

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS  
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL AGUACATERO EN MICHOACÁN,  
MÉXICO.

**Tesis**

Que presenta ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ  
Como requisito parcial para obtener el Grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila.

Julio 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRÁRIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS  
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL AGUACATERO EN MICHOACÁN,  
MÉXICO.

**Tesis**

Que presenta ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Mario Tapia Vargas

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS  
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL AGUACATERO EN MICHOACÁN,  
MÉXICO.

**Tesis**

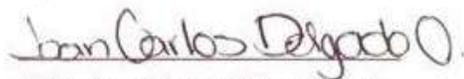
Elaborada por ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ como requisito parcial para  
obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA  
AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría:



\_\_\_\_\_  
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes  
Asesor Principal



\_\_\_\_\_  
Dr. Ernesto Cerna Chávez  
Asesor



\_\_\_\_\_  
M.C. Juan Carlos Delgado Ortiz  
Asesor



\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Mario Tapia Vargas  
Asesor



\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

## **Agradecimientos**

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo proporcionado durante el posgrado.

Al INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias) por el apoyo económico durante mis estudios de posgrado.

A la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por guiarme en mi formación académica, por el financiamiento del proyecto de investigación, confiar en mí y por los consejos brindados que serán de gran utilidad en mi vida profesional.

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez por ser pilar en mi carrera profesional y ser ejemplo a seguir.

A los M.C. Juan Carlos Delgado y Mariana Beltrán Beache por el gran apoyo brindado día a día en mi proyecto de investigación y por compartir sus experiencias del conocimiento.

Al M.C. Omegar Hernández Bautista por el gran apoyo brindado en mi investigación.

Al Dr. Luis Mario Tapia Vargas por alentar mi superación profesional con grandes consejos.

## **Dedicatoria**

Con mucho afecto para las personas que siempre han guiado el curso de mi vida:  
A mis padres Germán Hernández Pérez y Enedina Pérez Gómez por ser grandes pilares que soportan y guían los sueños que persigo.

A mi núcleo familiar: Edwin Hernández Pérez, Germán Hernández Pérez, Felisa Hernández Guzmán, Leocadio Moreno Velázquez, Anselmo Hernández Pérez y Araceli Gómez Olivares, los cuales son un ejemplo a seguir de superación basada en dedicación, esfuerzo y trabajo.

A mis grandes amigos Diego Alejandro Treviño Cueto, José Clemente Sánchez Canseco y Daniel Siller por su gran apoyo y consejos en el proceso de formación.

## Índice General

Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria.....	v
Lista de cuadros.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Historia y origen.....	4
Clasificación Taxonómica.....	4
Producción.....	5
Nivel mundial.....	5
Nivel Nacional.....	6
Importancia económica.....	7
Principales enfermedades.....	8
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (antracnosis).....	8
<i>Sphaceloma perseae</i> Jenkins (roña).....	9
<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands (tristeza del aguacatero).....	11
Nuevos hongos asociados a la tristeza del aguacate.....	13
<i>Pythium</i> spp. asociados a la pudrición de raíz.....	13
Pudrición de raíz por <i>Ilyonectria</i> (= <i>Neonectria</i> ) <i>macrodidyma</i> .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Muestreo.....	17
Aislamientos de los fitopatógenos.....	17
Purificación y multiplicación.....	18

Identificación morfológica.....	19
Identificación molecular.....	19
Pruebas de patogenicidad.....	19
Técnica de inoculación 1.....	19
Técnica de inoculación 2.....	21
Inoculación e incubación.....	22
Evaluación de la tasa de crecimiento en medio de cultivo V8®- Agar.....	22
Evaluación de la tolerancia de los fitopatógenos asociados a la tristeza del aguacatero, en medio selectivo PARPH.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Aislamiento e identificación morfológica de los fitopatógenos.....	25
<i>Mortierella elongata</i> .....	26
<i>Fusarium solani</i> .....	27
Oomicetos.....	27
<i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	27
<i>Phytopythium vexans</i> .....	28
<i>Pythium sp. amazonianum</i> .....	29
Identificación molecular.....	30
Pruebas de patogenicidad.....	30
<i>Mortierella elongata</i> .....	30
Oomicetos.....	32
<i>Phytopythium vexans</i> .....	32
<i>Pythium sp. amazonianum</i> .....	33
Evaluación de la tasa de crecimiento de fitopatógenos en medio de cultivo V8®- Agar.....	34
Evaluación de la tolerancia de los fitopatógenos asociados a la tristeza del aguacatero, en medio selectivo PARPH.....	37
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40
Anexos.....	51

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Principales estados productores de aguacate en la República Mexicana.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.....	7
<b>Cuadro 3.</b> Especies aisladas en los diferentes municipios muestreados.....	25
<b>Cuadro 4.</b> Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS ) de los genes Rdna.....	30
<b>Cuadro 5.</b> Tasa de crecimiento de las diferentes especies y cepas aisladas en medio de cultivo V8 <sup>®</sup> -Agar.....	35
<b>Cuadro 6.</b> Comparaciones de medias del crecimiento de las especies evaluadas en medio de cultivo V8 <sup>®</sup> -Agar a las 72 horas, mediante prueba Scheffe ( $\alpha= 0.05$ ).....	36
<b>Cuadro 7.</b> Concentración efectiva media de las diferentes cepas en medio selectivo de cultivo PARPH.....	37
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del diámetro de crecimiento a las 72 horas en medio selectivo PARPH a 50 ppm.....	38

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Porcentaje d producción de aguacate por continente.....	5
<b>Figura 2.</b> Sintomatología de <i>C. gloeosporioides</i> en fruto de aguacate.....	8
<b>Figura 3.</b> Fruto de aguacate dañado por <i>S. perseae</i> Jenkins.....	10
<b>Figura 4.</b> Crecimiento característico de <i>P. cinnamomi</i> en PDA.....	12
<b>Figura 5.</b> Árbol con sintomatología de la tristeza del aguacatero.....	13
<b>Figura 6.</b> Síntomas causados por <i>Neonectria (Ilyionectria) macrodydima</i> en plantas de aguacate.....	16
<b>Figura 7.</b> Diferentes cepas de los deuteromicetos.....	20
<b>Figura 8.</b> Incremento de inóculo de deuteromicetos.....	20
<b>Figura 9.</b> Características morfológicas de <i>M. elongata</i> .....	26
<b>Figura 10.</b> Estructuras de <i>F. solani</i> .....	27
<b>Figura 11.</b> Estructuras de <i>P. cinnamomi</i> .....	28
<b>Figura 12.</b> Morfología de <i>Phytopythium vexans</i> .....	29
<b>Figura 13.</b> Morfología de <i>P. sp. amazonianum</i> .....	29
<b>Figura 14.</b> Plantas de aguacate Hass inoculadas con <i>M. elongata</i> .....	31
<b>Figura 15.</b> Sintomatología causada por <i>M. elongata</i> .....	31
<b>Figura 16.</b> Comparación de A: <i>M. elongata</i> y B: <i>P. cinnamomi</i> .....	32
<b>Figura 17.</b> Sintomatología causada por <i>Phytopythium vexans</i> .....	33
<b>Figura 18.</b> Sintomatología causada por <i>Pythium sp. amazonianum</i> .....	34
<b>Figura 19.</b> Evolución temporal del diámetro de crecimiento de las diferentes especies evaluadas en medio V8®-Agar.....	36
<b>Figura 20.</b> Dosis efectiva media de Hymexazol en los diferentes aislados.....	38

## Resumen

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS  
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL AGUACATERO EN MICHOACÁN,  
MÉXICO

POR:

ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES

Michoacán es el principal productor de aguacate en el mundo. Su cultivo se ve afectado por diferentes enfermedades. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue corroborar la presencia de patógenos asociados a la enfermedad de la tristeza del aguacatero. Se muestrearon raíces y suelo de árboles de aguacate con síntomas de la enfermedad en mención y se obtuvieron diferentes aislamientos en medio selectivo PARPH-V8<sup>®</sup>; la especie se determinó mediante la técnica de PCR. Se determinó la patogenicidad inoculando plántulas de aguacate. Para la evaluación de la tasa de crecimiento se realizó una regresión lineal y un ANOVA, se compararon las medias mediante la prueba Scheffe con el programa estadístico R 3.2. Para el porcentaje de inhibición, los resultados se sometieron a un análisis probit, se sometió a un ANOVA mediante un diseño experimental completamente al azar y se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Scheffe, se analizaron los datos en el programa R 3.2. Se obtuvieron diferentes aislados: *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata* y *Fusarium solani*. De las pruebas de patogenicidad *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata* y *Fusarium solani* causan la sintomatología de la tristeza del aguacatero. *Phytophthora cinnamomi* y *Mortierella elongata* son más agresivas en tasa de crecimiento y en el medio selectivo PARPH se logra aislar a *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata* y *Fusarium solani*. Se concluye que existe un complejo de fitopatógenos asociados a la enfermedad en mención (*Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata* y *Fusarium solani*) y se reporta que los Oomicetos aislados son nuevos géneros altamente resistentes al Hymexazol.

Palabras clave: Identificación molecular, *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata*, *Fusarium solani* patogenicidad.

**Abstract**

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF  
PHYTOPATHOGENS LINKED TO THE AVOCADO IN MICHOACAN, MEXICO

BY:

ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ

MASTER IN SCIENCE IN PARASITOLOGY IN CROPS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES

Michoacan is the main avocado producer state in Mexico and the World. This cultivar undergoes different diseases. The goal of this thesis was to demonstrate the presence of some associated pathogens in the sadness disease. Roots and abearing diseasel symptoms avocado trees were sampmed. Different Isolation were obtained in selective environment named PARPH-V8®; the specie was identified using the PCR technique the pathogenicity was determined by inoculating the avocado seedlings. In order to assess the growth rate a liveal regression an ANOVA were utilized. The different means were compared utilizing the Scheffe test with the statistics program R 3.2. concerning the Inhibition rates, the outcomes were subhected to to a Provit analysis an ANOVA was used by mean of an experiemental design wholly at randon. We compare the different means utilizinga the Sheffe test, and the data coming from program R 3.2 were analyzed. Different isolations were obtained such as *Phytopythium vexans*, *Pythium sp. amazonianum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata* an *Fusarium solani*. Deeming the pathogenecity tests we may say that *Phytopythium vexans*, *Pythium sp. amazonianum*, *Phytophthora cinnamomi* and *Mortierella elongata* cause the symptomology of avocado's saddness. *Phytopythium vexans*, *Pythium sp. amazonianum* are more aggressive concerning the rate of grounth. In the selective environment PARPh *Phytopythium vexans* and *Pythium sp. amazonianum* are isolated. It is concluded that there is a cluster of complex phytopathogens agents linked to the above mentioned illness: *Phytopythium vexans*, *Pythium sp. amazonianum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata*. His also reported that some isolated Oomicetes are new genders highly resistant to Hymexazol.

Keywords: molecular identification, *Phytopythium vexans*, *Pythium sp. amazonianum*, *Mortierella elongata*, *Phytophthora cinnamomi* y pathogenicity.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es el fruto de un árbol originario de México y Centroamérica (Téliz, 2000). Partiendo de pruebas arqueológicas encontradas en Tehuacán, en el Estado de Puebla, con una antigüedad aproximada de 10,000 años, se ha determinado concretamente que el árbol de aguacate se originó en México, Centro América, hasta Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (Téliz, 2000).

La producción mundial del cultivo es de alrededor de 4,700,000 toneladas, siendo el continente americano el principal productor con el 70.3% de la producción, seguido del continente africano con una aportación del 15.2%, Asia con un 10.9%, Europa y Oceanía con aportaciones similares del 1.9% y 1.6% respectivamente (FAOSTAT, 2013). Sin embargo, México es el principal productor de aguacate en el mundo con una superficie que supera las 175,000 hectáreas, siendo Michoacán el principal estado en superficie, con más de 127,000 hectáreas, con rendimientos que oscilan entre las 10 ton/ha (SIAP 2014). También es el cultivo más importante económica y socialmente, generando un ingreso a nivel nacional de casi \$21,000 millones de pesos anuales y superando los 300 mil empleos directos sólo en el estado de Michoacán (APEAM, 2014).

La franja aguacatera de Michoacán ocupa 7, 752 Km<sup>2</sup>, equivalente al 13% de la superficie estatal (SAGARPA, 2015). Se encuentra establecida en el eje neovolcánico de la república mexicana, en un ecosistema boscoso. Se caracteriza por un clima templado, húmedo y sub-húmedo, con una temperatura de 8 a 21°C y una precipitación anual de 1,200 a 1,600 mm (Téliz y Marroquín, 2007; AALPAUM, 2016). Sin embargo; existen diferentes limitantes fitosanitarias, las cuales reducen significativamente el rendimiento, ocasionando malformaciones del fruto e incluso la muerte del árbol. Se tiene conocimiento de diferentes patógenos causantes de las enfermedades fungosas conocidas como roña (*Sphaceloma perseae*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, causante de la pudrición del sistema radicular y en la parte aérea del árbol una marchitez conocida como tristeza del

aguacatero, éste último el de mayor importancia económica (Zentmyer *et al.*, 1994; Pérez, 2008). Este patógeno ataca a todas las variedades de aguacate, dañando las raíces, y ocasionando la muerte del árbol (Coffey, 1992; Whiley *et al.*, 2007). En México, se ha detectado la presencia de la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras; destacando por la severidad de los daños, la región de Atlixco, Puebla, donde ha causado la muerte de miles de árboles. En la región productora de Michoacán, se considera que alrededor de 4000 ha están afectadas por la enfermedad, y tiende a incrementarse (Téliz, 2000).

Hasta hace algunos años solo se mencionaba a *P. cinnamomi* como el único patógeno responsable de esta sintomatología; sin embargo, algunos autores del continente europeo reportan nuevas especies causando marchitez tales como: *Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* (Dann *et al.*, 2011; Vitale *et al.*, 2011) y *Phytopythium vexans* aislado de raíces de aguacate en las Islas Canarias, mostrando una patogenicidad incluso más severa que *Phytophthora cinnamomi* (Rodríguez *et al.*, 2014). Actualmente, la diversidad de hongos asociados a la tristeza del aguacate en el estado de Michoacán no ha sido determinada, por lo que se requieren realizar estudios que determinen la patogenicidad de nuevos hongos asociados a esta enfermedad y, de esta manera, hacer frente a la problemática fitosanitaria mediante estrategias de control.

El objetivo de esta investigación fue aislar, identificar cepas de hongos asociados a la tristeza del aguacatero, a partir de muestras de raíz con la sintomatología característica y de suelos agrícolas provenientes de los principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán y probar su patogenicidad en plantas de aguacate.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Identificar morfológicamente a los fitopatógenos asociados al cultivo del aguacate, en los principales municipios de la franja aguacatera del estado de Michoacán.

### **Objetivos específicos**

Identificar molecularmente los fitopatógenos asociados al cultivo del aguacate.  
Determinar la patogenicidad y tasas de crecimiento de los fitopatógenos asociados al aguacatero.

### **Hipótesis**

Existe más de una especie de hongo asociado a la tristeza del aguacatero.  
Existe variabilidad en el grado de severidad entre las diferentes especies aisladas del cultivo del aguacate en el estado de Michoacán.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Historia y origen

El centro de origen del aguacate es América, su nombre etimológico deriva del náhuatl Ahuaca Cuahuitl: ahuatl (testículo) y cuahuitl (árbol) “árbol de testículos”. El subgénero *Persea* predomina desde la parte central de México, Guatemala y hasta Centroamérica. Estudios arqueológicos indican haber encontrado fósiles de semilla en el Valle de Tehuacán en la cueva de Coxcatlán, Puebla, en donde el aguacate era consumido por los nativos desde 10 000 a.C. Su cultivo se inició posiblemente hace 6 000 años (Sánchez, 1999).

México es considerado como el país con mayor diversidad de aguacate en donde existen 20 diferentes especies emparentadas con el aguacate *Persea americana*. Barrientos *et al.*, (2000), mencionan que se reconocen tres razas: la mexicana, la Antillana y la guatemalteca. Bergh y Ellstrand, (1986) clasificaron las variedades botánicas, quedando la raza mexicana como *Persea americana* var. *drymifolia*, la raza Antillana como *P. americana* y la raza Guatemalteca como *P. americana* var. *guatemalensis*.

### Clasificación Taxonómica

**Clase:** Dicotiledóneas

**Subclase:** Diapétales

**Orden:** Ranales

**Familia:** *Lauraceae*

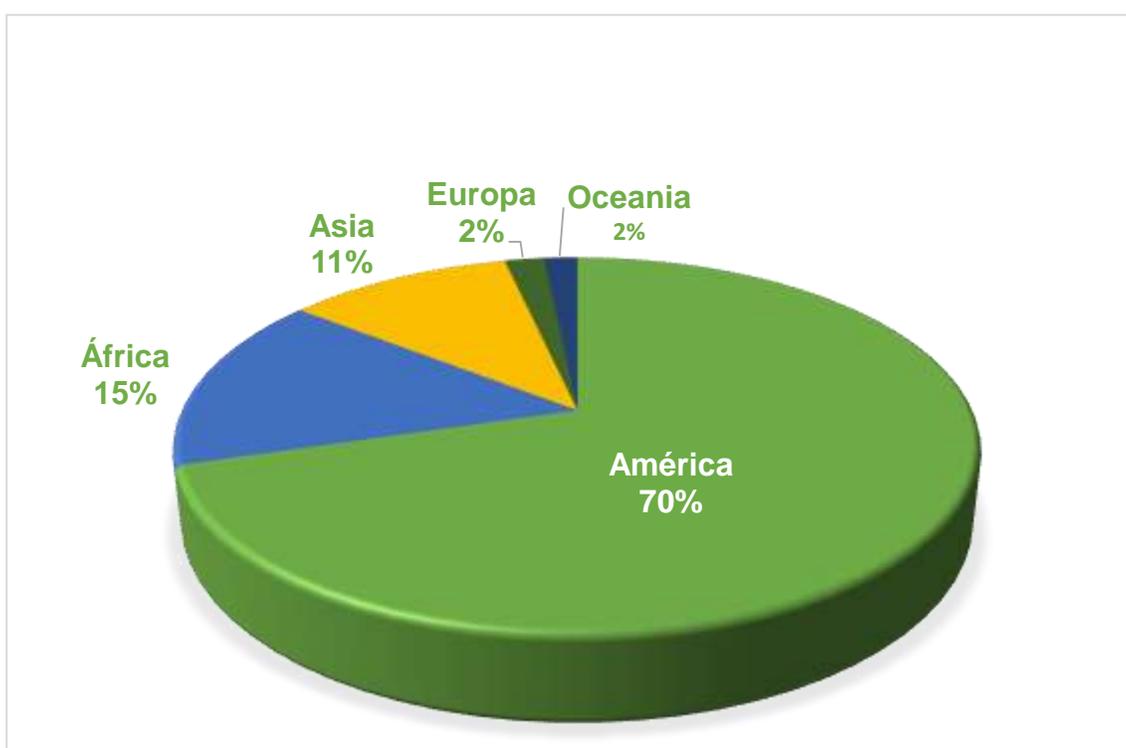
**Género:** *Persea*

**Especie:** *P. americana* Mill

## Producción

### Nivel mundial

La producción mundial del cultivo del aguacate asciende a los 4,700,000 toneladas, siendo el continente americano el principal productor con el 70.3% de la producción (Figura 1.), lo que equivale a 3,317,609.00 ton, seguido del continente africano con el 15.2%, Asia aporta el 10.9%, Europa 1.9% y Oceanía 1.7% de la producción (FAOSTAT, 2013).



**Figura 1.** Porcentaje de producción de aguacate por continente.

Fuente: FAOSTAT (2013)

Los principales países productores de aguacate en el mundo son la República Mexicana con 1, 520,694.50 ton, República Dominicana aporta 387,546.00 ton, Colombia 303,340.00 ton, Perú 288,387.00 e Indonesia con 276,311.00 ton (FAOSTAT, 2013).

### Nivel Nacional

México es el principal productor de aguacate en el mundo con una superficie que supera las 175,000 hectáreas, siendo Michoacán el principal estado en superficie con más de 127,000 hectáreas, con rendimientos que oscilan entre las 10 ton/ha (SIAP, 2014). La aportación de aguacate de los diferentes estados de la República Mexicana se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Principales estados productores de aguacate en la República Mexicana.

<b>Estado</b>	<b>Sup. sembrada (ha)</b>	<b>Sup. cosechada (ha)</b>	<b>Producción (ton)</b>
<b>Michoacán</b>	127,084.07	118,606.98	1,219,553.58
<b>Jalisco</b>	14,976.00	10,827.11	100,250.33
<b>México</b>	7,420.00	5,841.50	64,928.13
<b>Nayarit</b>	5,329.87	4,211.95	36,691.01
<b>Guerrero</b>	4,251.49	2,804.19	14,827.79
<b>Morelos</b>	3,763.00	3,405.50	27,656.05
<b>Chiapas</b>	3,293.40	1,022.00	7,547.55
<b>Puebla</b>	2,869.50	2,180.00	11,758.05

Fuente: SIAP (2014).

El estado de Michoacán aporta el 80.19% de la producción total del país, algunos de sus municipios presentan rendimientos de más de 11 toneladas y con un valor de producción que oscila por 17,452,759.26 pesos (SIAP, 2014). En el cuadro 2 se enlistan los principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.

**Cuadro 2.** Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.

<b>Municipio</b>	<b>Sup. sembrada (ha)</b>	<b>Sup. cosechada (ha)</b>	<b>Producción (ton)</b>	<b>Rendimiento (ton/ha)</b>
<b>Tancítaro</b>	21,600.00	21,600.00	206,812.00	9.58
<b>Tacámbaro</b>	14,232.00	13,760.00	140,782.18	10.23
<b>Salvador E.</b>	14,194.00	12,793.00	141,822.00	11.09
<b>Uruapan</b>	14,030.00	14,030.00	141,107.80	10.06
<b>Ario</b>	12,536.00	11,445.00	128,058.50	11.19
<b>Peribán</b>	12,393.00	12,378.00	137,268.22	11.09
<b>Nuevo Parangaricutiro</b>	6,500.00	6,500.00	63,339.00	9.74
<b>Ziracuaretiro</b>	3,770.00	3,770.00	34,935.50	9.27
<b>Los Reyes</b>	3,769.60	2,890.00	33,166.00	11.48
<b>Tingambato</b>	3,036.00	3,036.00	29,259.00	9.64

Fuente: (SIAP, 2014).

### **Importancia económica**

Su importancia es innegable ya que por sí mismo, representa el 50% del PIB primario estatal (APEAM, 2012). México aporta 3 de cada 10 toneladas de aguacate que se producen en el mundo; lo cual lo coloca como el país exportador del fruto número uno; seguido de Indonesia, quien exporta 294 mil 200 toneladas; en tanto nuestro país supera el millón 316 mil 104 toneladas anuales; es decir, exporta 4.4 veces más que el país asiático anteriormente citado (SAGARPA, 2014). Desde el 2013, la República Mexicana ha mantenido un saldo favorable en la balanza comercial de aguacate, con un ingreso promedio a los mil 270 millones de dólares anuales y un consumo per cápita del fruto de 7 kg (SAGARPA, 2015). A nivel nacional superan los 25,000 productores, con un crecimiento de la industria aguacatera de aproximadamente el 2.5% anual, participando más de 400 empacadores, establecidos el 80% en el estado de Michoacán, lo que genera la contratación de más de 115,000 empleos de manera directa e indirecta, beneficiando aproximadamente a 500,000 personas (COMA, 2005).

## Principales enfermedades

### ***Colletotrichum gloeosporioides* (antracnosis)**

El hongo *C. gloeosporioides* presenta colonias con abundante micelio blanco al principio en el medio de cultivo PDA, pero luego se tornan grisáceas a oscuras con la edad, con masas de esporas o conidios color rosado a salmón principalmente en el centro de la colonia, conidios cilíndricos, con extremos obtusos a redondeados, hialinos, sin septos y uninucleados (Sutton, 1992; Freeman *et al.*, 1998; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

En el fruto del aguacate (*Persea americana* Mill.) la enfermedad de mayor importancia económica, por las pérdidas que ocasiona, es la inducida por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Figura 2). En el campo los frutos presentan síntomas denominados “viruela”, “clavo” y más frecuentemente antracnosis (Zamora *et al.*, 2001).



**Figura 2.** Sintomatología de *C. gloeosporioides* en fruto de aguacate.

Fuente: Department of Agriculture and Fisheries Queensland

La enfermedad se manifiesta sobre diferentes partes de la planta: en las hojas aparecen pequeñas manchas de color café claro, que aparentan ser más grandes cuando llegan a juntarse, en brotes tiernos se observan abultamientos alrededor del brote con presencia de savia de color blanco; a este síntoma se le conoce comúnmente como sarampión, puede llegar a secar las partes atacadas, que generalmente son las puntas de las ramas,

denominándosele también como "marchitez de puntas". También ataca a las flores y se presenta como un tizón, originando la caída de éstas o el aborto de los frutos (Coria, 2009). En frutos, inicialmente se presentan pequeñas protuberancias de color verde brillante, que se presentan en cualquier etapa de desarrollo del fruto, aunque el ataque es más severo cuando el fruto es muy pequeño, las lesiones son circulares, tornándose posteriormente de color café a negro claro y consistencia corchosa; existe mayor liberación de esporas de *C. gloeosporioides* a las primeras horas de la mañana (6 a 8 a.m.), con 13 a 14 °C y humedad relativa superior a 80 %. En la epidemia de la enfermedad, el hongo es dispersado por salpicaduras de agua y el viento, las infecciones más severas se presentan durante los meses de junio a agosto y en menor grado en los meses de febrero y marzo, siempre y cuando se presenten condiciones de alta humedad, con las lluvias la enfermedad se favorece con nubosidad de 4 a 6 horas continuas diarias, y con precipitación de más de 1,500 mm anuales (Coria, 2009).

### ***Sphaceloma perseae* Jenkins (roña)**

Esta enfermedad es importante en áreas con lluvias intensas, como Florida, México, Perú, Filipinas y Sudáfrica (Jenkins, 1934; Ploetz *et al.*, 1994; Téliz, 2000). En México ha sido registrada en los estados de Michoacán, Guanajuato, Puebla, Querétaro, México, Morelos, Nayarit, Tamaulipas, Jalisco e Hidalgo (Coria, 2009).

Es una enfermedad de gran importancia; su daño ocasiona que el precio de venta en la fruta cosechada se reduzca hasta en 50%. Actualmente para el control fitosanitario se destina del 20 al 25% del gasto total en el cultivo (Vidales, 1996). Esta enfermedad tiene importancia por su carácter endémico, lo que implica que cada año esté presente en las huertas. Cuando no se hace un control adecuado, la enfermedad se difunde rápidamente, estimándose en algunas huertas incidencias del 30 al 40% y en casos extremos hasta más del 70% (Coria, 2009). Ataca a todas las variedades establecidas en México, siendo más susceptible la variedad "Fuerte", sin embargo, en los últimos años la variedad "Hass" ha sido severamente atacada (Vidales *et al.*, 1994).

La sintomatología del hongo que presenta en la superficie del fruto causa coloraciones marrón, manchas irregulares y lesiones levantadas (Ploetz *et al.*, 1994). A medida que la enfermedad se extiende, las manchas pueden crecer dando un aspecto corchoso en toda la superficie de la fruta (Figura 3); el hongo no penetra a la pulpa, pero las lesiones pueden facilitar la entrada de otros patógenos en la fruta; en las hojas, presenta pequeñas manchas marrones oscuras (3 mm) desarrollándose a lo largo de las nervaduras de las hojas (Jenkins, 1934). Estas lesiones también pueden ser de color rojo, las cuales se desprenden para dar lugar a orificios (Pernezny y Marlatt, 2007). Las infecciones graves pueden ocasionar arrugamiento y distorsionar las hojas (Pérez, 2008).



**Figura 3.** Fruto de aguacate dañado por *S. perseae* Jenkins.

Fuente: International Tropical Fruits Network.

Con respecto a la morfología de *S. perseae* en los tejidos infectados, el hongo se desarrolla blanco, crema o aceite de oliva, masas de conidios (longitud: 25-100 micras) que llevan conidios ovoides hialinos, 5-8 x 3-4 micras, o alargadas pigmentados, conidios unicelulares 1-6, alcanzando 30 x 3-5 micras. La germinación se produce por conidios hialinos o por tubos germinales (Jenkins, 1934). *S. perseae* se puede aislar de tejido sobre PDA, el color de la colonia es variable de color oliva a oliva pardusco (Ploetz *et al.*, 1994).

En relación con su epidemiología, el hongo necesita mucha humedad; por el contrario, los conidios pueden formarse a lo largo de todo el año, a pesar de que son más abundantes en el final del período de infección, los conidios se propagan por el viento, la lluvia o insectos (Téliz, 1992). En México, las poblaciones de trips

(Thysanoptera) se correlacionan con el número de lesiones en los frutos, ya que las heridas causadas por los trips favorecen el establecimiento y desarrollo del hongo (Téliz, 2000). Los frutos jóvenes y tejidos de las hojas tiernas son susceptibles mientras que los maduros son resistentes (Ploetz *et al.*, 1994).

### ***Phytophthora cinnamomi* Rands (tristeza del aguacatero)**

*Phytophthora cinnamomi* fue aislado en 1922 por Rands en Sumatra de árboles de canela (*Cinnamomum burmanii*), quien lo describió, teniendo una distribución mundial (Erwin, 1996). Hoy día se reconoce como uno de los fitopatógenos de plantas más destructivos, con un gran rango de hospederos (Zentmyer, 1980). La mayoría de las especies del grupo son saprófitos acuáticos o habitantes de suelos saturados de agua; sin embargo, la clase Oomycetes contienen especies fitopatógenas de raíces y algunas de partes aéreas (mildius). En la clase Oomicetes destacan importantes géneros fitopatógenos, como *Pythium* y *Phytophthora* (Llacer *et al.*, 2000).

Actualmente este fitopatógeno se puede encontrar como agente causal de la pudrición de las raíces del aguacate en casi todas las áreas aguacateras del mundo incluyendo Australia, Nueva Zelanda, África, Israel, España, Marruecos, Estados Unidos, México, así como, varios países de América y el Caribe donde se cultiva ese frutal (Pegg *et al.*, 2008).

La tristeza del aguacatero, debida a la pudrición radical causada por *P. cinnamomi* es una de las enfermedades más importantes y devastadoras en el mundo (Zentmyer, 1980). En México, el patógeno ha sido detectado en las zonas aguacateras de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit y Morelos (Téliz *et al.*, 1992). En Querétaro y Comonfort, Guanajuato, *P. cinnamomi* causó la desaparición del cultivo (Téliz y García, 1982). En Morelos y Puebla se han encontrado incidencias que fluctúan entre 45 y 90%; en Michoacán se estima que aproximadamente 5%; de la superficie cultivada se presenta la tristeza en diferentes grados y en años recientes la incidencia ha ido en aumento, por lo que actualmente no existe una huerta en la cual no se presente este problema (Téliz, 2000).

Las características morfológicas de *P. cinnamomi* son micelio cenocítico, muy turuloso en forma de arrosada (Figura 4), con vesículas globosas a piriformes; las hifas tienen un diámetro variable de 3.5 a 21.0  $\mu\text{m}$ , la colonia micelial presenta aspecto de camelia, debido al crecimiento deprimido y algodonoso del micelio, que tiene lugar a intervalos regulares; esporangióforos simples o ramificados en simpodio, a veces por proliferación esporangial. Generalmente los esporangios no se producen en medios sólidos; sin embargo, en extracto de suelo se forman en abundancia, los cuales presentan forma ovoide, piriforme, elipsoidal a elipsoidal – elongado, con un ápice compacto, no sobresaliente y sin papila, se estrechan o redondean hacia la base (Erwin y Ribeiro, 1996); miden en promedio 75  $\mu\text{m}$  de largo y 40  $\mu\text{m}$  de ancho, aunque esto último es variable (Ho y Zentmyer, 1977). Posee zoósporas móviles con una marcada habilidad para enquistar en pocos minutos (Bartnicki y Wang, 1983). Estas unidades, naturalmente infectivas proveen un potencial de enfermedad grande y explosivo; las clamidosporas son estructuras de sobrevivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados (Zentmyer, 1983). Poseen un diámetro promedio de 41  $\mu\text{m}$  (Erwin y Ribeiro, 1996). Son globosas y de paredes delgadas (Zentmyer, 1980). Pueden ser terminales o intercalares en el micelio y a menudo aparecen como racimos de uvas de 3-10 clamidosporas. Estas estructuras son eventualmente liberadas en el suelo donde persisten por períodos de hasta 13 años (Erwin y Ribeiro, 1996). Germinan a través de varios tubos germinativos (Coffey, 1991).



**Figura 4.** Crecimiento característico de *P. cinnamomi* en PDA.

La sintomatología que presenta el árbol de aguacate es: decaimiento progresivo del árbol, las hojas son pequeñas, pálidas o amarillentas y a menudo parecen marchitas (figura 5). Ocurre una defoliación progresiva en árboles, carencia de

nuevos crecimientos, disminución en la producción de frutos, los cuales son pequeños y de mala calidad; ramas que se desecan y se defolian en la copa; las raíces primarias y secundarias se vuelven quebradizas con coloraciones rojizas-castañas, por lo que la destrucción lenta del sistema radicular lleva finalmente a la muerte del árbol. (Gallegos, 1983; Brom, 1970; Coffey, 1991; Ochoa, 2000).



**Figura 5.** Árbol con sintomatología de la tristeza del aguacatero

Fuente: Ochoa (2006).

## **Nuevos hongos asociados a la tristeza del aguacate**

### ***Pythium* spp. asociados a la pudrición de raíz**

Especies de *Pythium* se distribuyen por todo el mundo y son importantes patógenos de plantas y animales (Hendrix y Campbell, 1973; van der Plaats-Niterink, 1981). Los primeros estudios de caracterización de hongos y oomicetos de aguacate asocian la presencia regular de *Pythium* spp. en raíces del aguacate y en suelo (Wager, 1942; Harvey, 1945). Sin embargo, su comportamiento parasitario hacia el aguacate no fue investigado a fondo y se quedaron considerados como patógenos o saprobios débiles; sin embargo, la literatura más reciente hace referencia al género *Pythium* spp. como patógenos de las raíces de aguacate (Darvas, 1979; Solel, 1984; Zea-Bonilla *et al.*, 2007a).

Los síntomas que ocasiona *Pythium* spp. son necrosamiento de las raíces absorbentes, amarillamiento de la plántula y causa su muerte (Solel, 1984). *Pythium* spp. se ha reportado principalmente en países Europeos, afectando plantas de aguacate en vivero (Solel, 1984). En los huertos establecidos,

síntomas aéreos tales como el marchitamiento, clorosis, la producción de hoja escasa y microfilos recientemente se han relacionado con el aislamiento del patógeno de las raíces en Andalucía (Zea-Bonilla *et al.*, 2007b). Los síntomas de la pudrición de la raíz por *Pythium* son difíciles de distinguir de los de *Phytophthora reet* ya que ambos causan necrosis en las raíces absorbentes (Pérez, 2008).

Los agentes asociados a la pudrición de raíz son las diferentes especies de *Pythium* como *P. derbayanum*, *P. splendens* y *P. ultimum* en Sudáfrica (Darvas, 1979), *P. proliferum* en Israel (Solel, 1984) y *P. vexans* (Zea-Bonilla *et al.* 2007b), el cual ha sido descrito como patógeno de las raíces de aguacate, aunque presenta una gran variación en la agresividad (Rodríguez, 2014). Morfología y mediciones de hifas, estructuras asexuales y sexuales y los rangos de temperatura de crecimiento han sido tradicionalmente utilizados para la identificación de los diferentes *Pythium spp.* (Van der Plaats-Niterink, 1981; Dick, 1990). Recientemente, el diagnóstico se ha complementado con caracterizaciones moleculares basados en las secuencias de nucleótidos de las regiones ITS del ADN (Lévesque y Cook, 2004). En general, *Pythium spp.* son fáciles de aislar mediante el uso de diferentes métodos, son de crecimiento rápido cuando se cultiva en agar de papa-zanahoria a 25 ° C (Van der. Plaats-Niterink, 1981).

La epidemiología de las especies de *Pythium* se produce abundantemente en los suelos cultivados, cerca de la región de la raíz en las capas superficiales del suelo, la mayoría de las especies de *Pythium* forman zoósporas en el agua por lo que son una amenaza potencial en sistemas de riego, y también pueden ser distribuidos por el hombre y los animales (Pérez, 2008). Las estructuras de reproducción sexual se producen de manera eficiente ya que la mayoría de las especies son homotáticas, siendo las oósporas estructuras de supervivencia importantes (Pérez, 2008).

Para el control, Darvas (1979) confirmó que las altas concentraciones de metalaxil aplicado al suelo eliminan *Pythium spp.* sin embargo; Darvas y Becker (1984) confirmaron más tarde que entre las especies de *Pythium* hay diferentes

grados de susceptibilidad contra el fungicida y que después de su uso prolongado el patógeno desarrolla resistencia contra el fungicida. En un sentido amplio, teniendo en cuenta la proximidad fisiológica y patológica de las especies de *Pythium* y *Phytophthora*, medidas de control similares reportadas por *Phytophthora* se pueden adaptar inicialmente para *Pythium* en la sintomatología de pudrición de la raíz (Darvas 1979).

### **Pudrición de raíz por *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma***

*Neonectria macrodydima* Halleen, Schroers y Crous, su estado anamorfo es *Cylindrocarpon macrodydimum* Schroers, Halleen y Crous (Booth, 1966; Mantiri *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004); recientemente fue nombrado como *Ilyonectria macrodydima* (Halleen, Schroers y Crous) P. Chaverri & C. Salgado (Chaverri *et al.*, 2011).

Esta enfermedad afecta a plantas jóvenes de aguacate principalmente en vivero y se ha reportado en Chile, causando la muerte de 22,000 plantas (Besoian and Piontelli, 1999). En Israel se ha logrado aislar en la mayoría de los viveros productores de planta de aguacate con una incidencia del 10 al 100% (Zilberstein *et al.*, 2007) y en Italia ha causado la muerte de más de 7000 plantas de seis meses hasta cuatro años de edad (Vitale *et al.*, 2011). Las lesiones se presentan principalmente en la raíz, seguido de daños a hojas y al tallo (Vitale *et al.*, 2011), sin embargo; en México no existen reportes causando daños en viveros ni en huertos de aguacate.

La morfología de las colonias fúngicas de *Cylindrocarpon sp.* en medio de cultivo PDA inicialmente son de color blanco grisáceo y luego variado, en color amarillo marrón, en el reverso del medio, al marrón oscuro en el centro de la colonia (Vitale *et al.*, 2011). La tasa de crecimiento diario es de 6.9 mm/día, las estructuras que presenta son: microconidias de 11-16 X 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  (media = 13.6 X 4.1  $\mu\text{m}$ ), hialina, recta, los extremos redondeados, prominente hilo basal, de 1 ó 3 microconidias septadas; las macronidias con 1 septo tienen una medición de 16-28 X 4-5.5  $\mu\text{m}$  (Media = 22.8 X 4.6  $\mu\text{m}$ ); macronidias con 3 septos con una

medición de 21-34 X 4.5-7  $\mu\text{m}$  (media = 28.8 X 5.7  $\mu\text{m}$ ) y las clamidosporas son abundantes, generalmente intercaladas, solas o en cadenas (Vitale *et al.*, 2011). *Ilyonectria* y sus estados anamorfos se encuentran generalmente en el suelo y causan muchas enfermedades de la raíz (Chaverri *et al.*, 2011). En la figura 6 se muestra la sintomatología típica como raíces de coloración negra; a medida que avanzaba la pudrición de la raíz, las hojas se vuelven de color amarillo y poco a poco presentan una coloración necrótica, seguido de una marchitez y muerte de las plantas (Vitale *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Síntomas causados por *Neonectria (Ilyonectria) macrodydima* en plantas de aguacate: A) marchitez, B) marchitez y necrosis de las hojas, C) planta muerta, D) pudrición negra de la raíz; E-F) marchitamiento y pudrición de raíz. Fuente: Vitale *et al.*, 2011.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

En los meses de Agosto y Septiembre de 2014, se recolectaron muestras de raíces en arboles de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) que presentaban la sintomatología característica de muerte descendente conocida como tristeza del aguacate. El muestreo fue dirigido a la zona de goteo y se realizó en 40 huertas de los municipios de Uruapan, Peribán, Tancítaro y San Juan Nuevo Parangaricutiro, pertenecientes a la franja aguacatera en el estado de Michoacán, la cual presenta condiciones climáticas semicálidas, subhúmedas con lluvias en verano, que oscilan entre los 1200 a 1600 mm (García, 1981) y temperaturas de 10 a 28°C.

Se realizó un muestreo dirigido a una profundidad de 0-30 cm en cuatro puntos cercanos al área de goteo. Con ayuda de una pala recta se tomaron las muestras de suelo y raíz (con sintomatología característica y de 2 a 6 mm de diámetro) para colocarlas en bolsas de polietileno previamente rotuladas con los datos de la huerta, municipio, georreferenciación y manejo agronómico (convencional u orgánico). Se obtuvo una muestra compuesta de 1 kg por árbol, se muestrearon 4 árboles por huerta y posteriormente se transportaron al laboratorio de fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### Aislamientos de los fitopatógenos

Para el aislamiento del hongo se emplearon dos metodologías, la primera fue mediante las raíces que presentaban sintomatología característica de *Phytophthora cinnamomi* como tejido necrosado color café oscuro. Las raíces se lavaron en agua corriente para fragmentarlas en trozos no mayores a 0.5 cm; con apoyo de un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal seleccionando los límites de tejido sano y enfermo. En la cámara de flujo laminar los trozos de raíz se lavaron en solución de hipoclorito de sodio al 3 % por un minuto, seguido de tres lavados de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente

previamente esterilizado. Una vez secas, se sembraron en medio selectivo V8<sup>®</sup>-Agar y se adicionaron los antibióticos PARPH (Pimaricina, Ampicilina, Rifampicina, PCNB e Hymexazol) (Erwin y Ribeiro, 1996). Se sembraron 4 trozos de raíces en forma horizontal en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro; tres cajas por muestra, dando un total de 12 raíces por árbol muestreado y finalmente los aislados se incubaron a 28°C por tres días en oscuridad total (Fierro, 2011).

La segunda metodología consistió en el método indirecto o trampa para aislar *P. cinnamomi* del suelo, con la técnica de la manzana, la cual proporciona un medio óptimo a este tipo de hongo; sin embargo, permite el crecimiento de otro Oomicetos como *Pythium*. En la manzana previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 3%, se realizó un agujero de 1 cm de diámetro con el apoyo de un sacabocados, a una profundidad de 3-4 cm, en donde se rellena con suelo hasta saturar el orificio dentro de la manzana; sobre la tierra se colocó algodón humedecido con agua destilada estéril para después sellar con Kleen-Pack<sup>®</sup> y evitar el ingreso de otro patógeno; se encubó por un lapso de 7 días con la finalidad que el oomiceto se desarrolle dentro de la manzana. Cuando se visualiza alrededor del orificio una coloración café oscuro se parte con apoyo de un bisturí estéril y se recuperan cortes de la zona de avance del patógeno (Campbell, 1949; Rondón *et al.*, 1988). Se sembraron 4 trozos de tejido en forma horizontal en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro, posteriormente se colocaron en medio selectivo V8<sup>®</sup>-Agar PARPH (Erwin y Ribeiro, 1996); tres cajas por muestra, dando un total de 12 cortes de tejido por árbol muestreado, sellándose los extremos con Kleen-Pack<sup>®</sup> y se incubaron a 28°C durante tres días en oscuridad total.

### **Purificación y multiplicación**

Con la finalidad de realizar la caracterización morfológica e identificar hasta género los diferentes aislados obtenidos, se tomó de cada caja Petri los aislamientos que presentaban diferencias entre sí y se transfirieron a medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar, Bioxon<sup>®</sup>). La técnica de purificación fue por

punta de hifa por triplicado, se colocó en el centro de la caja Petri, fueron selladas con Kleen-Pack y se incubaron a 28°C en cámara bioclimática durante 72 h en el laboratorio de Fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su posterior identificación.

### **Identificación morfológica**

Los hongos que se obtuvieron con mayor frecuencia de los diferentes aislados se identificaron morfológicamente según las claves de Arnold, (1998); Leslie y Summerell, (2006); Wagner L *et al.*, (2013) (Deuteromicetos), Erwin y Ribeiro, (1996); Van der Plaats-Niterink, (1981) y Cock *et al.*, (2015) para oomicetos.

### **Identificación molecular**

Se realizó la identificación molecular, mediante la técnica PCR-ITS. Del hongo aislado e identificado se extrajo el ADN de acuerdo con la metodología de Doyle y Doyle (1990), a partir de 0.2 g de micelio del cultivo puro se extrajo el ADN con buffer de lisis (EDTA 50 mM, pH 8.5; Tris HCl 100 mM, pH 8; NaCl 50 mM; SDS 2%). La visualización del ADN se realizó en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (GenScript®).

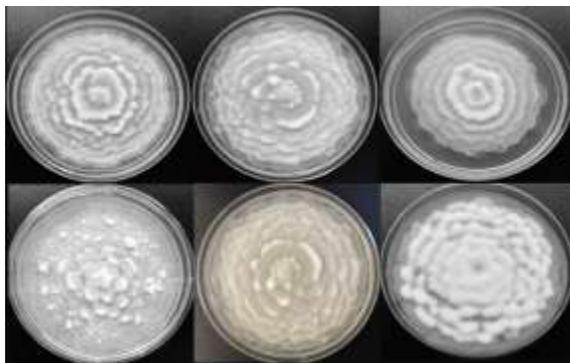
La amplificación de la región ITS se llevó a cabo con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). De igual manera se visualizó el producto de la reacción por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con GelRed (GenScript®) y el producto del PCR se mandó secuenciar al laboratorio de diagnóstico fitosanitario UA-LAB.

### **Pruebas de patogenicidad**

#### **Técnica de inoculación 1**

Seis cepas de *Mortierella elongata* (Figura 7) identificadas como deuteromicetos, fueron obtenidas del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad, provenientes de plantas de aguacate con sintomatología de tristeza del aguacatero de los

municipios de Peribán, Tancítaro, Uruapan y San Juan Nuevo Parangaricutiro, todos pertenecientes al estado de Michoacán.



**Figura 7.** Diferentes cepas de los deuteromicetos.

Incremento del inóculo: La preparación del inóculo se realizó replicando las seis cepas en cajas Petri con medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar clarificado, con 8 repeticiones por cada uno de los aislados, con la finalidad de ajustar la dosis de propágulos infectivos y se incubaron a 28°C en obscuridad total por siete días, hasta obtener micelio abundante. El inóculo se incrementó en matraces de 500 ml con medio líquido jugo-V8<sup>®</sup> (Figura 8). Los matraces con los cultivos de deuteromicetos se incubaron durante 8 días a 28°C en obscuridad total. Posteriormente, se licuó el micelio y se ajustó a una dosis de  $1 \times 10^6$  propágulos infectivos con apoyo de cámara de Neubauer. De la solución micelial, se midió un mililitro de ésta y se sembró en medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar para observar las unidades formadoras de colonias y se realizó con la suspensión micelial de las diferentes cepas (seis).



**Figura 8.** Incremento de inóculo de deuteromicetos.

En invernadero se inocularon las plantas de aguacate de cinco meses de edad de la variedad Hass, provenientes de un vivero certificado. Las plantas fueron inoculadas con 250 ml de fragmentos de micelio a una concentración de  $1 \times 10^6$  ml, realizándolo para las 6 cepas de los diferentes municipios; con cuatro repeticiones por cepa, considerándose a cada planta como unidad experimental y 4 testigos absolutos, los cuales fueron tratados con agua destilada estéril; después de la inoculación las plantas se mantuvieron a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **Técnica de inoculación 2**

Producción del inóculo: Se recolectaron frutos maduros de un árbol de aguacate con injerto de la variedad Hass ubicado en el INIFAP Campo Experimental Uruapan, el cual presentaba alta sanidad, buen porte, vigor y los frutos estaban libres de daños por insectos y patógenos. Posteriormente los frutos se llevaron al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su plantación. A los frutos de aguacate se les retiró el mesocarpio y el endocarpio; se seleccionaron las semillas uniformes en cuanto a tamaño y se revisaron que no presentaran daños por plagas y enfermedades. Se realizó su desinfección, la cual consistió en sumergirlas en agua caliente a temperatura de  $48 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 30 minutos, lo anterior con la finalidad de eliminar posibles infecciones de microorganismos y mantener su viabilidad (Ohr *et al.*, 1991). Las semillas se transfirieron a agua destilada estéril para bajar la temperatura. Cada semilla se sembró en sustrato compuesto por arena y Peat moss (2:1). El suelo se esterilizó a 15 lbs de presión por lapsos de dos horas y se repitió este procedimiento tres veces con tiempos muertos de 24 h cada uno. El sustrato se vertió en vasos térmicos con capacidad de 1.5 litros previamente perforados en la base para el drenado del agua. Se colocó una semilla por vaso, se cubrieron con una capa de tres cm del sustrato, se colocaron en cámara bioclimática para su desarrollo a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con riegos cada tercer día y fotoperiodo controlado (10: 14 L/O). La producción del inóculo se realizó replicando las cuatro cepas en cajas Petri con medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar clarificado, con 9 repeticiones

por cada uno de los aislados, se incubaron a 28°C en oscuridad total por 10 días, hasta obtener micelio abundante.

### **Inoculación e incubación**

Las cepas se inocularon por triplicado en plántulas de aguacate con seis hojas verdaderas. La técnica de inoculación empleada fue la descrita por Ochoa (2000) con ligeras modificaciones. En campana de flujo laminar se pesaron 500 mg de micelio de colonias con 10 días después de sembradas en medio de cultivo V8®-Agar, se fraccionó el micelio durante 10 minutos en 150 ml de agua destilada estéril, de ésta solución se tomaron alícuotas de 50 ml y se vertieron en frascos de cristal previamente esterilizados, los cuales contenían 100 ml de agua destilada estéril.

Las raíces de las plántulas fueron lavadas con agua destilada estéril para eliminar los residuos del sustrato. Posteriormente se introdujeron en frascos que contenía la solución de cada aislado, se colocó una planta por frasco, se selló con papel aluminio y Kleen-Pack® para evitar la entrada de otro patógeno. Las plantas se mantuvieron en cámara bioclimática a 24°C con el fotoperiodo antes mencionado, al término de la evaluación se recuperó el patógeno en los medios descritos previamente.

### **Evaluación de la tasa de crecimiento en medio de cultivo V8®- Agar**

Se sembraron explantes de 5 mm de diámetro con apoyo de un sacabocados, tomados del margen de un crecimiento vigoroso de una colonia pura de 8 días después de la siembra y se colocaron al centro de una caja Petri de 8.5 cm de diámetro con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar, Bioxon®) y V8®-PARPH. Las cajas se sellaron y se incubaron en cámara bioclimática donde crecieron como aislamiento puro a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  en oscuridad total; las lecturas se tomaron cada 24 h en seis puntos equidistantes, previamente marcados en las cajas Petri y se midió el diámetro de crecimiento de la colonia con un vernier digital. Los resultados obtenidos se consignaron con base en la especie en

función al tiempo en horas, se realizó una regresión lineal mediante GLM (Modelos lineales generalizados), para obtener los parámetros de intercepto y pendiente (velocidad de crecimiento), significancia de la regresión y el valor de  $R^2$  ajustada. Para determinar la especie con mayor crecimiento, se seleccionaron los datos de los diámetros a las 72 horas, posteriormente se realizó un ANOVA ( $F_{5,66}$ ) con un  $\alpha=0.05$  y se compararon las medias mediante la prueba Scheffe, con el programa estadístico R 3.2.

### **Evaluación de la tolerancia de los fitopatógenos asociados a la tristeza del aguacatero, en medio selectivo PARPH**

Se sembraron explantes de 5 mm de diámetro con apoyo de un sacabocados, tomados del margen de un crecimiento vigoroso de una colonia pura de 8 días después de la siembra de cada fitopatógeno aislado de plantas que presentaron la sintomatología de la tristeza del aguacate y se colocaron al centro de una caja Petri de 8.5 cm de diámetro, con cuatro repeticiones en medio de cultivo selectivo V8<sup>®</sup>- PARPH de 25-200 ppm y un testigo para cada fitopatógeno en medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar, por último las cajas se sellaron y se incubaron en cámara bioclimática donde crecieron como aislamiento puro a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  en obscuridad total; las lecturas se tomaron cada 24 h en seis puntos equidistantes, previamente marcados en las cajas Petri y se midió el diámetro de crecimiento de la colonia con un vernier digital. El porcentaje de inhibición se obtuvo considerando el crecimiento del testigo, empleando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del testigo} - \text{Diámetro del tratamiento}}{\text{Diámetro del tratamiento}} * 100$$

Los resultados del porcentaje de inhibición se sometieron a un análisis probit para determinar la concentración inhibitoria media y sus intervalos de confianza y se obtuvieron las curvas de respuesta concentración-inhibición; por último se seleccionó la inhibición de todos los fitopatógenos a las 72 horas, se transformaron los datos mediante arcoseno, y se sometió a un análisis de

varianza mediante un diseño experimental completamente al azar y se compararon la medias mediante la prueba de Scheffe ( $\alpha=0.05$ ), los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico R 3.2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento e identificación morfológica de los fitopatógenos

De los muestreos realizados en los principales municipios de la franja aguacatera del estado de Michoacán (Uruapan, Tancítaro, Peribán y San Juan Nuevo Parangaricutiro, se lograron obtener diferentes especies, las cuales se presentan en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Especies aisladas en los diferentes municipios muestreados.

Municipio	Especie	Método de Aislamiento*
Peribán	<i>Mortierella elongata</i>	Raíz
	<i>Fusarium solani</i>	Raíz
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Manzana
	<i>Phytopythium vexans</i>	Manzana
	<i>Pythium sp. amazonianum</i>	Manzana
Tancítaro	<i>Mortierella elongata</i>	Raíz
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Raíz/Manzana
	<i>Phytopythium vexans</i>	Raíz/Manzana
	<i>Pythium sp. amazonianum</i>	Manzana
	<i>Mortierella elongata</i>	Raíz
Uruapan	<i>Phytopythium vexans</i>	Manzana
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Manzana
	<i>Mortierella elongata</i>	Raíz
San Juan Nuevo	<i>Phytopythium vexans</i>	Manzana
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Raíz/Manzana
	<i>Mortierella elongata</i>	Raíz

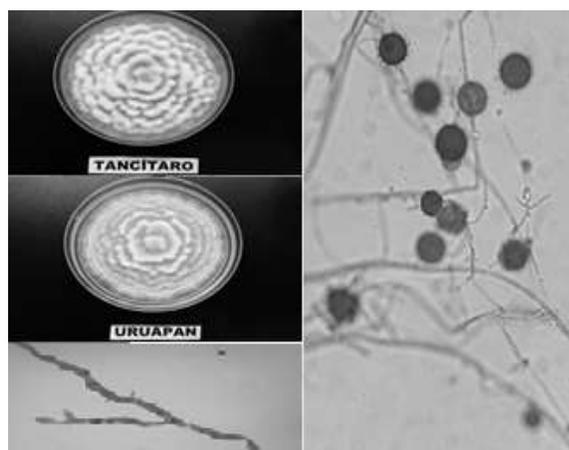
\*Aislamiento de raíz empleando la metodología de Erwin y Ribeiro (1996) y el aislamiento de manzana mediante la metodología de trapeo establecida por Campbell (1949).

En el cuadro 3, se observa que los géneros *M. elongata* y *F. solani* el aislamiento más efectivo fue por medio de raíz de árboles que presentaron la sintomatología de la tristeza del aguacate, Gualdrón *et al.*, (1997), realizó muestreos en bosques de Bogotá, Colombia y en el total de sus aislados reporta que el género *Mortierella humilis* presentó el porcentaje más alto de incidencia, también reporta otras especies de *Mortierella* como *M. vinacea* y *M. minutissima*, y en su

investigación destaca que el género *Fusarium* fue el patógeno en segundo lugar de incidencia. Lo anterior concuerda con los aislados obtenidos en nuestro trabajo, ya que la altitud, clima y tipo de vegetación es similar con los diferentes municipios muestreados en la franja aguacatera del estado Michoacán. Para el aislamiento de los oomicetos *P. cinnamomi*, *Phytophthium vexans* y *Pythium sp. amazonianum*, la metodología más efectiva fue el trapeo por manzana (Campbell, 1949), lo anterior coincide con lo reportado por Ochoa (2006), ya que con esta metodología aisló más de 40 cepas del oomiceto *P. cinnamomi* en los municipios de Peribán, Tancítaro, San Juan Nuevo Parangaricutiro, Uruapan y Salvador Escalante, todos pertenecientes al estado de Michoacán.

### ***Mortierella elongata***

Las diferentes cepas obtenidas de esta especie presentaron crecimiento característico arrosado o en forma de camelia muy similar al tipo de crecimiento de *P. cinnamomi*. Sin embargo, el micelio tiende a septarse 15 días después de la siembra en medio de cultivo (PDA), presentó micelio aéreo algodónoso, hialino, hifas septadas, esporangio y esporangiosporas de 1-4  $\mu\text{m}$  y 0.5-1  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 9). Presentaron una temperatura óptima de crecimiento a 28°C y nuestros aislados coincidieron con lo reportado en las claves de identificación propuestas por Zimmermann, (1942) y Wagner L *et al.*, (2013).



**Figura 9.** Características morfológicas de *M. elongata*.

### ***Fusarium solani***

Las cepas obtenidas de *F. solani* presentaron micelio característico hialino y septado; transcurridos 8 días el micelio presentó coloración beige, al microscopio se observaron fialides largas y microconidia *in situ* (Figura 10), macroconidias con célula basal redondeada y pobremente desarrollada, célula apical redondeada. Coincidiendo por lo reportado por Cock, (1998); Leslie y Summerell (2006).



**Figura 10.** Estructuras de *F. solani*.

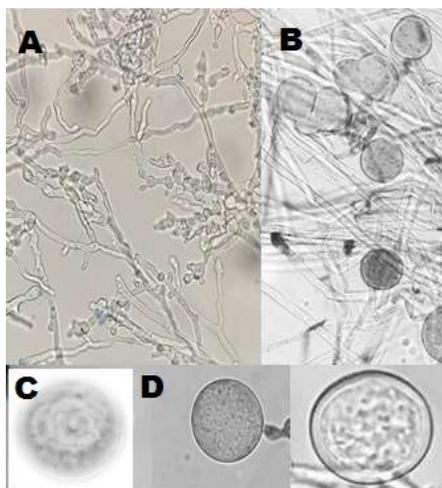
### **Oomicetos**

Hasta hace algunos años el principal oomiceto causante de la enfermedad que ocasionó el colapso de la región aguacatera en el estado de Querétaro (Téliz, 2000) era *Phytophthora cinnamomi*. Sin embargo, derivado de los muestreos realizados en el presente trabajo, se logró identificar a los oomicetos *Phytophthora vexans* y *Pythium sp. amazonianum*.

### ***Phytophthora cinnamomi***

Los aislados obtenidos de este fitopatógeno aislado de la franja aguacatera del estado de Michoacán, de árboles de aguacate y observados bajo microscopio compuesto, presentaron micelio cenocítico (6-7  $\mu\text{m}$ ) con hinchamientos en las hifas, anteridio anfígeno y presentó abundante formación y germinación de clamidosporas (37  $\mu\text{m}$ ) con la característica típica de pared gruesa (Figura 11). Las diferentes cepas de este oomiceto variaron en tasa de crecimiento y con base

en a las estructuras morfológicas se coincidió ampliamente con lo reportado por Erwin y Ribeiro (1996).



**Figura 11.** Estructuras de *P. cinnamomi*.

A: Micelio característico e hinchamientos hifales, B: Germinación de clamidosporas, C: Micelio característico, D: Clamidosporas.

### ***Phytophthium vexans***

Las cepas aisladas procedentes del estado de Michoacán presentaron micelio hialino y algodonoso, hifas no septadas, oogonios con su anteridio, esporangios de circular a globosos (Figura 12), coincidiendo con la descripción mencionada por Lévesque & Cock (2004). El género *Phytophthium* (*Peronosporales*) recientemente descrito Lévesque & Cock (2004), es morfológicamente intermedio entre el género *Phytophthora* y *Pythium*. Este subtipo perteneciente al clade k, Cock *et al.*, (2015) observaron especies de *Pythium* y concluyeron por análisis filogenéticos que había diferencias del resto de los *Pythium spp.* esta especie mostraba características combinadas tanto de *Pythium* y *Phytophthora*. La reclasificación filogenética de especies pertenecientes al clade K ha sido reconocida desde el principio, basada en las secuencias. Briard *et al.*, (1995) y Cooke *et al.*, (2000) demostraron que *Pythium vexans* era claramente diferente de otros *Pythium spp.* y *Phytophthora* utilizando la subunidad ribosómica grande (LSU) y el espaciador transcrito interno (ITS), respectivamente. En un estudio de múltiples genes, de igual forma Villa *et al.*, (2006) demostraron que las especies

de *Pythium* pertenecientes al clade K estaban estrechamente relacionados con *Phytophthora*. La diferenciación morfológica infiere que es el único que presenta esporangios papilados y anteridios cilíndricos o lobulados.

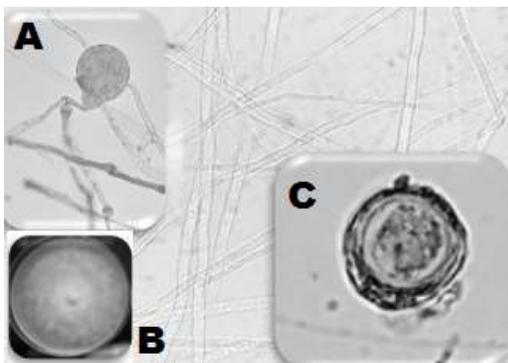


**Figura 12.** Morfología de *Phytopythium vexans*.

A: Esporangio papilado subgloboso, B: Oogonio con anteridio.

### ***Pythium* sp. amazonianum**

El fitopatógeno *P. sp. amazonianum* se observó bajo microscopio compuesto, en el cual se pudo detectar micelio hialino y algodonoso, hifas no septadas, observando oogonios con su anteridio, así como esporangios de circular a globosos (Figura 13); coincidiendo con lo reportado por Levesque & De Cock (2004) y Bala *et al.*, (2010). Cabe destacar que no existe mucha información de este fitopatógeno. Sin embargo, Spies *et al.*, (2011) proponen que *Pythium* sp. *amazonianum* se reconozca como una nueva especie dentro del género *Pythium*.



**Figura 13.** Morfología de *P. sp. amazonianum*.

### Identificación molecular

Los productos de la secuenciación fueron comparados con las secuencias registradas en la base de datos del GenBank (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA.

Cepa <sup>1</sup>	No. de acceso <sup>2</sup>	Especie	Similaridad <sup>3</sup>	Origen <sup>4</sup>
P5-3	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
P5-4	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
P1	KP183223.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Australia B
P5	EU003445	<i>P. sp. amazonianum</i>	99%	Selva Ecuador
S4-39	LM651019.1	<i>Phytopythium vexans</i>	99%	Islas Canarias
P4-40	HQ853459.1	<i>Phytopythium</i>	99%	México S
U2-38	HQ853463.1	<i>Phytopythium</i>	99%	México S
U4-35	LM651020.1	<i>Pythium vexans</i>	99%	Islas Canarias
U6-36	LM651020.1	<i>Pythium vexans</i>	99%	Islas Canarias
S1-37	LM651020.1	<i>Pythium vexans</i>	99%	Islas Canarias
T3	KC018241.1	<i>Mortierella elongata</i>	99%	**
U5	FJ161921.1	<i>Mortierella elongata</i>	99%	**
SJN6	FJ161928.1	<i>Mortierella elongata</i>	99%	**
T6	FJ161928.1	<i>Mortierella elongata</i>	99%	**
P1	FJ161928.1	<i>Mortierella elongata</i>	99%	**

### Pruebas de patogenicidad

#### *Mortierella elongata*

Los resultados obtenidos de esta prueba de patogenicidad en árboles de aguacate de 5 meses de edad, no presentó sintomatología relacionada con la

enfermedad de la tristeza del aguacate (Figura 14), pese a que se mantuvo en observación diaria por más de seis meses.



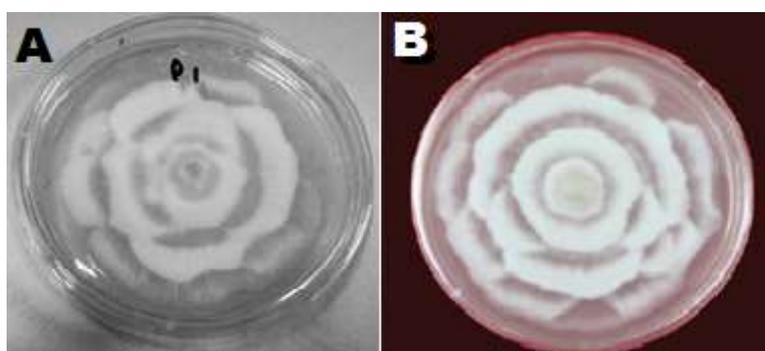
**Figura 14.** Plantas de aguacate Hass inoculadas con *M. elongata*.

Sin embargo, los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad de *M. elongata* siguiendo la metodología descrita por Ochoa en el 2000, con plántulas de aguacate de seis hojas verdaderas, fueron resultados positivos, las plántulas de aguacate mostraron síntomas similares a la enfermedad de la tristeza del aguacatero. Transcurridas 48 h después de la inoculación se presentó un decaimiento de la parte apical, seguido de un amarillamiento, el cual se fue intensificando día a día. Cinco días después las hojas comenzaron a marchitarse hasta secarse completamente, en el tallo se presentó un amarillamiento pero no logró marchitarse completamente y en el sistema radicular se observó un cambio en la coloración a café oscuro y tuvo presencia de micelio abundante en las raicillas (Figura 15). Se concluyó la evaluación reaislando el patógeno para corroborar que fuera el causante de la sintomatología descrita y cumplir con los postulados de Koch.



**Figura 15.** Sintomatología causada por *M. elongata*.

Lara *et al.*, (2013), evaluaron diferentes cepas de *P. cinnamomi* con la misma técnica de inoculación que se utilizó en la presente investigación y reportan diferentes grados de severidad, en su cepa menos agresiva describieron sólo síntomas de flacidez sin causar la muerte de la planta. Sin embargo, las características morfológicas a simple vista de su aislado presentan similitud a nuestras cepas de *M. elongata* (Figura 16), cabe destacar que en su trabajo de investigación no se menciona la identificación de sus aislados por técnicas moleculares, es aquí la importancia de realizar identificación molecular con la finalidad de corroborar hasta especie.



**Figura 16.** Comparación de A: *M. elongata* y B: *P. cinnamomi*.

Fuente “B”: Lara, (2013).

### **Oomicetos**

Para las pruebas de patogenicidad de *Phytophthium vexans* y *Pythium sp. amazonianum*, se empleó la técnica descrita para *P. cinnamomi*, partiendo de que estos fitopatógenos pertenecen a la misma clase.

#### ***Phytophthium vexans***

Los resultados derivados de la prueba de patogenicidad de *Phytophthium vexans* en plántulas de aguacate de seis hojas verdaderas, al transcurrir 24 horas después de la inoculación, se presentó un decaimiento en la parte apical, seguido de un amarillamiento en las hojas y 15 días después el aislado identificado con la nomenclatura S4-39 (*Phytophthium vexans*) causó una marchitez total de las plántulas inoculadas (Figura 17). En el sistema radicular se observó un necrosamiento, en algunos casos mayor a nuestro testigo inoculado con *P.*

*cinnamomi* y al finalizar la evaluación se aisló el patógeno, confirmando que *P. vexans* fue el agente causal. La sintomatología mostrada por el fitopatógeno *Phytophthium vexans* se asemeja a lo reportado por Mora *et al.*, (2007) para el oomiceto *P. cinnamomi* y Bonilla *et al.*, (2007) reporta que en la región de Andalucía, España en árboles de aguacate detectó en sus aislamientos la presencia frecuente de *Phytophthium vexans*, al realizar pruebas de patogenicidad, logró reproducir los síntomas observados en campo y asociados a *P. cinnamomi*.



**Figura 17.** Sintomatología causada por *Phytophthium vexans*.

### ***Pythium sp. amazonianum***

Después de 24 horas de realizar la inoculación con el patógeno *P. sp. amazonianum*, algunas plantas presentaron un decaimiento en la parte apical, seguido de una marchitez generalizada en hojas y tallo, una de las repeticiones mostró decaimiento y defoliación total (Figura 18) en un lapso de 48 h. al término de la evaluación (6 días) el tallo defoliado siguió turgente con presencia de yemas axilares; en el sistema radicular se observó un necrosamiento mayor a nuestro testigo inoculado con *P. cinnamomi*. Sin embargo, se obtuvieron resultados dispares ya que ocasiona sintomatología de la tristeza del aguacate, no obstante no logró matar el total de las plantas. La sintomatología mostrada por el fitopatógeno *P. sp. amazonianum* se asemeja a lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2014) para el oomiceto recientemente clasificado como *Phytophthium vexans*,

mencionando que los resultados con *Phytophthium vexans* fueron dispares ya que uno de los aislados ensayados produjo una necrosis radicular tan severa como *P. cinnamomi*, otro fue moderadamente patogénico y los cuatro restantes no causaron daños . Cabe mencionar que Spies *et al.*, (2011) infiere que el patógeno evaluado (*Pythium sp. amazonianum*) se debe considerar como una nueva especie del género *Pythium*, esto debido a las diferencias morfológicas en las estructuras observadas y en los análisis filogenéticos realizados.



**Figura 18.** Sintomatología causada por *Pythium sp. amazonianum*.

### **Evaluación de la tasa de crecimiento de fitopatógenos en medio de cultivo V8®- Agar**

Debido a que existe un complejo de hongos asociados a la enfermedad conocida como la tristeza del aguacatero en el estado de Michoacán y a la fecha se cuenta con poca información de su actividad en el medio edáfico, es necesario conocer su dinámica de desarrollo, partiendo de la temperatura óptima de crecimiento (28°C) de *P. cinnamomi* que señalan en diferentes trabajos de investigación Erwin y Ribeiro (1996) y Zentmyer (1983).

En nuestra evaluación de la tasa de crecimiento de los fitopatógenos presentes en aislados de raíz y de suelo, de muestras provenientes de los principales

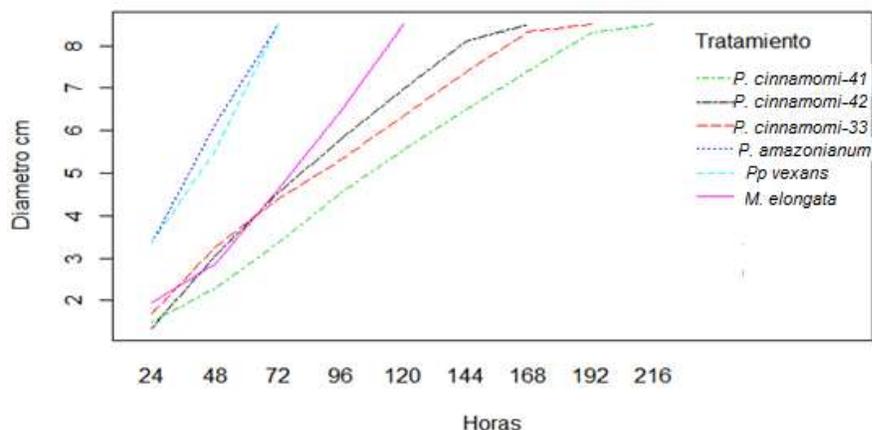
municipios de la franja aguacatera del estado de Michoacán, obtuvimos diferentes velocidades de crecimiento en función del tiempo en horas (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Tasa de crecimiento de las diferentes especies y cepas aisladas en medio de cultivo V8®-Agar.

Coeficientes de las regresiones						
Tratamiento	Intercepto	Parámetro <sup>a</sup>	Parámetro <sup>b</sup>	SD*	P-valor	R <sup>2</sup> ajustada
1	0.672	0.106	2.544	0.002	< 0.001	0.984
2	0.875	0.107	2.568	0.001	< 0.001	0.991
3	1.216	0.041	0.984	0.001	< 0.001	0.973
4	0.643	0.05	1.2	0.001	< 0.001	0.958
5	-0.106	0.069	1.656	0.001	< 0.001	0.982
6	0.661	0.038	0.912	0.001	< 0.001	0.981

<sup>a</sup>: velocidad de crecimiento en horas, <sup>b</sup>: velocidad de crecimiento en días, \*: desviación estándar del parámetro. <sup>1</sup>*Pp vexans*, <sup>2</sup>*P. sp. amazonianum*, <sup>3</sup>*P. cinnamomi-33*, <sup>4</sup>*P. cinnamomi-42*, <sup>5</sup>*M. elongata* y <sup>6</sup>*P. cinnamomi-41*.

Se observa en el cuadro anterior que la especie con crecimiento más agresivo fue *P. sp. amazonianum* con 2.56 cm por día, seguida de *Pp. vexans* con 2.54 cm por día. Esto coincide con lo reportado por Domsch *et al.*, (1980) al mencionar que la tasa de crecimiento de *Pythium sp.* es mayor a la de *Phytophthora sp.* en muchos medios de cultivo comunes. Las cepas evaluadas de *P. cinnamomi* y *M. elongata* tuvieron un comportamiento similar, como se aprecia en la figura 19. Hardham *et al.* (1991), obtuvieron un crecimiento micelial óptimo de *P. cinnamomi* al evaluarlo a los 28°C y nuestras cepas tuvieron un crecimiento similar a lo reportado por Andrade (2012), quien obtuvo en la evaluación de sus cepas de *P. cinnamomi* un crecimiento de hasta 0.055 mm por hora.



**Figura 19.** Evolución temporal del diámetro de crecimiento de las diferentes especies evaluadas en medio V8®-Agar.

Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Scheffe (cuadro 6), se corroboró lo antes mencionado, obtuvimos tres grupos diferentes (a, b y c); el primero, conformado por *Pythium sp. amazonianum* y *Phytophythium vexans*, cepas que llenaron en su totalidad las cajas Petri en menos de 72 h (Figura 19); el segundo grupo lo integraron las cepas de *P. cinnamomi-33*, *P.cinnamommi-42* y *M. elongata*, destacando que *M. elongata* es un deuteromiceto; y el último grupo que registró desarrollo más lento en esta evaluación *in vitro* fue *P. cinnamomi-41*.

**Cuadro 6.** Comparaciones de medias del crecimiento de las especies evaluadas en medio de cultivo V8®-Agar a las 72 horas, mediante prueba Scheffe ( $\alpha= 0.05$ ).

Especie	n	Media	SD	Agrupación*
<i>Phytophythium vexans</i>	12	8.5	0	a
<i>Pythium sp. amazonianum</i>	12	8.5	0	a
<i>P. cinnamomi-33</i>	12	4.408	0.211	b
<i>P. cinnamomi-42</i>	12	4.535	0.268	b
<i>Mortierella elongata</i>	12	4.617	0.132	b
<i>P. cinnamomi-41</i>	12	3.357	0.145	c

\*Cepas con diferente letra son estadísticamente significativas.

## Evaluación de la tolerancia de los fitopatógenos asociados a la tristeza del aguacatero, en medio selectivo PARPH

En el cuadro 7, se observa que los patógenos evaluados presentan diferentes concentraciones para inhibir el 50% de su crecimiento. *M. elongata* resultó ser el aislado con mayor susceptibilidad al requerir concentraciones muy bajas; para el caso de *Pythium sp. amazonianum* su concentración inhibitoria media está por debajo de los 50 ppm, distinto a *Phytopythium vexans* y *P. cinnamomi*, los cuales requieren concentraciones arriba de 50 ppm para inhibir el 50% de su desarrollo, siendo *P. cinnamomi* la que requiere mayor concentración respecto a los demás fitopatógenos.

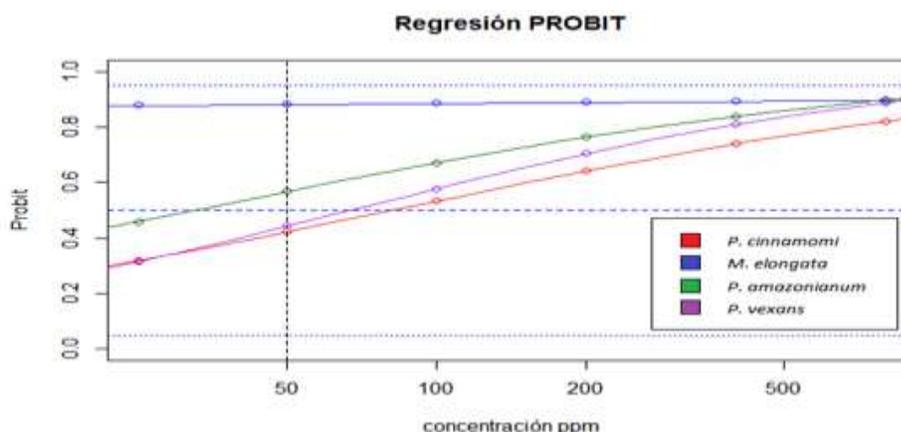
**Cuadro 7.** Concentración efectiva media de las diferentes cepas en medio de cultivo selectivo PARPH.

CEPA	N	GL	P	PPM				
				DE50	CURVA	IC 95%	DE05	DE95
1	72	5	< 0.01	80.9506	Y=-1.76+0.92x	60.433-103.722	1.356	4831.186
2	72	5	< 0.05	3.47E-20	Y=1.094+0.056X	0.000-1.97e-09	1.98E-49	6.10E+09
3	72	5	< 0.01	32.439	Y=-1.37+0.91	18.805-46.903	0.508	2071.505
4	72	5	< 0.01	66.898	Y=-2.061+1.129	33.421-106.134	2.336	1915.481

1: *P. cinnamomi*, 2: *M. elongata*, 3: *P. sp. amazonianum*, 4: *Pp. Vexans*, N: número de observaciones, GL: grados de libertad, DE: dosis efectiva media, IC: intervalos de confianza.

Erwin y Ribeiro (1996) en una evaluación realizada con un gran número de diferentes géneros y especies reportados como sensibles y moderadamente resistentes al ingrediente activo del Hymexazol, en el medio de cultivo semiselectivo (PARPH), hacen mención de algunas especies del género *Mortierella* son sensibles al Hymexazol; sin embargo, en la presente investigación se demuestra que *M. elongata* es sensible al Hymexazol como se observa en la figura 20; mientras que los oomicetos *Pythium sp. amazonianum* y *Phytopythium vexans* mostraron ser altamente resistentes al Hymexazol. Con lo anterior

demostramos que no se puede aislar únicamente a *P. cinnamomi* en medio selectivo PARPH a las 72 horas.



**Figura 20.** Dosis efectiva media de Hymexazol en los diferentes aislados.

Para corroborar lo antes mencionado, se compararon los diámetros de crecimiento a las 72 horas (Cuadro 8) de los diferentes fitopatógenos, en donde *Pythium sp. amazonianum* y *Phytophythium vexans*, registran mayor crecimiento, incluso superior a *P. cinnamomi* en medio selectivo PARPH, siendo *M. elongata* la especie totalmente inhibida. Tsao y Guy (1977) obtuvieron resultados similares a la presente investigación, ya que lograron inhibir con Hymexazol aislados de *Mortierella sp*; de igual forma para *Pythium ultimum*, en nuestra evaluación se demostró que *Pythium sp. amazonianum* y *Phytophythium vexans* son altamente resistentes al Hymexazol.

**Cuadro 8.** Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del diámetro de crecimiento a las 72 horas en medio selectivo PARPH a 50 ppm.

CEPA	N	MEDIA	SD	GRUPO
<i>P. amazonianum</i>	16	3.808	0.215	a
<i>Pp. Vexans</i>	16	5.415	0.127	a
<i>P. cinnamomi</i>	16	2.173	0.200	b
<i>M. elongata</i>	16	0.500	0.000	c

N: Número de observaciones, SD: Desviación estándar, \*: Cepas con diferente letra son estadísticamente significativas.

## CONCLUSIONES

- Se comprueba que existe un complejo de fitopatógenos asociados a la enfermedad conocida como la tristeza del aguacatero: *Phytopythium vexans*, *Pythium sp. amazonianum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Mortierella elongata* y *Fusarium solani*.
- Se obtienen dos primeros reportes de los Oomicetos *Phytopythium vexans* y *Pythium sp. amazonianum* para los municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán, comprobando su patogenicidad en plántulas de aguacate con seis hojas verdaderas.
- Se obtiene el primer reporte del Deuteromiceto *Mortierella elongata* para los municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán, comprobando su patogenicidad en plántulas de aguacate con seis hojas verdaderas.
- Los fitopatógenos *Phytopythium vexans* y *Pythium sp. amazonianum* presentan una mayor tasa de crecimiento que *P. cinnamomi* y una patogenicidad similar a *P. cinnamomi*, expresando la sintomatología de la tristeza del aguacatero.
- Se reporta que *Phytopythium vexans* y *Pythium sp. amazonianum* son nuevos géneros altamente resistentes al Hymexazol.

## REFERENCIAS

- AALPAUM. (2016). Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate de Uruapan, Michoacán. Disponible en <http://www.aalpaum.com/>, consulta realizada en enero 2016.
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S. (2003). Characterization of Colletotrichum Isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus. *Phytopathology*, 93(5), 579-587. doi:10.1094/phyto.2003.93.5.579
- Andrade, H. (2012). Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a Phytophthora cinnamomi Rands usando temperaturas controladas. *Spanish Journal of Rural Development Span. J. Rural Dev.*, 23-30. doi:10.5261/2012.gen4.03
- APEAM. (2012). Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán. Disponible en <http://www.apeamac.mx>.
- APEAM. (2014). Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán. Disponible en <http://www.apeamac.mx>
- Arnold, G. R. (1989). Barnett, H. L.; B. B. Hunter: Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. V 218 S. Macmillan Publishing Co., New York, and Collier Macmillan, London, 1987. ISBN 0-02-306395-5. *Feddes Repert Feddes Repertorium*, 100(9-10), 566-566. doi:10.1002/fedr.4911000913
- Bala K, Robideau GP, Levesque CA, De Cock AWAM, Abad ZG, Lodhi AM, Shahzad S, Ghaffar A, Coffey MD. (2010). *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau & Levesque, gen. nov. and *Phytopythium* sindhum Lodhi, Shahzad & Levesque, sp. nov. *Persoonia* 24: 136e137.

- Barrientos, PAF; López, LL. (2000). Historia y genética del aguacate. In: Téliz, OD; Gonzales, RH; Dromundo, R. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, Méx. p. 19-31.
- Bartnicki-Garcia, S. and Wang, M. C. (1983). Biochemical aspects and morphogenesis in *Phytophthora* Jin: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, pp. 121-137.
- Bergh, BO; Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 70:135-146.
- Besoian CX, Piontelli LE. (1999). Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. Boletín Micol. 14:41–47.
- Booth C. (1966). The Genus *Cylindrocarpon*. Kew Surrey England, Commonwealth Mycology Institute, pp 56.
- Briard, M., Dutertre, M., Rouxel, F., & Brygoo, Y. (1995). Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. *Mycological Research*, 99(9), 1119-1127. doi:10.1016/s0953-7562(09)80782-x
- Brom, R.E. (1970). Pudrición de la raíz del aguacate. *El Aguacate*. 283-284 pp.
- Campbell, W.A. (1949). A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. *Plant Disease Reporter* 33:134-135.
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A., & Samuels, G. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68, 57-78. doi:10.3114/sim.2011.68.03

- Coffey, MD. (1991). Cause and diagnosis Avocado root rot. *California Grower* 15(3): 17,22-23.
- Coffey MD. (1992). *Phytophthora* root rot of avocado. In *Plant* 22: 423-444.
- COMA. (2005). Censo de aguacate en Michoacán. Comisión Michoacana del Aguacate, Plan Rector del Sistema Producto Aguacate. Uruapan, Mich. 115 p.
- Cock, A. D., Lodhi, A., Rintoul, T., Bala, K., Robideau, G., Abad, Z. G., . . . Lévesque, C. (2015). *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi Pers- Int Mycol J*, 34(1), 25-39. doi: 10.3767/003158515x685382
- Cooke, D., Drenth, A., Duncan, J., Wagels, G., & Brasier, C. (2000). A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1), 17-32. doi:10.1006/fgbi.2000.1202
- Coria, AVM. (2009). Tecnología para la Producción de Aguacate en México. "2da. Edición. SAGARPA-INIFAP. Uruapan, Michoacán, México 222p.
- Dann, E., Forsberg, L., kooke, A., Pegg, K., Shivas, R., Tan, Y. (2011). The "Cylindro" complex of avocado root pathogens. En *Memorias del VII Congreso Mundial del Aguacate*. Cairns Australia. P 1-12.
- Darvas JM. (1979). Ecology of avocado root pathogens. *South African Avocado Growers Association Yearbook* 3, 31-32.
- Darvas JM and Becker O. (1984). Failure to control *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium splendens* with Metalaxyl after its prolonged use. *South African Avocado Growers Association Yearbook*7, 77-78.
- Dick MW. (1990). *Keys to Pythium*. Dick MW (Ed) Department of Botany, University of Reading, Reading, UK, 64 pp.

- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press.
- Doyle, J. J and J. L. Doyle, (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Erwin, D.C., and O. K. Ribeiro, (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. xi-xii, 269-276 pp.
- FAOSTAT. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database consulted on January 2016: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>
- Fierro, C. D. (2011). Etiología y manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán. Montecillo. Texcoco, Edo. de México. Colegio de Posgraduados 18 p.
- Freeman, S., T. Katan, and E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*. 82: 596-605. doi:10.1094/pdis.1998.82.6.596
- Gallegos, ER. (1983). Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacán. Univ. Autónoma. Grupo Edit. Gaceta, S.A. Chapingo, Méx. 317 p.
- García E. (1981). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Adaptado para las Condiciones de la República Mexicana. 3ª Ed. Offset., Lario Ed. S.A. 252p.
- Gualdrón A. C. Suárez N. A. Valencia Z. H. (1997). Hongos Del Suelo Aislados de Zonas de Vegetación Natural del Páramo de Chisaca, Colombia. *Revista Caldasla* 19(1-2): 235-245, Vol. 19. Nos. 1-2.
- Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, Crous PW. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated

with black foot disease of grapevine (*Vitis* spp.). *Study Mycology* 50:431–455.

Hardham, A. R., Gubler, F., Duniec, J., & Elliott, J. (1991). A review of methods for the production and use of monoclonal antibodies to study zoosporic plant pathogens. *Journal of Microscopy*, 162(3), 305-318. doi:10.1111/j.1365-2818.1991.tb03142.x

Harvey JV. (1945). Fungi associated with decline of avocado and citrus in California. *The Plant Disease Reporter* 29, 110-113.

Heitefuss, R. (2009). *Phytophthora*: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. *Journal of Phytopathology*, 157(7-8), 520-520. doi:10.1111/j.1439-0434.2008.01527.x

Hendrix, F. F., & Campbell, W. A. (1973). *Pythiums* as Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol. Annual Review of Phytopathology*, 11(1), 77-98. doi:10.1146/annurev.py.11.090173.000453

Ho, H. H., & Zentmyer, G. A. (1977). Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, 69(4), 701-713. Doi: 10.2307/3758860

Jenkins AE. (1934). A species of *Sphaceloma* on avocado. *Phytopathology* 24, 84-85.

Lara, C. B. N. Ávila V. T. C. Morelos, R. J. L. Pacheco, B. L. E. Guillén, A. H. Vargas, S. M. (2013). Patogenicidad de *Phytophthora* spp. en aguacate mexicano *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S.F. Blake. Congreso Tópicos Selectos en Agricultura Tropical. Vol. 2., Villa Hermosa, Tabasco, México, 115-124 pp.

Leslie JF and Summerell BA. (2006). *The Fusarium Burkinafaso*. Laboratory manual. Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa.

- Lévesque, C. A., & Cock, A. W. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(12), 1363-1383. doi: 10.1017/s0953756204001431
- Llacer, G., López, M., M., Trapero, A. y Bello, A., (2000). Patología vegetal. Editorial Grupo Mundi Prensa. Segunda Edición. Tomo II impreso en España. p 724.
- Mantiri, F. R., Samuels, G. J., Rahe, J. E., & Honda, B. M. (2001). Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot. Revue Canadienne De Botanique Rev. Can. Bot. Canadian Journal of Botany*, 79(3), 334-340. doi:10.1139/cjb-79-3-334
- Mora, A., D. Téliz, O. D. G. Mora A. G. y Echevers J. D. B. (2007). Tristeza del aguacatero (*Phytophthora cinnamomi*). El aguacate y su manejo integrado. Segunda Edición. Ediciones Mundi Prensa. 192-202 pp.
- Ochoa F, Y.M. (2006). Variabilidad Genética y Patogénica de (*Phytophthora cinnamomi* rands) en Michoacán, México. Tesis doctoral. UAAAN. 104 pp.
- Ochoa, S.A. 2000. Mecanismos de diseminación de *Phytophthora cinnamomi*. Resumen de la ponencia presentada por el autor en el IV congreso mundial del aguacate. Uruapan Michoacán México.
- Ohr, H. D., Zentmyer, G. A., & Menge, J. A. (1991). *Avocado root rot*. Oakland, CA: Cooperative Extension, University of California Division of Agriculture and Natural Resources.
- Oliveira, R., J. Moral, K. Bouhmidi y A. Trapero. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp causantes de la antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas* 31:531-548.

- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Coates, L; Whiley, T. (2008). *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. P. 23-25 In: The Hon. Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australia Rural Woman of the Year Award 2008 to Mrs Ros Smerdon. Canberra. Vol. 19, num. 252 p.
- Pérez, J.R.M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. The European Journal of Plant Science and Biotechnology. 2, (1), 1-24pp.
- Pernezny K y Marlatt R. (2007). Diseases of avocado in Florida. Bolletín Florida Cooperative Extension Service PP21:3.
- Pineda, J., Principal, J., Barrios, C., Milla, D., Solano, Y., & Gil, E. (2010). Propiedad fungistática in vitro de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Zootecnia. Tropical*, 28, 83-91.
- Plaats-Niterink AJ van der. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 1– 242.
- Ploetz RC, Zentmyer GA, Nishijima WT, Rohrbach KG, Ohr HD. (1994). Compendium of Tropical Fruit Diseases, APS Press, St Paul, Minnesota, USA, 118 pp.
- Rodríguez, C; Rodríguez, A. y De la Rosa F.S. (2014). Patogenicidad en aguacate de Aislados Locales de Especies de *Phytophthora* y *Phytopythium*. Primera descripción de *Phytophthora niederhauserii* como Patógeno del Aguacate. XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología.
- Róndon, A., Suárez, Z., Figueroa, M. y Tellechea, V. (1988). Comportamiento de los patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de aguacate en Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 1:14-16.

- SAGARPA. (2015). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación. Sistema de Información agroalimentaria y pesquera. Boletín Informativo. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta 13 de abril de 2016.
- Sánchez, P.J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill) y especies afines en México. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:7-18.
- SIAP. (2014). Sistema de Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://www.siap.gob.mx> Fecha de consulta 20 de enero del 2016.
- Solel, Z. (1984). A Modified Selective Medium for Detecting *Phytophthora cinnamomi* on Avocado Roots. *Phytopathology*, 74(4), 506. doi:10.1094/phyto-74-506
- Spies, C. F., Mazzola, M., & Mcleod, A. (2011). Characterization and detection of Pythium and Phytophthora species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 103-119. doi:10.1007/s10658-011-9791-5
- Sutton, B. C. (1992). The genus *Glomerella* and its *Colletotrichum* anamorph. In: Bailey J.A., Jeger M.J. (eds) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CABI, Wallingford. pp. 1-28.
- Téliz, D y R. García. (1982). Manejo Integrado de la tristeza del aguacatero. X Congreso Nacional de Fitopatología. SMF. Resumen 55.
- Téliz, D., A. Mora, C. Velásquez, R. García, G. Mora, P. Rodríguez., J. Echevers., and S. Salazar. (1992). Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. Proc. Of Second World Avocado Congress: 79-87.

- Téliz, D. (2000). El Aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa, México, D. F. 219 p.
- Téliz Ortiz D, J F Marroquín Pimentel. (2007). Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. *In: El aguacate y su Manejo Integral Parcial. Segunda Edición. Téliz O D, A Mora (Cords). Editorial Mundi-Prensa. México, D. F. pp: 3-28.*
- Tsao, P.H., and S.O. Guy. (1977). Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora*-isolation Medium Containing Hymexazol. *Phytopathology* 67:796-801.
- Van der Plaats-Niterink J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21, 123 pp
- Vidales, F.J.A. Alcántar, R.J.J. Anguiano, C.J. (1994). Generación de un modelo de predicción de la roña *Sphaceloma perseae* Jenkins del aguacate *Persea americana* en Michoacán. *Memorias XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. P13.
- Vidales, F.J.A. (1996). Alternativas para el control de la tristeza del aguacatero *Persea americana* L. Causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Proceedings XXXVI Annual Meeting of the American Phytopathological Society Caribbean Division*.
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., & Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\alpha$ -tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98(3), 410-422. doi:10.3852/mycologia.98.3.410
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G., & Polizzi, G. (2011). First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160(3), 156-159. doi:10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x

- Wager, V. A. (1942). *Phytophthora cinnamomi* and wet soil in relation to the dying-back of avocado trees. *Hilgardia*, 14(9), 517-532. doi:10.3733/hilg.v14n09p517
- Wagner, L., Stielow, B., Hoffmann, K., Petkovits, T., Papp, T., Vágvölgyi, C., Voigt, K. (2013). A comprehensive molecular phylogeny of the *Mortierellales* (*Mortierellomycotina*) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi Pers - Int Mycol J*, 30(1), 77-93. doi:10.3767/003158513x666268
- Whiley AW, Schaer B y Wostlenholme BN. (2007). El Palto, botánica producción y usos. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Chile. 364 p.
- Zamora Magdaleno, Trinidad; Cárdenas, Elizabeth; Cajuste, Jacques F.; Colinas, María Teresa. (2001). Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. En fruto de aguacate HASS. *Agrociencia*, vol. 35, núm. 2, pp. 237-244
- Zea-Bonilla, T., González-Sánchez, M. A., Martín-Sánchez, P. M., & Pérez-Jiménez, R. M. (2007). Avocado Dieback Caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalucía Región, Spain. *Plant Disease*, 91(8), 1052-1052. doi:10.1094/pdis-91-8-1052b
- Zea-Bonilla T, Martín-Sánchez PM, González-Sánchez MA, Pérez-Jiménez RM. 2007b. *Neofusicoccum parvum* and *Pythium vexans*: new avocado pathogens detected in Andalucía. Book of Abstracts of the VI World Avocado Congress, November, 12-16, 2007, Viña del Mar, Chile, p 112.
- Zentmyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.

- Zentmyer, G.A. (1983). The world of *Phytophthora* in: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, pp. 1-7.
- Zentmyer G, Ohr H, Menge J. (1994). Compendium of tropical fruit diseases. The American Phytopathological Society; 76 p.
- Zilberstein M, Noy M, Levy E, Elkind G, Zeidan M, Teverovski E, Ben Zeev I. (2007). Wilting disease of young avocado trees caused by *Neonectria radicicola* in Israel. Proceedings VI World Avocado Congress 2007. Viña del Mar, Chile. 12–16 Nov. 2007.
- Zimmermann, W. (1942). Die Mucorineen-Gattung *Mortierella* Coemans. (Pflanzenforschung, herausgegeben von Prof. Dr. R. Kolkwitz, Berlin-Dahlem. Heft 23). Von Dr. Germaine Linnemann, Forstbotanisches Institut der Universität Göttingen in Hannover, München. Mit 8 Tafeln. 1941, Jena, Verlag von Gustav Fischer. III und 64 S., geh. 7.50 RM. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. Archiv Der Pharmazie*, 280(5), 210-210. doi:10.1002/ardp.19422800509

## Anexos

### Anexo 1. Elaboración de medio selectivo PARPH V8®-Agar

---

CaCO <sub>3</sub> (Sigma)	4 g	
Agar Bacteriológico	16 g	
Jugo V8®	200 mL	
Agua destilada estéril	800 mL	(Erwin, 1996)
Pentacloronitrobenceno (PCNB)	100 µ/ml	
Ampicilina (SIGMA®)	250 µ/ml	
Rifampicina (SIGMA®)	10 µ/ml	
Pimaricina (Natamicina®)	10 µ/ml	
Hymexazol (Tachigaren®)	25-50 µ/ml	

---

Cantidades para preparación de un litro de medio y se esterilizó a 120°C a 15 libras de presión por un lapso de 20 minutos.