

APLICACIÓN DE BIOTECNOLOGIAS AL MEJORAMIENTO DEL AGUACATERO EN CUBA

O. Coto.¹, J.L. Fuentes.², M. Machado¹, A. Alvarez², N.N. Rodríguez¹, L. Santiago², I. M. Ramírez², Y. Valdés², C. Collazo¹, M. Vernhe², M. Ramos Leal³, M. Guerra², S. Altanez², E.F. Prieto², B. Velázquez¹, J.A. Rodríguez¹, V.R. Fuentes¹, J. Cueto¹, D.G. Sourd¹, D. Becker⁴, W. Rohde⁴, G. Boland⁵, A. Stechyshyn-Nagasawa⁵, M.A. Renaud⁶, A. Martínez¹ y R. Jiménez⁷.

¹ Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT). 7^{ma} e/ 30 y 32, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba, Código Postal 11300. orlandocoto@inica.edu.cu, mejoramiento@iift.cu

² Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). 5^{ta} y 30, # 502, Miramar, Playa, Ciudad Habana, Cuba.

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

⁴ Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ). 50829 Köln, Alemania.

⁵ Departamento de Biología Ambiental, Universidad de Guelph, Canadá

⁶ División de Laboratorios de Servicios de la Universidad de Guelph, Canadá

*Dirección actual: Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Ciudad Universitaria, Carrera 27-Calle 9, Bucaramanga, Colombia

⁷ Unidad Científica Tecnológica de Base de Alquízar. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Carretera de Güira – Pestana Km. 2 ½. Alquízar La Habana Cuba. E mail: karygutda@yahoo.es y colaboración@iift.cu

El presente trabajo resume los avances obtenidos mediante el empleo de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento del aguacatero en Cuba para la resistencia a la pudrición de la raíz y la salinidad. Se realizó un análisis de la diversidad entre 22 variedades de aguacatero cultivadas en Cuba y un portainjerto utilizando 12 combinaciones de cebadores de AFLP y 16 de microsatélites (SSR). Los resultados indicaron que ambos marcadores resultan eficientes para: *i*) detectar polimorfismo, *ii*) identificar cultivares y *iii*) confirmar la clasificación ecológica y/o botánica. Se construyó una colección de cepas de *Phytophthora* spp. y *Phyitium* spp., aisladas de plantaciones comerciales. Se utilizaron caracteres morfológicos y fisiológicos para la identificación y caracterización de los aislados. La caracterización morfológica y fisiológica permitió diferenciar cepas de *Phytophthora* spp. y *Phyitium* spp., confirmando la utilidad del enfoque combinado para la identificación de aislados de hongos. Se ejecutan bioensayos conductimétricos para conocer las cepas más efectivas de *P. cinnamomi* para el empleo de filtrados tóxicos en la selección *in vitro* de embriones cigóticos del portainjerto “Duke 7”. A pesar de no detectarse diferencias con respecto a la especificidad de la cepa utilizada luego de retar los embriones con el extracto crudo, si se evidenció una respuesta diferencial del genotipo en relación con las cepas utilizadas para producir reacción en tejido foliar. Se proponen índices de supervivencia a la radiación γ y a salinidad, combinados con el cultivo de embriones cigóticos para el mejoramiento de la tolerancia a la salinidad en aguacatero.

Palabras claves: marcadores, diversidad, pudrición, salinidad, mutación, selección

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGIES TO AVOCADO BREEDING IN CUBA

O. Coto¹, J.L. Fuentes^{2*}, M. Machado¹, A. Alvarez², N.N. Rodríguez¹, L. Santiago², I. M. Ramírez², Y. Valdés², C. Collazo¹, M. Vernhe², M. Ramos Leal³, M. Guerra², S. Altanez², E.F. Prieto², B. Velázquez¹, J.A. Rodríguez¹, V.R. Fuentes¹, J. Cueto¹, D.G. Sourd¹, D. Becker⁴, W. Rohde⁴, G. Boland⁵, A. Stechyshyn-Nagasawa⁵, M.A. Renaud⁶, A. Martínez¹ and R. Jiménez⁷.

¹ Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT). 7^{ma} e/ 30 y 32, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba, Código Postal 11300. orlandocoto@inica.edu.cu, mejoramiento@iift.cu

² Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). 5^{ta} y 30, # 502, Miramar, Playa, Ciudad Habana, Cuba.

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

⁴ Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ). 50829 Köln, Alemania.

⁵ Departamento de Biología Ambiental, Universidad de Guelph, Canadá

⁶ División de Laboratorios de Servicios de la Universidad de Guelph, Canadá

*Dirección actual: Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Ciudad Universitaria, Carrera 27-Calle 9, Bucaramanga, Colombia

⁷ Unidad Científica Tecnológica de Base de Alquízar. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Carretera de Güira – Pestana Km. 2 ½. Alquízar La Habana Cuba. E mail: karygutda@yahoo.es y colaboración@iift.cu

The present work shows recent advances obtained with the use of biotechnological techniques for breeding avocado in Cuba for their resistance to root-rot and tolerance to salinity. A genetic diversity analysis was undertaken among 22 avocado varieties cultivated in Cuba and a rootstock based on 12 and 16 primers combinations of AFLP and SSR respectively. Results indicated that both molecular markers were efficient in: *i*) detecting polymorphism, *ii*) identifying cultivars and *iii*) confirming the ecological and/or botanical classification. A collection of *Phytophthora* spp. and *Phytium* spp. strains isolated from commercial plantation was made. Morphological and physiological characters were used for the identification and characterization of those isolated. The results obtained permitted distinguishing *Phytophthora* spp. and *Phytium* spp. strains, confirming the usefulness of this combined approach for the identification of fungal isolates. Conductimetric bioassays are conducted to find more effective strains of *P. cinnamomi* for the use of fungal toxic filtrates in *in vitro* selection of zygotic embryos of “Duke 7” rootstock. Although no differences have been detected with respect to the specificity of the strain studied after treating zygotic embryos with the raw extract, a differential response from the genotype regarding strains used to produce a reaction in the leaf tissue was noticed. Survival rates against γ -rays and saline conditions, combined with zygotic embryo culture were proposed for the improved tolerance to salinity in avocado trees.

Agradecimientos: La Organización Internacional de la Energía Atómica (contrato de investigación No. 11671/R0-R1), el Buró Internacional del DAAD de Bonn en Alemania y el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba (proyectos PRN/2-3/1/2002, PNCT 300260), financiaron estos resultados.

1. Introducción

El aguacatero constituye un frutal importante el cual ha sido incorporado como alimento en la dieta de muchos países del mundo. Enfermedades como la pudrición de la raíz, causada por *Phytophthora cinnamomi* y estrés abióticos como la salinidad y la sequía, han limitado su producción intensiva (Kremer-Kohne y Duvenhage, 2000; Kremer-Kohne *et al.*, 2001).

El mejoramiento genético del aguacatero por hibridación convencional es difícil y el extenso período juvenil y las grandes extensiones necesarias para el crecimiento de los árboles encarecen los programas de mejoramiento.

En Cuba, el incremento de los rendimientos a partir de la selección de variedades con un aumento de la resistencia a la pudrición de la raíz, la salinidad y genotipos de menor talla constituyen objetivos priorizados del programa de mejoramiento genético de este cultivo (Rodríguez *et al.*, 1997).

Los marcadores moleculares pueden asistir a los esfuerzos del mejoramiento tradicional como herramientas valiosas en las análisis de las relaciones genéticas, la identificación y selección de genotipos de interés, la conservación del germoplasma y la identificación taxonómica de patógenos.

Entre los marcadores moleculares disponibles para el análisis de los recursos genéticos son los microsatelites (SSR) y los AFLP los que atraen la mayor atención (Ridout y Donini, 1999; Rafalski, 2002). Un grupo de marcadores microsatelites ya fue reportado en aguacatero (Sharon *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 2004)

A partir de los antecedentes anteriores los objetivos del presente trabajo fueron:

- Conocer la diversidad genética mediante marcadores moleculares (AFLP, SSR) de los cultivares comerciales de aguacatero mas utilizados en Cuba.
- Establecer un banco de aislados de *Phytophthora* spp. colectados en distintas regiones del país e iniciar su caracterización morfológica, fisiológica y molecular.
- Construir las curvas de radiosensibilidad y de dosis respuesta de embriones cigóticos de aguacatero a diferentes concentraciones de sal para futuros trabajos de mejoramiento por mutaciones.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diversidad genética mediante marcadores moleculares (AFLP y SSR)

Material Vegetal

Se utilizaron 22 cultivares de aguacatero (Tabla 1) de la colección para fines de mejoramiento en Cuba, caracterizada botánicamente (Rodríguez *et al.*, 2003).

2.1.1. Aislamiento del ADN y análisis moleculares

Se utilizó el protocolo del CTAB propuesto por Doyle y Doyle (1990) y modificado por Ramírez *et al.* (2004).

Para el análisis de AFLP se utilizó el juego comercial de cebadores AFLPTm del Sistema I (GIBCO BRL, Life Technologies), con *EcoRI* y *MseI* como enzimas de restricción y 12 combinaciones de cebadores (E-AAC x M-AAA, E-AAC x M-AAC, E-AAC x M-AAT, E-AAC x M-ACC, E-AAC x M-ACT, E-AAC x M-AGA, E-AAC x M-ATC, E-AAC x M-ATG, E-AAC x M-ATT, EAAC x M-CAA, E-AAG x M-ACC, E-AAG x M-AGT).

Para el análisis de SSR se emplearon 16 combinaciones de cebadores reportados por Sharon *et al.*(1997).

En ambos casos se utilizó marcaje radioactivo (^{33}P), las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 6% en tampón TBE 1X pH 8 a 40 V/cm a 45°C.

2.1.2. Análisis de los datos

Las bandas AFLP consistentes, reproducibles y polimórficas fueron evaluadas para presencia (1) o ausencia (0). Debido a la naturaleza codominante de los marcadores microsatélites, estos se evaluaron como genotipos homocigóticos y heterocigóticos. Para el estudio de diversidad genética se utilizaron las matrices binarias para construir matrices de distancia entre todos los pares de genotipos con el coeficiente de Dice (Dice, 1945). Para generar los dendrogramas se empleó el método basado en las medias aritméticas no ponderadas (Un-Weighted Pair Group Arithmetic Mean Analysis, UPGMA), cálculos realizados empleando el programa NTSys-pc.

2.2. Establecimiento de un banco de aislados de *Phytophthora* spp.

Se colectaron muestras de suelo en plantaciones de aguacatero entre 10 y 20 años de edad, en ocho localidades del país. Los hongos se aislaron a partir de muestras de suelo en medio semiselectivo PARP (Jeffers y Martin, 1986), se utilizó el método de la dilución en placas (Graham y Menge, 1999), los aislados fueron mantenidos en medio papa dextrosa agar (Potato Dextrose Agar, PDA) y subcultivados regularmente en presencia de antibióticos.

Tabla 1. Cultivares de aguacatero estudiados, grupo dicogámico y horticultural.

No	Cultivar	Grupo Dicogámico	Raza Horticultural
1	Centro America No. 3	A	Guatemalteco
2	Itzamná	B	Guatemalteco
3	Lula	A	Guatemalteco x Antillano
4	Jaruco No 1	B	Guatemalteco x Antillano
5	Sicilia No 6	A	Antillano
6	Jose Antonio	A	Antillano

7	Casimiro	B	Antillano
8	Amado Gómez	A	Antillano
9	Chavao No 3	B	Antillano
10	Catalina	A	Antillano
11	CH-1 No 3	B	Guatemalteco x Antillano
12	Choquette	A	Guatemalteco x Antillano
13	Monroe Estación	B	Guatemalteco x Antillano
14	California	B	Guatemalteco
15	Suardia Estación	B	Guatemalteco
16	Hass	A	Guatemalteco x Mexicano
17	Duke	A	Mexicano
18	Cueto	B	Antillano
19	Miguel	B	Guatemalteco
20	Los Moros	B	Antillano
21	Gato	B	Antillano
22	Buena Esperanza	B	Antillano

2.2.1. Caracterización mediante marcadores morfológicos

Se realiza de acuerdo a claves taxonómicas propuestas (Waterhouse, 1963): tipo de esporangio, su abundancia en medio sólido, su naturaleza no caducea y sus dimensiones (largo y ancho), los esporangioforos, las hifas protuberantes, la presencia o no de clamidosporas y otras características como la producción de oogonias y oosporas en medios simples y la abundancia o ausencia de los últimos en tejidos o en cultivos.

2.2.2. Caracterización mediante marcadores fisiológicos

Se determinan las temperaturas máximas de crecimiento de los hongos en medio agar malta y agar zanahoria. Se emplearon dos placas en cada cepa, una para cada medio de cultivo, incubadas a dos temperaturas (28 °C y 39 °C).

2.2.3. Aislamiento del ADN y análisis moleculares de los aislados

El aislamiento de los ADN totales se realizó de acuerdo con Innis *et al.*, (1990) y reportado como de utilidad para este tipo de hongos por Ristaino *et al.* (1998).

2.2.4. Amplificación mediante cebadores del espaciador interno transcrito (ITS)

Se emplean los cebadores ITS 5 e ITS 4 (White *et al.*, 1990), el programa y las condiciones de amplificación, las recomendadas por Ristaino *et al.*, (1998).

2.3. Creación de líneas mutantes de aguacatero

Se tomaron embriones cigóticos maduros *in vitro* de "Duke-7" y "Hass", se irradiaron en un rango de dosis entre 15 y 50 Gy a 35°C y a una frecuencia de 38-46 Gy/min. Luego de irradiados los embriones fueron transferidos a medio de cultivo fresco. Se utilizó como criterio de sensibilidad a la radiación el porcentaje de inducción de brotes completos, calculado para cada tratamiento (dosis de

radiación) como la relación entre los brotes enteros inducidos/total de número de embriones. Se desarrollaron tres experimentos independientes con un mínimo de 40 embriones por cada tratamiento. Los datos de supervivencia de los embriones fueron analizados mediante un análisis polinomial ajustado utilizando el programa Origin-PC.

2.3.1. Selección *in vitro* para condiciones de salinidad

Se colocaron embriones cigóticos de "Duke-7" en 5 ml de medio MS suplementado con 100 mg/L de *D*-inositol, 30000 mg/L de sacarosa, 1g/L de carbón activado, pH 5.7 ± 0.1 ; y cinco concentraciones diferentes de NaCl entre 25 y 250 mM. Se utilizó como criterio de sensibilidad a la salinidad la inducción de brotes completos luego de ocho semanas y se evaluaron 25 embriones por tratamiento. Los datos de supervivencia de los embriones fueron analizados mediante un ajuste polinomial utilizando el paquete de programas Origin-PC.

3. Resultados y Discusión

3.1. Diversidad genética mediante marcadores moleculares (AFLP y SSR)

Todas las combinaciones de cebadores de AFLP y SSR utilizadas proporcionaron marcadores polimórficos, detectándose 143 y 130 bandas con un promedio por combinación de 11.9 y 8.1 respectivamente. La combinación AM8 de AFLP discriminó el 75% de las accesiones.

El dendrograma construido para los AFLP mostró tres grupos (A1, A2 y A3) (Fig. 1A). Tres genotipos, "Chavao No. 3", "Jose Antonio" y "Duke-7", se ubicaron independientemente, con "Duke-7" como el cultivar más distante. El grupo A1 contiene los cultivares Antillanos y los híbridos "Dario" y "CH1 No. 3". Este grupo A1 se corresponde con el grupo horticultural H1 de acuerdo con Ramírez *et al.* (2005) en base a la distancia fenotípica. En contraste, cultivares introducidos desde Centroamérica y Estados Unidos mostraron características típicas del grupo Guatemalteco subdividido en los grupos A2 y A3 que incluyen además a los restantes cultivares híbridos.

Las SSRs polimórficas detectaron cinco grupos con un mayor grado de diversidad genética en comparación con los AFLP (Fig. 1B). El grupo M1 con los cultivares antillanos (WI) y al híbrido "Dario", corresponde con el grupo horticultural H1 (Ramírez *et al.*, 2005) y A1 basado en marcadores AFLP. Los cultivares del grupo horticultural H2 se distribuyen entre M2, M3, M4 y M5. Los cultivares "Hass" y "Duke-7" se ubican en M5 confirmando la presencia de genes de cultivares mexicanos en "Hass" (Clegg *et al.*, 1999).

Los resultados, no obstante demuestran la necesidad de ampliar la composición en cuanto a grupos horticulturales del germoplasma cubano. La mayoría de los materiales introducidos pertenecen al ecotipo Antillano que se adapta específicamente al clima húmedo tropical prevaleciente en Cuba.

3.2. Establecimiento de un banco de aislados de *Phytophthora* spp.

Se han aislado 56 muestras de hongos de las cuales 50 se han clasificado como posibles *Phytophthora* spp. y algunas de ellas como posibles *P. cinnamomi* en base al tipo de esporangios, la presencia de clamidosporas, los órganos sexuales, las temperaturas de crecimiento y el hábito de crecimiento en medios de cultivo específicos.

3.2.1. Caracterización mediante marcadores morfológicos

P. cinnamomi es una de las especies que mejor se identifica basado en el crecimiento de su micelio en forma coraloide, abundantes hifas en forma de protuberancias, vesículas lanosas, y protuberancias laterales, producidas aisladas o en forma de grupos, características observadas en algunas de las cepas obtenidas. Se observaron esporangios no papilados en algunos aislados, característica típica de *P. cinnamomi* (Ho, 1992; Ho *et. al.* (1995).

3.2.2. Caracterización mediante marcadores fisiológicos

Varias cepas aisladas fueron capaces de crecer sin dificultad a temperaturas superiores a los 35°C, características que no se corresponden con cepas de *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro, 1996). Otras cepas como IIFT-105, mostraron crecieron entre 28-35°C, apuntando a posibles aislados *P. cinnamomi*.

3.2.3. Caracterización mediante marcadores moleculares

La amplificación utilizando los cebadores ITS mostró la presencia de dos productos de amplificación (Figura 2), que permite diferenciar aislados semejantes a *Pythium* (IIFT068, IIFT073, IIFT081) de aquellos similares a *Phytophthora* spp. Aislados clasificados como *Phytophthora* spp. muestran un único producto de amplificación de aproximadamente 900 pares de base (pb), mientras que aislados de *Pythium* muestran también un solo producto de amplificación de talla ligeramente superior (Ristaino *et al.*, 1998).

3.3. Creación de líneas mutantes de aguacatero

La inhibición del crecimiento de brotes completos dependió de la dosis de radiación utilizada: $Ln(x) = a + b_1x + b_2x^2$, donde $Ln(x)$ es el logaritmo de la fracción de brotes completos, x es la dosis de radiación; y a , b_1 y b_2 son los parámetros de la ecuación (Tabla 3).

El ajuste de los datos experimentales al modelo teórico fue igual a 0.95 y 0.96 para las curvas de radiosensibilidad de "Duke-7" y "Hass" respectivamente. Los valores de dosis letal media (DL_{50}), fueron de 28 y 27 Gy para "Duke-7" y "Hass", respectivamente. Valores menores a la DL_{50} no resultaron tóxicos y no cambiaron significativamente el comportamiento *in vitro* (Tabla 4).

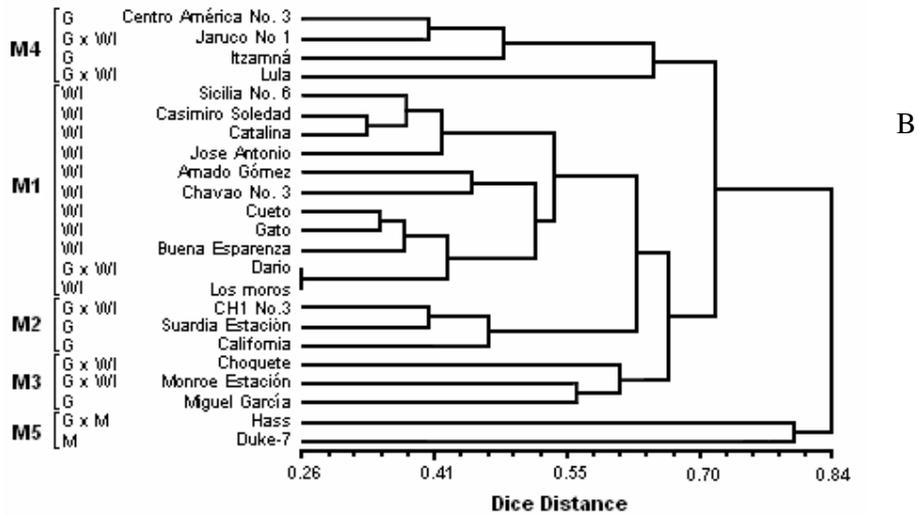
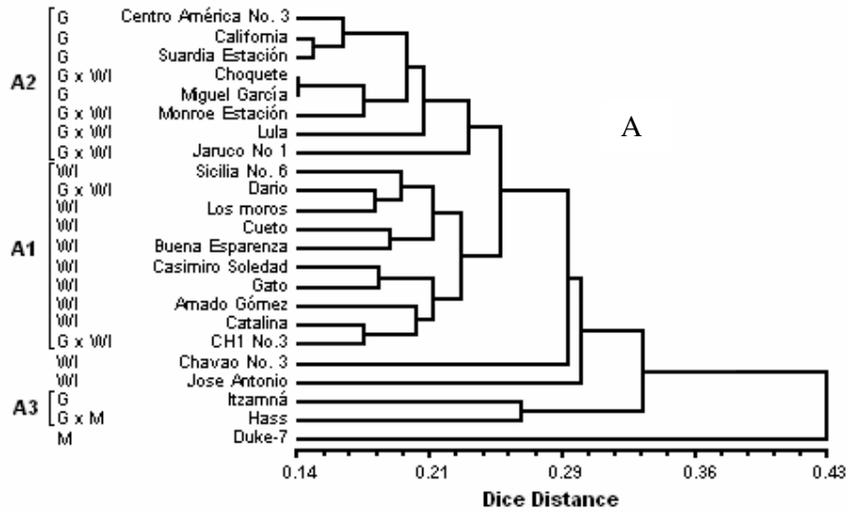


Figura 1. Dendrogramas de los cultivares de aguacatero utilizando el método UPGMA basado en datos de AFLP (A) y SSR (B)
 G: grupo horticultural Guatemalteco; WI: grupo horticultural Antillano; M: grupo horticultural Mexicano; G x WI: Híbrido Guatemalteco x Antillano; G x M: Híbrido Guatemalteco x Mexicano.

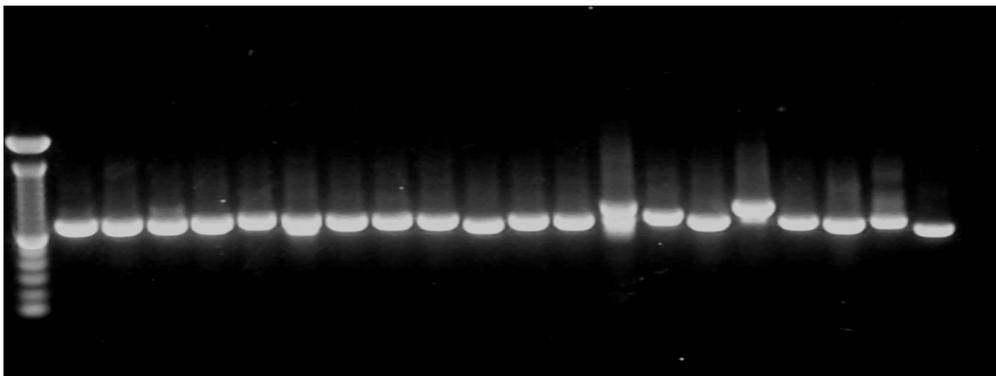


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR amplificados utilizando la combinación de cebadores ITS 5 / ITS 4.
 M: marcador de peso molecular Ladder 100 bp, Promega.
 Muestras de izquierda a derecha corresponden a los aislados IIFT: 020, 022, 023, 052, 054, 056, 057, 060, 061, 062, 063, 066, 068, 073, 080, 081, 083, 087, 088, 089 respectivamente.

Tabla 3. Ajuste y parámetros de la ecuación obtenidos de los análisis polinomiales.

Cultivares	R- Cuadrado	Parámetros de la ecuación		
		a	b_1	B_2
Duke-7	0.95 *	-0.3943	0.0166	0.0009
Hass	0.96 *	-0.4711	0.0775	0.0004

(*) Significativo para $p < 0.0001$

Tabla 4. Respuesta *in vitro* de embriones irradiados¹ y no irradiados de los cultivares 'Duke-7' y 'Hass' cultivados en medio MS.

Tratamientos	Embriones no irradiados		Embriones irradiados	
	Duke-7	Hass	Duke-7	Hass
Número de embriones maduros cultivados	203	99	698	317
Porcentaje de embriones enteros germinados	71	71	52	76
Porcentaje de embriones no germinados	2	5	7	3
Porcentaje de embriones germinados incompletos	26	12	35	9
Porcentaje de contaminación	1	12	6	12

(1) Considerando solamente embriones irradiados con valores inferiores a las LD₅₀

La germinación *in vitro*, el enraizamiento y los niveles de contaminación fueron similares para los embriones cigóticos irradiados y no irradiados. Sin embargo, dosis superiores a las DL₅₀ mostraron que el cultivar 'Hass' resultó más sensible a los efectos letales de la radiación.

Las curvas de sensibilidad a radiaciones para ambos los cultivares se muestran en la Figura 3. Previamente, Sánchez-Colín *et. al.* (1990) estableció los valores de DL₅₀ entre 20 y 40 Gy para ecotipos de aguacatero basado en la pérdida de la capacidad de injertación. Los resultados reportados aquí para el cultivar 'Hass' sugieren que los embriones cigóticos son ligeramente más sensible a los rayos gamma que las yemas, quizás debido a diferencias en la radiosensibilidad para ambos tipos de tejidos y a un mayor contenido de humedad de los embriones.

Selección *in vitro* para condiciones de salinidad

El cultivo de embriones cigóticos en condiciones de salinidad se caracterizó por un incremento significativo de las anomalías en el desarrollo de las hojas (crecimiento erecto, pigmentación anormal y deformaciones) y la observancia de raíces aéreas y secundarias. El número de embriones con brotes múltiples se duplicó con respecto al control (ausencia de sal) a concentraciones de 25 y 50 mM.

La inhibición de la fracción de brotes enteros del cultivar "Duke-7" dependió de las concentraciones salinas de acuerdo a la ecuación $\ln(x) = a + b x$, donde $\ln(x)$ es el algoritmo de la fracción de brotes enteros, x es la concentración de NaCl (mM); y $a = -0.0865$ y $b = -0.0108$ corresponden al intercepto en Y y la pendiente, respectivamente. El ajuste de los datos experimentales y el modelo teórico fue igual a 0.96 ($p < 0.008$). Basado en los parámetros de la ecuación la DL_{50} se calculó en 56 mM de NaCl, dosis mayores fueron tóxicas. La concentración de 157 mM de NaCl, correspondiente a la DL_{20} fue seleccionada para fines de mejoramiento.

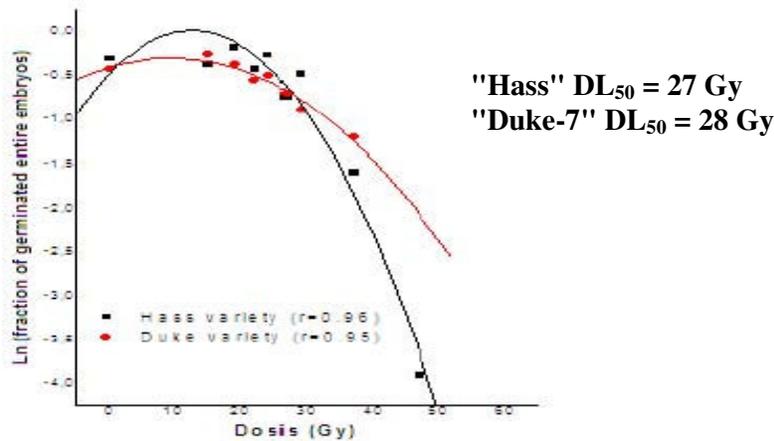


Figura 3. Curvas de dosis letales medias a radiación con rayos gamma de los dos cultivares de aguacatero evaluados

Tabla 5. Respuesta *in vitro* de embriones cigóticos del cultivar "Duke-7" bajo condiciones de salinidad.

Tratamientos	NaCl (mM)						
	0	25	50	100	150	200	250
Número de embriones cultivados	79	79	73	65	52	50	55
Porcentaje de embriones completos germinados	87	70	59	52	15	-	-
Porcentaje de embriones con brotes múltiples ¹	7	14	13	6	-	-	-
Porcentaje de plántulas con anomalías foliares ^{1,2}	7	19	21	11	-	-	-
Porcentaje de plántulas con raíces aéreas y secundarias ¹	0	12	25	7	-	-	-

(1) Calculado respecto al número de embriones completos germinados; (2) aunque se observaron diferentes anomalías foliares, solo se consideró el crecimiento erecto para calcular los porcentajes

4. Conclusiones

- 1.- Los grupos de cultivares detectados mediante marcadores moleculares corresponden con los grupos raciales confirmando la clasificación ecológica y/o botánica del aguacatero.
- 2.- Los marcadores AFLP y SSR son útiles al proporcionar un estimado preciso de la distancia genética entre cultivares mejorados de aguacatero.
- 3.- Resulta evidente la necesidad de diversificar la base genética de los cultivares comerciales de aguacatero en Cuba.
- 4.- Se dispone de un banco de aislados de hongos del suelo que incluye diferentes especies de *Phytophthora* de interés para el mejoramiento *in vitro* de este frutal y con fines de diagnóstico.
- 5.- Se dispone de las dosis letales a radiación para dos cultivares comerciales de aguacatero y dosis letales a salinidad para uno de ellos, información de interés para el mejoramiento por inducción de mutaciones y la selección *in vitro* de patrones tolerantes a este estrés.

5. Literatura Citada

- Ashworth V.E.T.M. y Clegg M.T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *J Hered*, 94: 404-415.
- Clegg, M.T., Kobayashi, M. y Zhong-Lin, J. 1999. The use of molecular markers in the management and improvement of avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5: 227-231.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Erwin D.C. y O.L. Ribeiro. 1996. *Phytophthora Disease Worldwide*. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 562 pp.
- Graham J.H. y J.A. Menge. 1999. Root Diseases. Chapter 12, in: *Citrus Health and Management*. L.W. Timmer and L.W. Duncan eds. The American Phytopathological Society, 126-135.
- Ho H.H. 1992. Keys to the species of *Phytophthora* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull. (Taiwan)* 1:104-109.
- Ho H.H., F.J. Ann y H.S, Chang. 1995. The genus *Phytophthora* in Taiwan. Institute of Botany, Academia Sinica, Monograph Series 15. 86 pp.

Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

Jeffers, SN., y S.B. Martin. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis* 70:1038-1043.

Kremer-Kohne, S. y Duvenhage, J.A. 2000. Field testing of new avocado rootstocks for tolerance to root rot. *SA Avocado Growers' Association Yearbook*, Vol. 23, p. 70-71.

Kremer-Kohne, S.; Duvenhage, J.A. y Mailula, S.A. 2001. Breeding and field testing of new avocado rootstocks for increased Hass yields and resistance to root rot. *SA Avocado Growers' Association Yearbook*, Vol. 24, p. 33-34.

Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 94-100.

Ramírez, I.M., Rodríguez N.N., Valdés-Infante J., Capote M., Becker D. y Rohde W. 2004. Isolation of genomic DNAs from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for DNA marker application. *Cultivos Tropicales* 25:33-38.

Ramírez, I.M., J.L. Fuentes, N.N. Rodríguez, O.Coto, J.Cueto, D. Becker y W. Rohde. 2005. Diversity analysis of Cuban avocado varieties based on agromorphological traits and DNA polymorphisms. *J. Genet. & Breed.* 59:241-252

Ridout, C.J. y Donini, P. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends Plant Sci*, 4: 76-79.

Ristaino J.B., M. Madricht, C.L. Trout y G. Parra. 1998. PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 64, No. 3, p/ 948-954.

Rodríguez, N.N.; Fuentes, V.; Rodríguez, O.L. y Alvarez, M. 1997. Cultivo *in vitro* de embriones maduros e inmaduros de aguacatero (*Persea americana* Mill). *Agricultura Técnica*, vol. 57(2), p.154-158.

Rodríguez, N.N., V.R. Fuentes, B. Velásquez, G.L. González, D.G. Sourd, J.A. Rodríguez e I.M. Ramírez. 2003. Catálogo de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. In: *Proceedings of the 5th World Avocado Congress*, Malaga, Spain, vol 1, 39-46.

Sánchez-Collin, S, M. Rubi y R. Sosa. 1990. Variability induction by irradiation of avocado (*Persea americana* Mill) scions. *Proceeding of Salvador Sánchez Colín foundation meeting, CICTAMEX, S.C., Coatepec Harinas, Mexico*, p. 41-48.

Sharon, D., Cregan, P.B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav, E. y Lavi, U. 1997. An integrated genetic map of avocado. *Theor Appl Genet*, 95: 911-921.

Whaterhouse GM. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. pap. 92. 22 pp. Commonw.Mycol.Inst.Kew, U.K.

White T.J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. En: M.A. Innis D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed). PCR protocols a guide to methods and applications. Academic Press, Inc. New York, N.Y.