensa. De esta manera, en un “ambiente libre de enemigos”, las plantas que no desvían recursos para defensa tiene mayor aptitud que aquellas plantas que invierten

en defensa aún sin ataque de patógenos o insectos (Heil, 2002). Estas últimas incurrirían en un costo de aptitud (costo de la resistencia), derivado de los costos de asignación de recursos, la posible autotoxicidad de los compuestos de defensa, y las posibles afectaciones a mutualistas (efectos ecológicos), por ejemplo insectos polinizadores (Gershenson, 1994; Purrington, 2000; Heil, 2002). De esta manera, las defensas inducidas, incurrirían en costos de aptitud al activarse solamente después del ataque de herbívoros o patógenos, y eso significa un “ahorro” en costos. Sin embargo, a la fecha no existen evidencias suficientes de que esos postulados se confirmen en ambientes naturales (Mitchell-Olds *et al.*, 1998).

Por otra parte, otros investigadores resaltan que el depender de defensas inducidas de manera predominante, es riesgoso debido a que el ataque inicial puede ser demasiado rápido o severo para que tales defensas inducidas por el daño puedan ser desplegadas con suficiente oportunidad y efectividad (Wittstock y Gershenson, 2002). Consecuentemente, cuando es probable que las plantas sufran daños frecuentes o severos, puede ser mejor para las plantas invertir principalmente en defensas constitutivas, mientras que las plantas que son atacadas ocasionalmente, pueden depender predominantemente en defensas inducidas (McKey, 1979).

Cuando esos criterios se aplican a órganos individuales de las plantas, esas mismas consideraciones sugieren que las partes de las plantas que son de alto valor adaptativo o que están sujetas a un alto riesgo de ataque, pueden estar mejor protegidas por defensas constitutivas, mientras otras pueden ser mejor defendidas por respuestas inducidas. Por ejemplo, un ensayo de campo (Zangerl y Rutledge, 1996), demostró que los órganos reproductivos de pastinaca silvestre (*Pastinaca sativa*) son atacados frecuentemente por herbívoros. Esos órganos acumulan altos niveles constitutivos de xantotoxina (una furanocumarina tóxica), que no se incrementan por daño artificial subsiguiente. En contraste, las raíces de esa planta rara vez son atacadas, y poseen niveles solamente constitutivos bajos de xantotoxina, pero éstos se incrementan considerablemente después de recibir heridas.

En el presente caso del aguacate, en el peor escenario, las defensas constitutivas que pudieran incurrir en costos de aptitud sería solamente cuando el árbol está en un 'ambiente libre de enemigos', lo cual tiene poca aplicabilidad a plantas cultivadas, bajo un ambiente de agricultura comercial de varios años de antigüedad. Aún así, una defensa constitutiva, puede inhibir completamente al atacante, o por lo menos puede retrasar su crecimiento o desarrollo, dando tiempo a que las defensas inducidas se manifiesten con toda su eficacia. De esta manera, tanto las defensas constitutivas como las inducidas contribuyen a una óptima protección de la planta contra la enorme cantidad de enemigos herbívoros y microbianos.

Por otra parte, las defensas constitutivas son consideradas como un componente muy importante en la resistencia de no hospedero que es la forma más común y durable de resistencia de las plantas contra organismos que les causan enfermedades (Mysore y Riu, 2004).

Un adecuado conocimiento derivado de las caracterizaciones agromorfológica, química y molecular de nuestros recursos genéticos de aguacate, facilita la tarea de los fitomejoradores para identificar genotipos que pudieran poseer las características deseables a incorporar a la especie, para un mejor control de las enfermedades que la afectan.

## VIII. CONCLUSIONES

Los descriptores utilizados en la caracterización agromorfológica, no mostraron ser útiles para encontrar marcadores fenotípicos relacionados con la capacidad de las raíces del aguacate para inhibir el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*.

Las accesiones 765-01 y 773-01, ambas de la raza Mexicana de aguacate, contienen en sus raíces al menos un compuesto preformado (fiotanticipina), que podría conferir a esas plantas una resistencia de no hospedero contra *P. cinnamomi*, al inhibir completamente su crecimiento *in vitro*. Este es el primer reporte de la actividad biológica *in vitro* del compuesto estigmastan-3,5-dieno, como un compuesto constitutivo extraído de raíz de aguacate, que tenga un efecto inhibitorio sobre el oomiceto mencionado.

La metodología RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphism) parece ser una herramienta promisoría para la identificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a enfermedades en aguacate.



## IX. LITERATURA CITADA

- Aarts M.G., B. te Lintel Hekkert, E.B. Holub, J.L. Beynon, W.J. Stiekema, and A. Pereira. 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:251–258.
- Abreu, P.M., V.S. Rosa, E.M. Araujo, A.B. Canda, O. Kayser, K.-U. Bindseil, K. Siems, and A. Seemann. 1998. Phytochemical analysis and antimicrobial evaluation of *Detarium microcarpum* bark extracts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3:107-109.
- Adikaram, N.K.B.; D.F. Ewing, A.M. Karunaratne, and E.M.K. Wijeratne. 1991. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry* 31:93-96.
- Aliotta, G., M. Della Greca, P. Monaco, G. Pinto, A. Pollio, and L. Previtiera. 1990. In vitro algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. *J. Chem. Ecol.* 16:2637-2646.
- Anaya, A.L., J.F. Espinosa-García, y R. Cruz-Ortega. 2001. Relaciones químicas entre organismos, aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. *Plaza Valdes* 6:231-245.
- Axtell M.J., and B. J. Staskawicz. 2003. Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112:369-377.
- Bais, H.P., B. Prithviraj, A.K. Jha, F.M. Ausubel, and J.M. Vivanco. 2005. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434:217-221.
- Baldauf, S.L., A. J. Roger, J. Wenk-Siefert, and W.F. Doolittle. 2000. A kingdom-level phylogeny of eukariotes based on combines protein data. *Science* 290:972-977.
- Barr, D.J.S. 1992. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* 84:1-11.
- Begum, P., Y. Hashidoko, M.T. Islam, Y. Ogawa, and S. Tahara. 2002. Zoosporicidal activity of Anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Z. Naturforsch* 57c 874-882.

- Belkhadir, Y., R. Subramaniam and J. L. Dangl. 2004. Plant disease resistance protein signalling: NBS\_LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7:391-399.
- Ben Ya'acov, A., G. Buffer, A. Barrientos-Priego, E. de la Cruz-Torres, and L. López-López. 1992a. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I.- General description of the international project and its findings. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992.* pp.535-541.
- Ben Ya'acov, A., L. López-López, E. de la Cruz-Torres, and A. F. Barrientos Priego. 1992b. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. II.- Findings from the central part of México. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992.* pp 543-544.
- Benedetti, C.E., C.L. Costa, S.R. Turcinelli, and P. Arruda. 1998. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate and wounding in the *Coi1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116:1037-1042.
- Bergh, B., and N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70:135-145.
- Bergh, B. O. 1992. The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook.* 76:61-75.
- Birch, P.R.J., and S.C. Whisson. 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Mol. Plant Pathol.* 2:257-263.
- Birnbaum, K., R. DeSalle, C.M. Peters, and P.N. Benfey. 2003. Integrating gene flow, crop biology, and farm management in on-farm conservation of avocado (*Persea americana*, Lauraceae). *Am. J. Botany* 90:1619-1627.
- Bliss, C. I. 1937. Analysis of field experimental data expressed in percentages. *Plant Protection USRR*, 12:67-77.
- Bonas, U., and T. Lahaye. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: Refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:44-50.
- Bostein D., R. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet* 32:314-331

- Brasier, C.M. 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. II. Ecological implications. *New Phytologist* 74:195-198.
- Cahill, D. 1998. General biology and ecology of *Phytophthora* with special reference to *Phytophthora cinnamomi*. In: Gadek, P.A. 1998 (ed.) Patch deaths in tropical Queensland rainforests: association and impact of *Phytophthora cinnamomi* and other soil borne pathogens. Coop. Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management, Technical report, 98 pp. Cairns Australia.
- Campos-Rojas, E., T. Terrazas, and L. López-Mata. 2006. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Gen. Res. Crop Evol.* DOI 10.1007/s10722-005-3808-x.
- Castillo, M. C., C. Martínez, A. Buchala, J.-P. Métraux, and J. León. 2004. Gene-specific involvement of  $\beta$ -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135:85-94.
- Chaurasia, S.C. and K.K. Yvas. 1977. *In vitro* effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. *J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath.* 1977:24-26.
- Chen, X. M., R. Line, and H. Leung. 1998a. Genome scanning for disease resistance gene analogs in wheat, barley and rice by high-resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 97:345-355.
- Chen X.M., P.M. Hayes, T. Toojinda, H. Vivar, D. Kudrna, A. Kleinhofs, H. Leung, and R.F. Line. 1998b. Genetic mapping of genes for stripe rust resistance in barley using resistance gene analog polymorphism and AFLP markers. *Phytopathology* 88:S16.
- Chen, X.M., P.M. Hayes, T. Toojinda, H. Vivar, D. Kudrna, A. Kleinhofs, and R.F. Line. 1999. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) and other molecular markers associated with barley genes for multiple disease resistance. Abstracts in Plant and Animal Genome VII Conference (Abstract P433), San Diego CA, U.S.A., Jan. 17-21, 1999.
- Chen, X.M. 2002. Resistance gene analog polymorphism, a powerful technique for developing molecular markers for disease resistance genes.

- Abstracts in American Phytopathological Society 2002 Annual Meeting. Phytopathology 92:S106. Publication no. P-2002-0094-SSA.
- Cheong, Y. H., H.-R. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, and S. Luan. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 129:669-677.
- Choi, D., R.M. Bostock, S. Avdiushko, and D. F. Hildebrand. 1994. Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen- responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2329-2333.
- Choo, T.M., B. Vigier, Q.Q. Shen, R.A. Martin, K.M. Ho, and M. Savard. 2004. Barley traits associated with resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation. Phytopathology 94:1145-1150.
- Clegg, M.T. 2005. Assessing the genetic determination of valuable avocado traits using microsatellite (SSR) markers and quantitative trait locus (QTL) analysis. Proceedings of California Avocado Research Symposium 2005, Research Progress Report, October 29, 2005. University of California, Riverside. Pages 38-43. <http://www.avocado.org>.
- Cloutier S. and B.S. Landry. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture. In Vitro Cell. Develop. Biol. 30:32-39.
- Coffey, M.D. and F.B. Guillemet. 1987. Avocado rootstocks. Calif. Avocado Soc. Yearbook 71:173-179.
- Coffey, M.D. 1984. An integral approach to the control of avocado root rot. Calif. Avocado Soc. Yearbook 68:61-68.
- Coffey, M. D. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado – An integrated approach to control in California. Calif. Avocado Soc. Yearbook 71: 121-137.
- Collins, N., R. Park, W. Spielmeier, J. Ellis, and A.J. Pryor. 2001. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. Genome 44:375-381.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12:564-582.

- Dangl, J.L., R.A. Dietrich, and M.H. Richberg. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8:1793-1807.
- Dangl, J. L., and J. D. G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Davenport, T.L., Z. Ying, and T. Zhang. 2005. Use of simple sequence repeats (SSR) to determine incidence and effectiveness of self- and cross-pollinated avocado fruit in southern California. Research Progress Report, Proceedings of the California Avocado Research Symposium, October 29, 2005. University of California, Riverside. Pages 62-71. <http://www.avocado.org>.
- de Almeida, A.P., M.M.F.S. Miranda, I.C. Simoni, M.D. Wigg, M.H.C. Lagrota, and S.S. Costa. 1998. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (*Lauraceae*) leaf infusion. *Phytotherapy Res.* 12:562-567.
- De Vicente, M.C. y T. Fulton (eds). 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Roma, Italia.
- Delledone, M., J. Zeier, A. Marocco, and C. Lamb. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:13454-13459.
- Deng Z., S. Huang, P. Ling, C. Chen, C. Yu, C.A. Weber, G.A. Moore, and F.G. Gmitter Jr. 2000. Cloning and characterization of NBSLRR class resistance gene-candidate sequences in citrus. *Theor. Appl. Genet.* 101:814-822.
- Deng, Z. and F.G. Gmitter. 2003. Cloning and characterization of receptor kinase class disease resistance gene candidates in citrus. *Theor. Appl. Genet.* 108:53-61.
- Dixon, R.A., and C.J. Lamb. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:339-367.

- Domergue, F., G.L. Helms, D. Prusky, and J. Browse. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54:183-189.
- Dong, X. 1995. Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7137-7139.
- Dumlu, M.U. and E. Gürkan. 2006. A new active compound from *Centaurea* species. *Z. Naturforsch* 61c:44-46.
- Durrant, W.E., O. Rowland, P. Piedras, K. E. Hammond-Kosack, and J.D.G. Jones. 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12:963-977.
- Ellis, J., and P. Dodds. 2003. Plant pathology: Monitoring a pathogen-targeted host protein. *Curr. Biol.* 13:R400-R402.
- Ellstrand, N.C., J.M. Lee, B.O. Bergh, M.D. Coffey and G.A. Zentmyer. 1986. Isozymes confirm hibrid parentage for 'G755' selections. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70:199-203.
- El-Shazly, A., G. Dorai, and M. Wink. 2002. Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *Tanacetum santolinoides* (DC.) Feinbr. and Fertig. *Z. Naturforsch* 57c:620-623.
- Erwin, D.C., and O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul Minn. U.S.A.
- Faber, B.A., and L.J. Marais. 2001. UC IPM Pest management guidelines: Avocado diseases. University of California ANR Publication 3436 <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r8100111.html>.
- FAOSTAT. 2005. Aguacates Superficie cultivada (Ha) - Año 2005 [http://www.fao.org/waicent/portal/statistics\\_es.asp](http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp).
- Felix, G., M. Regenass, and T. Boller. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4:307-316.
- Fernandez, M.A., M.D. Garcia, and M.T. Saenz. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *J. Ethnofarmacol.* 53:11-14.

- Fernández-Northcote, E.N., O. Navia, and A. Gandarillas. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. *Fitopatología* 35:137-149.
- Feuillet C., G. Schachermayr, and B. Keller. 1997. Molecular cloning of a new receptor-like-kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat. *Plant J.* 11:45–52.
- Filiponne, M.P., J.D. Ricci, A.M. de Marchese, R.N. Farías, and A. Castagnaro. 1999. Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Lett.* 459:115-118.
- Flor, H. H. 1956. The complementary systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Flores, T., A. Alape-Girón, M. Flores-Díaz, and H.E. Flores. 2002. Ocatin. A novel tuber storage protein from the Andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiol.* 128:1291-1302.
- FRAC. 2005. FRAC Code list 2: Fungicides sorted by modes of action (FRAC: Fungicide Resistance Action Committee). <http://www.frac.info>.
- Franco, T. L. y R. Hidalgo (eds.). 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico No. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 pp.
- Gama, C. L., and A. Gómez P. 1992. An ethnoecological approach for the study of *Persea* : A case study in the Maya area. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992.*, pp 11-17.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, 4ª Ed. México D. F. 220 pp.
- Gardner, M.E., T. Hymowitz, S.J. Xu, and G.L. Hartman. 2001. Physical map location of the *Rps1-k* allele in soybean. *Crop Sci.* 41:1435-1438.
- Gershenzon, J. 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *J. Chem. Ecol.* 20:1281-1328.

- Ghannoum, M.A., and L.B. Rice. 1999. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:501-517.
- Glazebrook J. 1997. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annu. Rev. Genet.* 31:547-569.
- Gómez-Gómez, L. and T. Boller. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7:251-256.
- Gómez-Vázquez, R., R. Day, H. Buschmann, S. Randles, J.R. Beeching, and R.M. Cooper. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann. Bot.* 94:87-97.
- Granado, J., G. Felix, and T. Boller. 1995. Perception of fungal sterols in plants. Subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells. *Plant Physiol.* 107:485-490.
- Grayer, R. J. and J.J. Harborne. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982–1993. *Phytochemistry* 37:19–42.
- Gunstone, F.D., J.L. Harwood, and F.B. Padley. 1994. *The lipid handbook*. (2nd Ed.) Chapman and Hall, London.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:285-306.
- Hammond-Kosack, K.E., and J.D.G. Jones. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
- Hance, S.T., W. Grey, and N.F. Weeden. 2004. Identification of tolerance to *Fusarium solani* in *Pisum sativum* ssp. *elatius*. *Pisum Genetics* 36:9-13.
- Hardham, A.R. 1998. Cell biology of *Phytophthora cinnamomi*. In: Gadek, P.A. 1998 (Ed.) Patch deaths in tropical Queensland rainforests: association and impact of *Phytophthora cinnamomi* and other soil borne pathogens. Coop. Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management, Technical report, 98 pp. Cairns Australia.
- Hardham, A.R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant Pathol.* 6:589-604.
- Harter, H. L. 1960. Critical values for Duncan's new multiple range test. *Biometrics* 16:671-685.
- Hash, C. T., and P. J. Bramel-Cox. 2000. Survey of marker applications. In: B.I.G. Haussman, H. H. Geiger, D. E. Hess, C. T. Hash, and P. Bramel-



- Cox (eds.). 2000. Application of molecular markers in plant breeding. Training manual for a seminar held at IITA, Ibadan, Nigeria, from 16-17 August 1999. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). Patancheru 502 324 Andhra Pradesh, India.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59:205-215.
- Hawkes, J. G. 1991. Centros de diversidad genética vegetal en Latinoamérica. Diversity- America Latina Vol. 7 Nos 1 & 2:7-9.
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol. Biol.* 44:321-334.
- Heil, M. 2002. Ecological costs of induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:345-350.
- Hintze, J. 2001. NCSS and PASS. Number cruncher statistical systems. Kaysville, Utah. [www.NCSS.com](http://www.NCSS.com).
- Holt, B.F., D.A. Hubert, and J.L. Dangl. 2003. Resistance gene signaling in plants – complex similarities to animal innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 15:20-25.
- Hoult, J.R.S. and M. Paya. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* 27:713-722.
- Huanosto, M. R. 2000. Caracterización de tres especies de aguacate (*Persea americana*, *P. tolimanensis* y *P. schiedeana*) utilizando RAPD's como marcadores moleculares. Tesis Profesional, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 52 pp.
- IPGRI. 1995. Descriptors for avocado (*Persea spp.*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1995, 52pp.
- Itzhaki, H., A. Borochoy and S. Mayak. 1990. Age-related changes in petal membranes from attached and detached rose flowers. *Plant Physiol.* 94:1233-1236.
- Jaramillo, S. y M. Baena. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.
- Jayasuriya, K.E., R.L.C. Wijesundera, and S.A. Deraniyagala. 2003. Isolation of anti-fungal phenolic compounds from petioles of two *Hevea brasiliensis*

- (rubber) genotypes and their effect on *Phytophthora meadii*. Ann. Appl. Biol. 142:63-69.
- Jia, Y., S.A. McAdams, G.T. Bryan, H.P. Hershey and B. Valent. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. 19:4004-4014.
- Jones, G.A., T.A. McAllister, A.D. Muir, and K.J. Cheng. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 60:1374-1378.
- Joshi, A.K. and R. Chand. 2002. Variation and inheritance of leaf angle, and its association with spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) severity in wheat (*Triticum aestivum*). Euphytica 124:283-291.
- Joshi, A.K., R. Chand, S. Kumar, and R.P. Singh. 2004. Leaf tip necrosis: A phenotypic marker associated with resistance to spot blotch disease in wheat. Crop Sci. 44:792-796.
- Kamoun, S., E. Huitema, and V.G.A.A. Vleeshouwers. 1999. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response?. Trends Plant. Sci. 4:196-200.
- Kamoun, S., H. Lindqvist and F. Govers. 1997. A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:1028-1030.
- Kamoun, S. 2000. *Phytophthora*. In: Fungal Pathology, Ed. By J. Kronstad. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 237-265.
- Kanazin, V., L.F. Marek, and R.C. Shoemaker. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:11746-11750.
- Kaul, T.N., E. Middletown Jr., and P.L. Ogra. 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. J. Med. Virol. 15:71-79.
- Khan, J., L.V. Madden, and H.A.J. Hoitink. 2002. Systemic resistance induced in cucumber against *Phytophthora* crown rot and blight by *Trichoderma hamatum* 382. Abstract No. 92:S41 in: Amer. Phytopathol Soc. Annual Meeting 2002.
- Kilen, T.C. 1979. Observations on possible linkage between the *Rps1* locus and pod wall color. Soybean Genet. Newsl. 19:156-158.

- Kiprono, P.C., F. Kaberia, J.M. Keriko, and J. Karanja. 2000. The *in vitro* anti-fungal and anti-bacterial activities of  $\beta$ -sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). Z. Naturforsch 55c:485-488.
- Knight, R. J. 2002. History, distribution and uses. In: Whiley, A.W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. (eds.), Avocado: Botany, production and uses. CABI Publishing, pp. 1-14.
- Kobiler, I., D. Prusky, S. Midland, J.J. Sims, and N.T. Keen. 1993. Compartmentation of antifungal compounds in oil cells of avocado fruit mesocarp and its effect on susceptibility to *Colletotrichum gloeosporioides*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43:319-328.
- Koda Y. 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Int. Rev. Cytol. 135:155-199.
- Koller, B., A. Lehmann, J. M. McDermott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85: 901-904.
- Kopp, L. E. 1966. A taxonomic review of the genus *Persea* in the Western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). Mem. N.Y. Bot. Gard. 14:1-120.
- Kuc, J. 1982. Induced immunity to plant disease. BioScience 32:854-960.
- Kumar, S., A. Rzhetsky. 1996. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. J. Mol. Evol. 42:183-193.
- Kutcher, H.R., K.L. Bailey, B.G. Rossnage, and J.D. Franckowiak. 1996. Linked morphological and molecular markers associated with common root rot reaction in barley. Can. J. Plant Sci. 76:879.
- Lalaguna, F. and M. Agudo. 1989. Relationship between changes in lipid with ageing of cassava roots and senescence parameters. Phytochemistry 28:2059-2062.
- Lamb, C.J., M.A. Lawton, M. Dron, and R.A. Dixon. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell 56:215-224.
- Lang, B.F., E. Seif, M.W. Gray, C.J. O'Kelly, and G. Burger. 1999. A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. J. Eukaryot. Microbiol. 46:320-326.
- Latijnhouwers, M., P.G.J.M. de Wit, and F. Govers. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. Trends Microbiol. 11:462-469.

- Lee, B.S., and G.A. Zentmyer. 1982. Influence of calcium nitrate and ammonium sulfate on *Phytophthora* root rot of *Persea indica*. *Phytopathology* 72:1558-1564.
- Leister, D., A. Ballvora, F., Salamini, and C. Gebhardt. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.* 14:421-429.
- León, J., E. Rojo, and J.J. Sánchez-Serrano. 2001. Wound signaling in plants. *J. Exp. Bot.* 52:1-9.
- Li, S.S., Z. Gao, X. Feng, S.H. Jones, and S.M. Hecht. 2004. Plant sterols as selective DNA polymerase beta lyase inhibitors and potentiators of bleomycin cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* 12:4253-4258.
- Little, T.M. y F.J. Hills. 1985. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas, 6<sup>a</sup>. reimpression, México, 270 pp.
- López-Herrera, C.J., R.M. Pérez-Jiménez, M.J. Basallote-Ureba, T.Z. Bonilla, and J.M. Melero-Vara. 1997. Effect of soil solarization on the control of *Phytophthora* root rot in avocado. *Plant Pathol.* 46:329-340.
- Luderer, R., S. Rivas, T. Nurnberger, B. Mattei, H.W. Van den Hooven, R.A.L. Van der Hoorn, T. Romeis, J.M. Wehrfritz, B. Blume, D. Nennstiel, D. Zuidema, J. Vervoort, G. De Lorenzo, J.D.G. Jones, P.J.G.M. De Wit, and M.H.A.J. Joosten. 2001. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:867-876.
- Mackey, D., B. F. Holt III, A. Wilg, and J. L. Dangl. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754.
- MacDonald, J. D., and J.M. Duniway. 1978. Influence of the matric and osmotic components of water potential on zoospore discharge in *Phytophthora*. *Phytopathology* 68:751-757.
- Marks, G.C. and I.W. Smith. 1991. The cinnamon fungus in Victorian forests. *Lands and Forests. Bulletin No. 31.*, Victorian Department of Conservation and Environment. 33pp.
- Marsan, M.P., I. Muller and A. Milon. 1996. Ability of clionasterol and poriferasterol (24-epimers of sitosterol and stigmasterol) to regulate membrane lipid dynamics. *Chem. Phys. Lipids* 84:117-121.

- Mason, T.L. and B.P. Wasserman. 1987. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* 26:2197-2202.
- McGrath, M.T. 2004. What are fungicides. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2004-0825-01.
- McKey, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants. In: G.A Rosenthal, D.H. Jansen (Eds.). *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Orlando Florida, Academic Press, pp. 56-134.
- Menge, J.A., F.B. Guillemet, S. Campbell, E. Johnson, and E. Pond. 1992. The performance of rootstocks tolerant to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* under field conditions in Southern California. Proc. of Second World Avocado Congress. pp. 53-59.
- Menge, J.A., D.Crowley, M. Crowley, E. Pond, J. Borneman, B. Mckee, B. Tabor, G. Bender, P. Mauk, J. Downer, P. Clark, V. McDonald, and B. Tombe. 2002. Biocontrol of *Phytophthora* root rot of avocado with mulch and biocontrol agents. Proceedings of California Avocado Research Symposium 2002. University of California, Riverside. pp. 21-24.
- Messenger-Routh, B.J., J. A. Menge, and E.C. Pond. 1996. Effect of gypsum soil amendments on avocado root rot. *Phytopathology* 86:S30 (Abstract).
- Meyers B.C., D.B. Chin, K.A. Shen, S. Sivaramakrishnan, D.O. Lavelle, Z. Zhang, and R.W. Michelmore. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817–1832.
- Mhameed, S., D. Sharon, J. Hillel, E. Lahav, D. Kaufman, and U. Lavi. 1996. Level of heterozygosity and mode of inheritance of variable number of tandem repeat loci in avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:778-782.
- Mhameed, S., D. Sharon, D. Kaufman, E. Lahav, J. Hillel, C. Degani, and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theor. Appl. Genet.* 94:279-286.
- Michelmore R. 1996. Flood warning – resistance genes unleashed. *Nat. Genet.* 14:376–378.

- Michelmore, R.W., and B.C. Meyers. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and birth-and-death process. *Genome Res.* 8:1113-1130.
- Mitchell-Olds, T., J. Gershenzon, I. Baldwin, and W. Boland. 1998. Chemical ecology in the molecular era. *Trends Plant Sci.* 3:362-365.
- Mitova, M., R. Taskova, S. Popov, R.G. Berger, U. Krings, and N. Handjieva. 2003. GC/MS analysis of some bioactive constituents from *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch* 58c:697-703.
- Mittler, R., E.H. Herr, B.L. Orvar, W. Van Camp, H. Willekens, D. Inzé, and B.E. Ellis. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:14165-14170.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.
- Mohan, M. S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, and M. Yano. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breeding* 3:87-103.
- Molina Torres, J., C.J. Salazar-Cabrera, C. Armenta-Salinas, and E. Ramírez-Chavez. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkalamides from *Heliopsis longipes* roots: affinins and reduced amides. *J. Agric. Food Chem.* 52:4700-4704.
- Moreau, R.A., B.D. Whitaker, and K.B. Hicks. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health promoting uses. *Prog. Lipid Res.* 41:457-500.
- Morrissey, J.P., and A.E. Osbourn. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:708-724.
- Mullis K.B., F.A. Faloona, S. Scharf, R.K. Saiki, G. Horn, H.A. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.
- Mysore, K.S., and C.-M. Ryu. 2004. Nonhost resistance: how much do we know?. *Trends Plant Sci.* 9:97-104.
- Narayanan, N.N., N. Baisakh, C.M. Vera Cruz, S.S. Gnanamanickam, K. Datta, and S.K. Datta. 2002. Molecular breeding for the development of blast and bacterial blight resistance in rice cv. IR50. *Crop Sci.* 42:2072–2079

- Neeman, I., A. Lifshitz, and Y. Kashman. 1970. New antibacterial agent isolated from the avocado pear. *Appl. Microbiol.* 19:470-473.
- Newett, S.D.E., J.H. Crandy, and C.F. Balerdi. 2002. Cultivars and rootstocks. In: Whaley, A.W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. (Eds.), *Avocado: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing, pp. 161-187.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, B.F. Holt III, and J.L. Dangl. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 37:579-609.
- Nonaka, G.-I. I. Nishioka, M. Nishizawa, T. Yamagishi, Y. Kashiwada, G.E. Dutschman, A.J. Bodner, R.E. Kilkuskie, Y.-C. Cheng, and K.-H. Lee. 1990. Anti-AIDS agents. 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* 53:587-595.
- Ogundiwin, E.A., T.F. Berke, M. Massoudi, L.L. Black, G. Huestis, D. Choi, S. Lee, and J.P. Prince. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annum* L.). *Genome* 48:698-711.
- Okubara, P.A., D.A. Inglis, F.J. Muehlbauer, and C.J. Coyne. 2002. A novel RAPD marker linked to the *Fusarium* wilt race 5 resistance gene (*Fwf*) in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 34:6-8.
- Oros, G., I. Ujváry, R.J. Nachman. 1999. Antimicrobial activity of o-carboranylalanine. *Amino Acids.* 17:357-368.
- Osborn, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8:1821-1831.
- Otto, A. and V. Wilde. 2001. Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers – a review. *Bot. Rev.* 67:171-238.
- Papadakis, J. 1966. *Climates of the world and their agricultural potentialities*. DAPCO, Rome, 174 pp.
- Papadopoulou, K., R.E. Melton, M. Leggett, M.J. Daniels, and A.E. Osborn. 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:12923-12928.
- Paquin, B., M.J. Laforest, L. Forget, I. Roewer, Z. Wang, J. Longcore, and B.F. Lang. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal

- mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31:380-395.
- Parker, J.E. 2003. Plant recognition of microbial pathogens. *Trends Plant Sci.* 8:245-247.
- Patterson, D.J. and M.L. Sogin. 1992. Eukaryote origins and protistan diversity. In: Hartman, H. and K. Matsuno (eds.) *The origin and evolution of the cell.* Singapore: World Scientific, pp. 13-46.
- Paxton, J.D. 1981. Phytoalexins—a working redefinition. *Phytopathol. Z.* 101:106-109.
- Pegg, K.G., L.M. Coates, L. Korsten, and R.M. Harding. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: Whiley, A.W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. (eds.), *Avocado: Botany, Production and Uses.* CABI Publishing, pp. 299-338.
- Perez, V., J.-C. Huet, M. O'Donohue, C. Nespoulous, and J.-C. Pernollet. 1999. A novel elicitin necrotic site revealed by  $\alpha$ -cinnamomin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochemistry* 50:961-966.
- Pernollet, J.-C., M. Sallantin, M. Sallé-Tourne, and J.-C. Huet. 1993. Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42:53-67.
- Pflieger S., V. Lefebvre, and M. Causse. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Mol. Breed.* 7:275–291.
- Phillips, D., B.R. Grant, and G. Weste. 1987. Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 77:691-698.
- Phillipson, J.D. and M.J. O'Neill. 1987. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharm. Nord.* 1:131-144.
- Pinkas, Y., M. Zilberstaine, and J. Hershenhorn. 1992. Elucidation of resistant response to *Phytophthora* root rot in a susceptible avocado rootstock. *Proc. of Second World Avocado Congress.* pp. 139.
- Prakash Chaturvedula, V.S., Z. Gao, S.M. Hecht, S.H. Jones, and D.G. Kingston. 2003. A new acylated triterpenoid from *Couepia polyandra* that



- inhibits the lyase activity of DNA polymerase beta. *J. Nat. Prod.* 66:1463-1465.
- Prusky, D. and N.T. Keen. 1993. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Dis.* 77:115-119.
- Prusky, D. and N.T. Keen. 1995. Inducible preformed compounds and their involvement in the resistance of plants to pathogens, In R. Reuveni (Ed.), *Novel approaches to integrated pest management.* Lewis Publishers, Boca Raton, Fla. pp. 139–151.
- Purrington, C.B. 2000. Costs of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:305-308.
- Ramalingam, J., C.M. Vera Cruz, K. Kukreja, J.M. Chitoor, J.- L. Wu, S.W. Lee, M Baraoidan, M.L. George, M.B. Cohen, S.H. Hulbert, J.E. Leach, and H. Leung. 2003. Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:14-24.
- Reinbothe S, C. Reinbothe, C. Heintzen, C. Seidenbecher, and B.Parthier. 1993. A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 59 untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *EMBO J.* 12:1505-1512
- Ribeiro, O.K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Gramer, Vadus, Lechtenstein, 417 pp.
- Rincón-Hernández, C.A. 2005. Relación entre la diversidad química de las hojas del aguacatero criollo (*Persea americana* Mill. Var *drymifolia* (Schltdl. & Cham) S.F. Blake) y la incidencia del agallero de las hojas (*Trioza anceps* Tuthill). Tesis, Escuela de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 70 pp.
- Robertson, A. 2005. An introduction to Fungicides. Iowa State University Extension Service, Ames, IA 50011 U.S.A.  
<http://www.plantpath.iastate.edu/soybeanrust/node/55>.
- Rodríguez-Saona, C., J.G. Millar, D.F. Maynard, and J.T. Trumble. 1998. Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil. *J. Chem. Ecol.* 24:867-889.

- Rodriguez-Saona, C., and J.T. Trumble. 2000. Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Curr. Org. Chem.* 4:1249-1260.
- Ryals, J., S. Uknes, and E. Ward. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104:1109-1112.
- Sánchez Pérez, J. de la L. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:109-116.
- Sánchez Pérez, J. de la L., J.J. Alcántar Rocillo, V.M. Coria Avalos, J. Anguiano Contreras, I. Vidales Fernández, L.M. Tapia Vargas, J.L. Aguilera Montañéz, G. Hernández Ruíz, y J.A. Vidales Fernández. 2001. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México, 208 pp.
- Sandhu, D., H. Gao, S. Cianzio, and M.K. Bhattacharyya. 2004. Deletion of a disease Nucleotide-Binding-Site Leucine-Rich-Repeat-like sequence is associated with the loss of the *Phytophthora* resistance gene *Rps4* in soybean. *Genetics* 168:2157-2167.
- Sandhu, D., K.G. Schallock, N. Rivera-Velez, P. Lundeen, S. Cianzio, and M.K. Bhattacharyya. 2005. Soybean *Phytophthora* resistance gene *Rps8* maps closely to the *Rps3* region. *J. Hered.* 96:536-541.
- Schieber, E. and G.A. Zentmyer. 1977. Collecting *Persea schiedeana* in Guatemala. *Calif. Avocado Soc. Yearbook.* 61:91-94.
- Schieber, E. and G. A. Zentmyer. 1992. Archeology of the Avocado in Latin America. *Proc. of Second World Avocado Congress 1992*, pp. 49.
- Schnell, R.J., J.S. Brown, C.T. Olano, E.J. Power, and C.A Krol. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:881-889.
- Schroeder, C. A. 1990. Useful fruits of avocado relatives. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 74: 243-245.
- Scofield, S.R., C.M. Tobias, J.P. Rathjen, J.H. Chang, D.T. Lavelle, R.W. Michelmore, and B.J. Staskawikz. 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274:2063-2065.

- Scora, R. W., and B. Bergh,. 1992. Origin and taxonomic relationships within the genus *Persea*. Proc. of Second World Avocado Congress, 1992, pp. 505-514.
- Sharma, N., H.A. Gruszewski, S.-W. Park, D.G. Holm, and J.M. Vivanco. 2004. Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. Biochem. 42:647-655.
- Sharon, D., P.B. Cregan, S. Mhameed, M. Kusharska, J. Hillel, and U. Lavi. 1997. An integrated genetic linkage map of avocado. Theor. Appl. Genet. 95:911-921.
- Sharon, D., J. Hillel, S. Mhameed, P.B. Cregan, E. Lahav. and U. Lavi. 1998. Association between DNA markers and loci controlling avocado traits. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:1016-1022.
- Shearer, B.L., and J.T. Tippett. 1989. Jarrah dieback: The dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of South-western Australia. Department of Conservation and Land Management, Western Australia, Research Bulletin 3, xvii + 76 pp.
- Shepherd, R.W., W.T. Bass, R.L. Houtz, and G.J. Wagner. 2005. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. Plant Cell 17:1851-1861.
- Shi Z.X., X.M. Chen, R.F. Line, H. Leung, and C.R. Wellings. 2001. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust. Genome 44:509–516.
- Shimai, T., M.T. Islam, Y. Fukushi, Y. Hashidoko, R. Yokasawa, and S. Tahara. 2002. Nicotinamide and structurally related compounds show halting activity against zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides*. Z Naturforsch 57c:323-331.
- Singh, R.P. 1993. Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes *Lr34* and *Yr18* adult plant resistance to rusts in bread wheat. Plant Dis. 77:1103-1106.
- Smith, C.E. Jr. 1966. Archaeological evidence for selection in avocado. Econ. Bot. 20:169-175.
- Smith, C.E. Jr. 1969. Additional notes on pre-conquest avocados in Mexico. Econ. Bot. 23:135-140.

- Stalleart, V.M. and J. M. C. Geuns. 1994. Phospholipid and free sterol composition of hypocotyl plasma membranes of ageing mung bean seedlings. *Phytochemistry* 36:1177-1180.
- Staskawicz, B.J. 2001. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol.* 125:73-76.
- Stern, J.L., A.E. Hagerman, P.D. Steinberg, and P.K. Mason. 1996. Phorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol.* 22:1887-1899.
- Storey, W. B., B. Bergh, and G. A. Zentmyer. 1986. The Origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70:127-143.
- Tanaka, Y., E.S. Data, E.S. Hirose, T. Taniguchi, and I. Uritani. 1983. Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots. *Agr. Biol. Chem.* 47:693-700.
- Téliz, O.D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi Prensa 1ª edición, México 219 pp.
- Terras, F.R.G., H.M.E. Schoofs, H.M.E. Thevissen, R.W. Osborn, J. Vanderleyden, B.P.A. Cammue, and W.F. Broekaert. 1993. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol.* 103:1311-1319.
- Thatcher, L.F., J.P. Anderson, and K.B. Singh. 2005. Plant defense responses: what have we learnt from *Arabidopsis*?. *Funct. Plant Biol.* 32:1-19.
- Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:351-357.
- Tierens, K.F.M.-J., B.P.H.J. Thomma, M. Brouwer, J. Schmidt, K. Kistner, A. Porzel, B. Mauch-Mani, B.P.A. Cammue and W.F. Broekaert. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiol.* 125:1688-1699.
- Toojinda T., L. Broers, X.M. Chen, P.M. Hayes, A. Kleinhofs, J. Korte, D. Kudrna, H. Leung, R.F. Line, W. Powell, and H. Vivar. 2000. Mapping qualitative and quantitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 101:580-589.

- Tsuchiya, H., M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T. Tanaka, and M. Inuma. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 50:27-34.
- Turner, J.G., C. Ellis, and A. Devoto. 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell, Supplement* 2002:S153-S164.
- Tyler, B.M. 2002. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:137-167.
- UPOV.1997. Guía para la distinción, homogeneidad y estabilidad para el aguacate (*Persea americana* Mill.). Ed. por Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (www.upov.int.).
- Van der Biezen, E.A. and J.D.G. Jones. 1998. Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23:454-456.
- Van der Hoorn, R.A.L., P.J.G.M. De Wit, and H.A.J. Matthieu. 2002. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.* 7:67-71.
- Van Etten, H. D., J. W. Mansfield, J. A. Bailey, and E. E. Framer. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Vasiukova, N.I., V.A. Paseshnichenko, M.A. Davydova, and G.I. Chalenko.1977. Fungitoxic properties of steroid saponins from the rhizomes of deltoid *dioscorea*. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 13:172-176.
- Vidales-Fernández, J.A. y J.J. Alcántar-Rocillo.1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands.) del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5:255-259.
- Vivanco, J.M., B.J. Savary, and H.E. Flores. 1999. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiol.* 119:1447-1456.
- Vleeshouwers, V.G.A.A., W. Van Dooijeweert, F. Govers, S. Kamoun, and L.T. Colon. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210:853-864.
- Vogel, J., T.K. Raab, C. Schiff, and S.C. Somerville. 2002. *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:2095-2106.

- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414.
- Wachsman, M.B., J.A. Ramirez, L.R. Galagovsky, and C.E. Coto. 2002. Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antiviral Chem. Chemother.* 13:61-66.
- Wang, S.Y. and Maas, J.L. 1997. Relation of membrane lipid content in strawberry roots to red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance. *Acta Hort. (ISHS)* 439:863-868.  
[http://www.actahort.org/books/439/439\\_141.htm](http://www.actahort.org/books/439/439_141.htm).
- Ware, G. and D. Whitacre. 2004. The Pesticide Book. Pp. 211-218- MeisterPro Crop Protection Knowledge Central , U.S.A. <http://ww2.meisterpro.com>.
- Watanbe, H., C. Miyaji, M. Makino, and T. Abo. 1996. Therapeutic effects of glycyrrhizin in mice infected with LP-BM5 murine retrovirus and mechanisms involved in the prevention of disease progression. *Biotherapy* 9:209-220.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Wenham, J.E. 1995. Post-harvest deterioration of cassava - A Biotechnology perspective. *FAO Plant Production and Protection Paper* 130, 116 pp. [www.fao.org/docrep/V4510E/V4510E00.htm](http://www.fao.org/docrep/V4510E/V4510E00.htm).
- Wigg, M.D., A.A. Al-Jabri, S.S. Costa, E. Race, B. Bodo, and J.S. Oxford. 1996. *In vitro* virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea Americana* Mill. (avocado) leaves. *Antiviral Chem. Chemother.* 7:179-183.
- 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 Res.* 18: 6531-6535.
- Williams M.G., T. Senaratna, and K. Sivasithamparam. 2002. Effect of pre-treatment with benzoic acid on disease development on stems of *Banksia attenuata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. Abstract No. 92:S86 in: *Amer. Phytopathol Soc. Annual Meeting* 2002.

- Wittstock, U., and J. Gershenzon. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:1-9.
- Woldemichael, G.M., S.G. Franzblau, F. Zhang, Y. Wang, and B.N. Timmermann. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica* 69:628-631.
- Wolstenholme, B.N. and A.W. Whiley. 1999. Ecophysiology of the avocado tree as a basis for pre-harvest management. *Revista Chapingo Serie Horticultura Núm. Especial* 5:77-88.
- Ya, C., S.H. Gaffney, T.H. Lilley, and E. Haslam. 1988. Carbohydrate-polyphenol complexation, p. 533 In: R.W. Hemingway and J.J. Karchesy (eds.) *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Yan, G.P., X.M. Chen, R.F. Line, and C.R. Wellings. 2003. Resistance gene analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theor. Appl. Genet.* 106:636-643.
- Yu Y.G., G.R. Buss, and M.A. Saghai-Maroo. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11751–11756.
- Zacchino, S., G. Rodríguez, C. Santecchia, G. Pezzenati, F. Gianini, and R. Enriz. 1998. *In vitro* studies of action of antigungal 8.O.4\* neolignans occurring in certain species of *Viola* and related genera of *Myristicaceae*. *J. Ethnofarmacol.* 62:35-41.
- Zangerl, A.R. and C.E Rutledge. 1996. The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *Am. Nat.* 147:559-608.
- Zentmyer G. A. and L. N. Lewis. 1976. Avocado root rot research. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 59: 100-103.
- Zentmyer, G.A. and S.M. Mircetich. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 56:710-712.
- Zentmyer, G. A. 1961. Avocado diseases in the Americas. *Ceiba*, 9:61-79.
- Zentmyer, G. A. 1978. Origin of root rot resistant rootstocks. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 62:87-89.

- Zentmyer, G.A. 1979. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by a substance in avocado roots. *Phytopathology* 69:1129-1131.
- Zentmyer, G.A. 1985. Origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 69:89-94.
- Zhang Y., and K. Lewis. 1997. F abatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 149:59-64.
- Zhao, C.C., J.H. Shao, X. Li, J. Xu, and P. Zhang. 2005. Antimicrobial constituents from fruits of *Ailanthus altissima* SWINGLE. *Arch. Pharm. Res.* 28:1147-1151.
- Zilberstaine, M., and A. Ben Ya'akov. 1999. Integration of strategies for controlling root-rot in avocado in Israel. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5:251-253.



## ANEXOS

### ANEXO A:

Cuadro A1. Datos de pasaporte y descripción de accesiones.

Cuadro A2. Descriptores de recolección y Caracterización de sitios de colecta.

Cuadro A3. Descriptores utilizados para evaluar la distinción, homogeneidad y estabilidad en Aguacate.

Cuadro A4. Caracterización vegetativa: Brotes y hojas jóvenes

Cuadro A5. Caracterización vegetativa: Hoja madura

**Cuadro A1. Datos de pasaporte y descripción de accesiones**

Accesión No.	Nombre científico	Predominancia de la(s) Raza(s) hortícola(s):	Con caracts. adicionales de la(s) Raza(s)	Pedigree	Fecha de Colecta	Tipo de material recibido
037-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16UPN-14	26/05/1995	semilla
056-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16QDR-13	17/09/1996	semilla
061-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16QDR-18	17/09/1996	semilla
064-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16BCN-02	17/09/1996	semilla
066-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		11CLY-01	17/09/1996	semilla
084-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16ZTR-02	28/10/1996	semilla
139-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16TGB-06	29/05/1997	semilla
203-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16TGB-11	13/05/1998	semilla
209-04	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		15VAB-04	20/05/1998	semilla
223-03	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		15MLN-07	21/05/1998	semilla
245-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		20ETL-02	23/06/1998	semilla
277-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		24TZL-19	09/07/1998	semilla
281-03	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		13HTL-12	09/07/1998	semilla
285-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		24TQN-01	09/07/1998	semilla
293-04	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		28MAN-08	10/07/1998	semilla
310-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		21HUA-07	20/07/1998	semilla
316-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		21ZAC-04	20/07/1998	semilla
320-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		21AHN-02	20/07/1998	semilla
321-03	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		21ZPX-01	20/07/1998	semilla
329-04	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		30JLG-01	21/07/1998	semilla
417-01	<i>Persea americana</i> var. <i>americana</i>	Antillana	Mexicana	28CMP-03	13/08/1998	semilla
482-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		07SCB-01	19/03/1999	semilla
493-03	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		16SFA-12	23/05/1999	semilla
517-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		17CTC-02	25/05/1999	semilla
518-03	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		17CTC-03	25/05/1999	semilla
524-02	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		11CMF-21	27/05/1999	semilla
531-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana	Antillana	12MTL-05	14/06/1999	semilla
533-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		21ATX-03	15/06/1999	semilla
582-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana	Antillana	16ZCR-03	31/07/1999	semilla
643-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		15TNG-08	08/05/2000	semilla
668-01	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea schiedeana</i>		07SLU-01	13/05/2000	semilla
700-03	<i>Persea tolimanensis</i>	<i>Persea tolimanensis</i>		07SCB-04	06/07/2001	semilla
713-03	<i>Persea schiedeana</i>	<i>Persea schiedeana</i>		27CAR19	07/07/2001	semilla
744-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		Duke 6	07/10/2002	planta
745-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		Duke 7	07/10/2002	planta
746-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		Thomas	07/10/2002	planta
747-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		Barr-Duke	07/10/2002	planta
748-01	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	Guatemalteca <sup>(1)</sup>	<i>P. schiedeana</i>	G755C	07/10/2002	planta
749-01	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	Guatemalteca <sup>(1)</sup>	<i>P. schiedeana</i>	G755B	07/10/2002	planta
750-01	<i>Persea americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	Guatemalteca <sup>(1)</sup>	<i>P. schiedeana</i>	G755A	07/10/2002	planta
751-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		PI No.3	07/10/2002	planta
752-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		PI-116	07/10/2002	planta
753-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		PR-5	07/10/2002	planta
754-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		PR-1	07/10/2002	planta
755-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		P4	07/10/2002	planta
757-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		P1	07/10/2002	planta
765-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		15XTR-07	07/10/2002	semilla
773-01	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Mexicana		15XTR-08	07/10/2002	semilla

**Cuadro A2. Descriptores de recolección y Caracterización de sitios de colecta.**

No. de Accesión	Clave de sitio	País	Estado	Municipio	Localidad	Fuente de recolección	Tipo de muestra	Estado de la muestra	Clima predominante	Suelos predominantes	Isotermas °C	Isoyetas mm	Asnm m
037-02	16UPN2	México	Michoacán	Uruapan	Uruapan	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo (A) C (m) (w)	Andosoles ócrico y húmico + Acrisol órtico: To + Th + Ao / 2	18 - 19	1500 a 1600	1850- 1950
056-02	16QDR1	México	Michoacán	Queréndaro	Queréndaro	Hábitat silvestre	Semilla	Silvestre	Templado subhúmedo C (w <sub>1</sub> ) (w)	Feozem lúvico + Gleysol vértico + Vertisol pélico: HI + Gv + Vp / 2	17 - 18	600-700	1800- 1900
061-01	16QDR1	México	Michoacán	Queréndaro	Queréndaro	Hábitat silvestre	Semilla	Silvestre	Templado subhúmedo C (w <sub>1</sub> ) (w)	Feozem lúvico + Gleysol vértico + Vertisol pélico: HI + Gv + Vp / 2	17 - 18	600-700	1800- 1900
064-02	16ZNP-M	México	Michoacán	Zinapécuaro	M(San Pedro Bocaneo)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Templado subhúmedo C (w <sub>1</sub> ) (w)	Feozem lúvico + Gleysol vértico + Vertisol pélico: HI + Gv + Vp / 2	17 - 18	600-700	1800- 1900
066-01	11JRC-M	México	Guanajuato	Celaya	M(San Juan de la Vega)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Semiseco semicálido BS <sub>1</sub> h w (w)	Vertisol pélico + Feozem háplico Vp + Hh / 3	19 - 20	550-650	1700- 1800
084-02	16ZTR-M	México	Michoacán	Zitácuaro	M(Zitácuaro)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Templado subhúmedo C (w <sub>1</sub> ) (w)	Andosol húmico + Andosol ócrico: Th + To / 2	17-18	900-1000	1950- 2050
139-01	16PTZ-M	México	Michoacán	Tingambato	M(Tingambato )	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo (A) C (m) (w)	Andosol húmico + Andosol ócrico: Th + To / 2	17-18	1500- 1600	1900- 2000
203-02	16TGB1	México	Michoacán	Tingambato	Tingambato	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo (A) C (m) (w)	Andosol húmico + Andosol ócrico: Th + To / 2	17-18	1500- 1600	1900- 2000
209-04	15VAB2	México	México	Valle de Bravo	Sta. Ma. Pipioltepec	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado subhúmedo C (w <sub>2</sub> ) (w)	Acrisol órtico + Andosol húmico + Vertisol pélico Ao + Th + Vp / 2	18-19	1300- 1400	1800- 1900
223-03	15MLN-M	México	México	Malinalco	M(Malinalco)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido subhúmedo (A) C (w <sub>2</sub> ) (w)	Andosol húmico + Feozem háplico + Vertisol pélico Th + Hh + Vp / 2	19.5-20.5	1200- 1300	1600- 1700
245-01	20ETL1	México	Oaxaca	San Pablo Etlá	San Pablo Etlá	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semiseco semicálido BS <sub>1</sub> h w (w)	Feozem háplico + Luvisol crómico Hh + Lc / 2	20-21	600-700	1600- 1700

277-02	24TZL-M	México	San Luis Potosí	Tamazunchale	M(Teosich)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo y semicálido subhúmedo (A) C (m) y (A) C (w <sub>2</sub> ) (w)	Rendzina + Feozem calcárico E + Hc / 3	25-26	1900-2000	600-800
281-01	13HTL1	México	Hidalgo	Huejutla	San Francisco	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo y Cálido húmedo (A) C (m) y A f (m)	Rendzina + Feozem calcárico + Vertisol pélico E + Hc + Vp / 3	24-25	1900-2000	500-600
285-02	24TQN1	México	San Luis Potosí	San Vicente Tancuayalab	Tanquián	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Cálido subhúmedo A x' (w <sub>1</sub> )	Vertisol pélico + Rendzina + Regosol calcárico Vp + E + Rc 7 3	24-25	1200-1300	50-75
293-04	28MAN1	México	Tamaulipas	Mante	Mante	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Cálido subhúmedo A w <sub>0</sub> (w)	Vertisol pélico + Cambisol cálcico + Regosol calcárico Vp + Bk + Rc / 3	24-25	1000-1100	100-150
310-01	21HUA1	México	Puebla	Huauchinango	Huauchinango	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado húmedo C (f m)	Luvisol crómico + Cambisol crómico y Feozem háplico + Luvisol crómico + Cambisol éutrico Lc + Bc / 3 y Hh + Lc + Be / 2	15-16	2200-2300	1500-1600
316-02	21ZAC1	México	Puebla	Zacatlán	San Miguel	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado húmedo C m (f)	Feozem lúvico + Andosol mólico HI + Tm / 2	14-16	1000-1100	2000-2100
320-02	21AHN1	México	Puebla	Ahuacatlán	Ahuacatlán	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo (A) C m (f)	Regosol éutrico + Litosol + Cambisol éutrico Re + I + Be / 2	18-19	1500-1600	1650-1750
321-03	21ZPX-M	México	Puebla	Zacapoxtla	M(Xalacapán)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Templado húmedo C m (f)	Regosol éutrico + Gleysol éutrico + Feozem háplico Re + Ge + Hh / 1	15-16	1300-1400	2000-2100
329-04	30JLG1	México	Veracruz	Jalacingo	Jalacingo	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado húmedo C (f m)	Feozem háplico + Luviso crómico + Litosol Hh + Lc + I / 2	13-14	1700-1800	1900-2000
417-01	28CMP1	México	Tamaulipas	Cd. Ocampo	Cd. Ocampo	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo (A) C (m) (w)	Vertisol pélico + Regosol éutrico Vp + Re / 3	22.5-23.5	1300-1400	300-400
482-01	07SCB1	México	Chiapas	San Cristobal de las Casas	San Cristobal de las Casas	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado subhúmedo C (w <sub>2</sub> ) (w)	Luvisol cálcico + Luvisol vértico + Litosol Lk + Lv + I / 3	14 - 15	1100 - 1200	2200 - 2300

493-03	16SFA1	México	Michoacán	Zitácuaro	San Felipe de los Alzati	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado subhúmedo C (w <sub>1</sub> ) (w)	Andosol húmico + Andosol ócrico: Th + To / 2	18 a 19	900 a 1000	1800-1900
517-02	17CTC1	México	Morelos	Ocuituco	Ocuituco	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido subhúmedo A (C) w <sub>1</sub> w	Regosol éútrico+Andosol ócrico+Andosol mólico Re + To + Tm / 1	18 - 19	1800 - 1900	1700 - 1800
518-03	17CTC1	México	Morelos	Ocuituco	Ocuituco	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido subhúmedo A (C) w <sub>1</sub> w	Regosol éútrico+Andosol ócrico+Andosol mólico Re + To + Tm / 1	18 - 19	1800 - 1900	1700 - 1800
524-02	11CMF1	México	Guanajuato	Comonfort	Comonfort	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido subhúmedo (A) C (w <sub>0</sub> ) (w)	Vertisol pélico + Feozem háplico Vp + Hh / 3	19-20	600-700	1750-1850
531-01	12MTL1	México	Guerrero	Mochitlán	Mochitlán	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Cálido subhúmedo A w <sub>2</sub> (w)	Rendzina+Luvisol crómico+Litosol E + Lc + I / 2	22 - 23	1200 - 1300	1200 - 1300
533-01	21ATX1	México	Puebla	Atlixco	Atlixco	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Templado subhúmedo C (w <sub>1</sub> ) (w)	Feozem háplico + Andosol ócrico + Regosol éútrico Hh + To + Re / 1	17-18	800-900	1800-1900
582-01	16ZCR1	México	Michoacán	Ziracuaretiro	Ziracuaretiro	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido húmedo (A) C (m) (w)	Andosol órtico + Acrisol órtico + Luvisol crómico To + Ao + Lc / 2	19-20	1300-1400	1350-1450
643-01	15TNG1	México	México	Tenancingo	Tenancingo	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Teplado subhúmedo C (w <sub>2</sub> ) (w)	Andosol húmico+Feozem háplico+Vertisol pélico Th + Hh + Vp / 2	17 - 18	1200 - 1300	1800 - 1900
668-01	07SLU-M	México	Chiapas	Acala	M(San Lucas)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo					
700-03	07SCB-M	México	Chiapas	San Cristóbal de las Casas	M(Desconocido)	Mercado	Semilla	Cultivar nativo	Teplado subhúmedo C (w <sub>2</sub> ) (w)	Andosol húmico+Feozem háplico+Vertisol pélico Th + Hh + Vp / 2	17 - 18	1200 - 1300	1800 - 1900
713-03	27CAR1	México	Tabasco	Cárdenas	Cárdenas	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Cálido húmedo A m (f)	Vertisol pélico + Gleysol vértico + Acrisol órtico Vp + Gv + Ao / 3	26-27	2000-2100	0-50
744-01	CP_01		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
745-01	CP_02		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

746-01	CP_03		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
747-01	CP_04		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
748-01	CP_05		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
749-01	CP_06		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
750-01	CP_07		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
751-01	CP_08	México	México	Montecillos	Colegio de Postgraduados	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
752-01	CP_09	México	México	Montecillos	Colegio de Postgraduados	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
753-01	CP_10	México	México	Montecillos	Colegio de Postgraduados	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
754-01	CP_11	México	México	Montecillos	Colegio de Postgraduados	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
755-01	CP_12	México	México	Montecillos	Colegio de Postgraduados	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
757-01	CP_13	México	México	Montecillos	Colegio de Postgraduados	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
765-01	15XTR1	México	México	Ixtapan del oro	Ixtapan del oro	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido subhúmedo (A) C (w <sub>1</sub> ) (w)	Acrisol órtico + Litosol + Andosol húmico: Ao + I + Th / 2	18 a 20	1000 a 1200	1680-1710
773-01	15XTR1	México	México	Ixtapan del oro	Ixtapan del oro	Huerto de traspatio	Semilla	Cultivar nativo	Semicálido subhúmedo (A) C (w <sub>1</sub> ) (w)	Acrisol órtico + Litosol + Andosol húmico: Ao + I + Th / 2	18 a 20	1000 a 1200	1680-1710
746-01	CP_03		California	Riverside CA	U.C.R.	Inst. de investigación	planta	Selección	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Cuadro A3. Descriptores utilizados para evaluar la distinción, homogeneidad y estabilidad en Aguacate.**

Descriptor	Estado del descriptor	Tipo de variable
<b>I. Brotación vegetativa</b>		
1 Brotes jóvenes: color	amarillo, verde, rojo	Nominal
2 Brotes jóvenes: Coloración por antocianinas	ausente, presente	Binaria simétrica
3 Brotes jóvenes: Color de las lenticelas	amarillo, verde, rojo, púrpura	Nominal
4 Brotes jóvenes: floración	ausente, presente	Binaria simétrica
5 Hojas jóvenes: Coloración por antocianinas	ausente, presente	Binaria simétrica
6 Hojas jóvenes: Coloración de la pubescencia del pecíolo	blanca, amarilla, café, café rojizo	Nominal
<b>II. Desarrollo vegetativo (Hoja madura)</b>		
7 Pliegues de la hoja	plano o ligeramente cóncavo, cóncavo, plegado asimétricamente, retorcido	Nominal
8 Forma de la hoja	ovada, obovada angosta, obovada, oval, redondeada, cordiforme, lanceolada, oblonga, oblonga-lanceolada, otra	Nominal
9 Forma de la base de la hoja	aguda, obtusa, truncada	Nominal
10 Longitud de la lámina foliar	medida en cm	Intervalo
11 Pubescencia de la superficie inferior	escasa, intermedia, densa	Ordinal
12 Pubescencia de la superficie superior	escasa, intermedia, densa	Ordinal
13 Color de la hoja madura	verde claro, verde, verde oscuro	Ordinal
14 Acanaladura del pecíolo	ausente, presente	Binaria simétrica
15 Ángulo de inserción del pecíolo	agudo, obtuso	Binaria simétrica
16 Porte de la hoja	erecto, horizontal, caído	Ordinal
17 Ondulación del margen de la hoja	ausente ó muy débil, débil, medio, fuerte, muy fuerte	Ordinal
18 Número de venas primarias	número	Intervalo
19 Relieve de la venación del haz	sumida, intermedia, alzada	Ordinal
20 Divergencia de las venas primarias respecto a la principal (°)	medida en grados	Intervalo
21 Forma del ápice de la hoja	muy agudo, agudo, intermedio, obtuso, muy obtuso	Ordinal
22 Textura de la hoja	blanda, semidura, dura, muy dura	Ordinal
23 Olor a anís	ausente, ligero. Medio, fuerte	Ordinal

.....continúa Cuadro A3

<b>III. Floración</b>			
24	Inflorescencia: Longitud de la axila*	medida en cm	Intervalo
25	Inflorescencia: Color de las lenticelas	verde, rojo	Nominal
26	Inflorescencia: Tipo de floración	tipo A, tipo B	Binaria simétrica
27	Duración del período de floración**	medido en semanas	Intervalo
28	Flor: Pubescencia del sépalo	ausente, presente	Binaria simétrica
29	Flor: densidad de la pubescencia del sépalo	ausente, presente	Binaria simétrica
30	Flor: tallos con nectarios	escasa, intermedia, densa	Ordinal
31	Flor: Estilo	recto, retorcido	Nominal
32	Flor: Pólen	ausente, presente	Binaria simétrica
<b>IV. Fruto maduro (fisiológicamente)</b>			
33	Tamaño de fruto	pequeño, medio, largo	Ordinal
34	Forma de la parte basal	ampliamente redondeado, redondeado, oblongo, puntiagudo, abotellado	Nominal
35	Longitud del fruto	medida en cm	Intervalo
36	Diámetro (dos medidas en cruz)	medida en cm	Intervalo
37	Relación, longitud/diámetro mayor	proporción	Intervalo
38	Cavidad del pedicelo	ausente, presente	Binaria simétrica
39	Forma de la región estilar	profundamente hundido, ligeramente hundido, plano, redondeado, puntiagudo	Nominal
40	Restos de la superficie estigmática	deprimido, prominente	Nominal
41	Tamaño de las lenticelas	pequeño, medio, grande	Ordinal
42	Color de las lenticelas	verde claro, amarillo, café, rojo	Nominal
43	Conspicuidad de las lenticelas	inconspicuo, conspicuo	Binaria simétrica
44	Distribución de las lenticelas	separadas, agrupadas	Binaria simétrica
45	Lustre	débil, medio, fuerte	Ordinal
46	Relieve de la superficie	muy lisa, lisa, media, rugosa, muy rugosa	Ordinal
47	Persistencia del perianto	débil, media, fuerte	Ordinal
48	Ancho de la cavidad del pedicelo	estrecha, media, amplia	Ordinal
49	Posición del pedicelo	a lo largo de la axila, oblicuo	Binaria simétrica
50	Peso de fruto (promedio)	medido en gramos	Intervalo



.....continúa Cuadro A3

<b>V. Pedicelo</b>			
51	Longitud	medida en mm	Intervalo
52	Conspicuidad de la unión al pedúnculo	inconspicuo, conspicuo	Binaria simétrica
53	Diámetro comparado con el pedúnculo	el mismo, mas grande	Binaria simétrica
54	Forma	cilíndrica, cónica	Binaria simétrica
55	En forma de cabeza de clavo	ausente, presente	Binaria simétrica
56	Color	amarillo, amarillo-verdoso, verde, rojizo	Nominal
57	Superficie	lisa, rugosa	Binaria simétrica
<b>VI. Fruto madurado (listo para consumir)</b>			
58	Color de la piel	verde oscuro, verde, amarillo-verdoso, rojo, púrpura, púrpura-negro	Nominal
59	Espesor de la piel	muy delgada, delgada, media, gruesa, muy gruesa	Ordinal
60	Textura de la piel	membranosa, correosa, corchosa	Nominal
61	Adherencia de la piel a la pulpa	débil, media, fuerte	Ordinal
62	Color principal de la pulpa	blanquecino, verde pálido, crema, amarillo	Nominal
63	Color de la pulpa cercana a la piel	verde pálido, verde, amarillo-verdoso	Nominal
64	Ancho de la capa coloreada de pulpa cercana a la piel	estrecha, media, amplia	Ordinal
65	Conspicuidad de las fibras en la pulpa	inconspicuo, conspicuo	Binaria simétrica
66	Textura de la pulpa	suave, granulosa	Binaria simétrica
67	Firmeza de la pulpa	débil, media, fuerte	Ordinal
68	Aroma de anís de la pulpa	ausente, presente	Binaria simétrica
69	Ubicación de la semilla en la cavidad	libre, apretada	Binaria simétrica
<b>VII. Semilla</b>			
70	Tamaño comparado con el fruto	pequeño, mediano, grande	Ordinal
71	Forma de la sección longitudinal	elíptica, ovada, circular, achatada, base achatada con ápice redondeado, base achatada con ápice cónico	Nominal
72	Forma de la sección transversal	circular, elíptica	Binaria simétrica
73	Poliembrionía	ausente, presente	Binaria simétrica
74	Cubierta de la semilla: adherencia	al embrión, a la pulpa, a ninguno	Nominal
75	Superficie	lisa, ligeramente rugosa, rugosa	Ordinal
76	Peso de semilla (promedio)	medido en gramos	Intervalo
77	Relación peso de semilla/peso de fruto	proporción	Intervalo

**Cuadro A4. Caracterización vegetativa: Brotes y hojas jóvenes**

No. de Accesión	BROTOS JOVENES				HOJAS JOVENES	
	Color	Colorn. por antocianinas	Color lenticelas	Floración	Colorn. por antocianinas	Colorn. pubescencia pecíolo
037-02	verde	ausente	marrón	ausente	presente	café rojizo
056-02	verde	ausente	verde	ausente	presente	café
061-01	verde	presente	rojo	ausente	presente	café
064-02	verde	ausente	verde	ausente	presente	café rojizo
066-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café
084-02	verde	ausente	marrón	ausente	ausente	blanca
139-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	blanca
203-02	.....planta de vivero...					
209-04	.....planta de vivero...					
223-03	.....planta de vivero...					
245-01	.....planta de vivero...					
277-02	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café rojizo
281-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café rojizo
285-02	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café
293-04	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café rojizo
310-01	.....planta de vivero...					
316-02	.....planta de vivero...					
320-02	.....planta de vivero...					
321-03	.....planta de vivero...					
329-04	.....planta de vivero...					
417-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	blanca
482-01	.....planta de vivero...					
493-03	.....planta de vivero...					
517-02	.....planta de vivero...					
518-03	.....planta de vivero...					
524-02	.....planta de vivero...					
531-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café
533-01	.....planta de vivero...					
582-01	.....planta de vivero...					
643-01	.....planta de vivero...					
668-01	.....planta de vivero...					
700-03	.....planta de vivero...					
713-03	.....planta de vivero...					
744-01	amarillo	ausente	rojo	ausente	presente	café rojizo
745-01	verde	ausente	rojo	ausente	presente	blanca
746-01	rojo	presente	rojo	ausente	presente	blanca
747-01	rojo	presente	rojo	ausente	presente	blanca
748-01	verde	ausente	verde	ausente	presente	blanca
749-01	verde	ausente	verde	ausente	presente	blanca
750-01	verde	ausente	verde	ausente	presente	blanca
751-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café rojizo
752-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	café rojizo
753-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	blanca
754-01	verde	ausente	verde	ausente	presente	blanca
755-01	verde	ausente	verde	ausente	presente	blanca
757-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	blanca
765-01	verde	ausente	verde	ausente	ausente	blanca
773-01	verde	ausente	rojo	ausente	ausente	café rojizo

**Cuadro A5. Caracterización vegetativa: Hoja madura**

No. de Accesión	Pliegues hoja	Forma de la hoja	Forma de la base de la hoja	Long. Lámina foliar	Pubescencia sup. inferior	Pubescencia sup. superior	Color hoja madura	Acanaladura peciolo	Angulo inserción peciolo	Porte de la hoja	Ondulación márgen de la hoja	Número venas primarias	Relieve venación haz	Divergencia venas primarias (°)	Apice de la hoja	Textura	Olor a anís
037-02	plano ó lig. Conc	oblonga lanceolada	aguda	18.3	densa	escasa	verde oscuro	incompleta	agudo	erecto	débil	8	sumida	52	agudo	semidura	medio
056-02	cóncavo	lanceolada	aguda	13.8	intermedia	escasa	verde oscuro	incompleta	obtuso	caído	muy fuerte	8	alzada	39	agudo	dura	medio
061-01	cóncavo	oblonga lanceolada	aguda	17.6	intermedia	escasa	verde oscuro	incompleta	agudo	erecto	débil	10	sumida	41	intermedio	semidura	fuerte
064-02	plano ó lig. Conc	lanceolada	aguda	16.3	escasa	densa	verde	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	9	sumida	39	agudo	dura	fuerte
066-01	plano ó lig. Conc	oblonga lanceolada	aguda	17.9	densa	escasa	verde oscuro	incompleta	agudo	horizontal	medio	10	sumida	44	intermedio	muy dura	fuerte
084-02	cóncavo	oval	aguda	17.9	intermedia	escasa	verde oscuro	incompleta	agudo	horizontal	fuerte	9	sumida	37	intermedio	dura	medio
139-01	plano ó lig. Conc	oblonga lanceolada	aguda	17.3	intermedia	escasa	verde oscuro	incompleta	agudo	erecto	débil	8	sumida	38	intermedio	dura	fuerte
203-02	planta de vivero																
209-04	planta de vivero																
223-03	planta de vivero																
245-01	planta de vivero																
277-02	cóncavo	lanceolada	aguda	13.1	intermedia	escasa	verde	completa	agudo	horizontal	medio	7	sumida	38	muy agudo	blanda	ligero
281-01	cóncavo	lanceolada	aguda	13.7	intermedia	escasa	verde	completa	agudo	erecto	muy fuerte	7	sumida	37	agudo	blanda	ligero
285-02	cóncavo	lanceolada	aguda	16.5	intermedia	escasa	verde oscuro	incompleta	obtuso	caído	medio	9	sumida	38	agudo	blanda	ausente
293-04	cóncavo	lanceolada	aguda	14.2	intermedia	escasa	verde oscuro	incompleta	agudo	horizontal	muy fuerte	8	sumida	34	agudo	blanda	ausente
310-01	planta de vivero																
316-02	planta de vivero																
320-02	planta de vivero																
321-03	planta de vivero																
329-04	planta de vivero																
417-01	cóncavo	oblonga lanceolada	aguda	19.0	intermedia	escasa	verde	completa	agudo	horizontal	fuerte	9	sumida	36	agudo	dura	ligero
482-01	planta de vivero																
493-03	planta de vivero																
517-02	planta de vivero																
518-03	planta de vivero																
524-02	planta de vivero																
531-01	cóncavo	cordiforme	obtusa	11.4	densa	escasa	verde oscuro	completa	obtuso	caído	muy fuerte	8	sumida	32	agudo	semidura	ausente
533-01	planta de vivero																
582-01	planta de vivero																
643-01	planta de vivero																
668-01	planta de vivero																
700-03	planta de vivero																
713-03	planta de vivero																
744-01	cóncavo	lanceolada	aguda	14.0	densa	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	8	sumida	32	muy agudo	dura	ligero
745-01	cóncavo	lanceolada	aguda	14.8	intermedia	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	8	sumida	36	agudo	semidura	ligero
746-01	plano o lig. cóncavo	lanceolada	aguda	11.9	densa	escasa	verde	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	7	sumida	39	muy agudo	dura	medio
747-01	cóncavo	lanceolada	aguda	14.1	densa	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	débil	8	sumida	32	muy agudo	muy dura	medio
748-01	cóncavo	lanceolada	aguda	15.1	densa	escasa	verde	incompleta	agudo	erecto	débil	9	sumida	37	agudo	dura	ausente
749-01	cóncavo	lanceolada	aguda	15.8	densa	escasa	verde	incompleta	agudo	erecto	débil	9	sumida	38	agudo	dura	ausente
750-01	cóncavo	oval	aguda	14.9	densa	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	medio	9	sumida	38	agudo	dura	ausente
751-01	convexo	oval	aguda	12.7	intermedia	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	9	sumida	45	intermedio	semidura	ligero
752-01	plano o lig. cóncavo	lanceolada	aguda	15.6	densa	escasa	verde	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	8	sumida	36	intermedio	dura	medio
753-01	plano o lig. cóncavo	lanceolada	aguda	14.8	intermedia	escasa	verde	incompleta	agudo	caído	débil	7	sumida	39	intermedio	semidura	medio
754-01	plano o lig. cóncavo	oblonga lanceolada	aguda	17.5	intermedia	escasa	verde	completa	agudo	horizontal	débil	9	sumida	35	intermedio	dura	medio
755-01	convexo	obovada angosta	aguda	18.3	intermedia	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	caído	débil	9	sumida	35	intermedio	muy dura	medio
757-01	convexo	obovada angosta	aguda	16.9	intermedia	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	débil	8	sumida	29	intermedio	dura	medio
765-01	plano o lig. cóncavo	lanceolada	aguda	17.6	intermedia	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	ausente o muy débil	9	sumida	41	agudo	semidura	medio
773-01	plano o lig. cóncavo	lanceolada	aguda	16.2	intermedia	escasa	verde osc.	incompleta	agudo	erecto	débil	8	sumida	38	muy agudo	semidura	ligero