

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



DETECCIÓN Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA RAÍZ EN  
EL CULTIVO DEL AGUACATE *Persea americana* MILL Y CARACTERIZACIÓN  
GENÉTICA DE SELECCIONES DE AGUACATE ALTERNATIVAS A LA  
VARIEDAD “HASS” EN MICHOACÁN, MÉXICO.

Tesis

Que presenta ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Julio 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DETECCIÓN Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA RAÍZ EN  
EL CULTIVO DEL AGUACATE *Persea americana* MILL Y CARACTERIZACIÓN  
GENÉTICA DE SELECCIONES DE AGUACATE ALTERNATIVAS A LA  
VARIEDAD "HASS" EN MICHOACÁN, MÉXICO.

Tesis

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

Una firma manuscrita en azul que parece ser 'Yisa María Ochoa Fuentes'.

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes  
Director (UAAAN)

Una firma manuscrita en azul que parece ser 'Moisés Alberto Cortes Cruz'.

Dr. Moisés Alberto Cortes Cruz  
Director Externo

Saltillo, Coahuila

Julio 2019

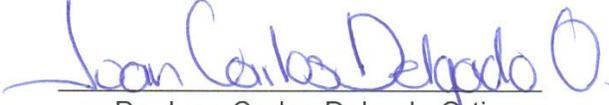
DETECCIÓN Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA RAÍZ EN  
EL CULTIVO DEL AGUACATE *Persea americana* MILL Y CARACTERIZACIÓN  
GENÉTICA DE SELECCIONES DE AGUACATE ALTERNATIVAS A LA  
VARIEDAD "HASS" EN MICHOACÁN, MÉXICO.

**Tesis**

Elaborada por ANSELMO HERNÁNDEZ PÉREZ como requisito parcial para  
obtener el grado de Doctor 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

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Mariana Beltrán Beache  
Asesor

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

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila

Julio 2019

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola.

A mi alma mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por brindarme cobijo durante todos estos años para alcanzar mis metas profesionales.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), por confiar en mí, para la realización de estudios de postgrado.

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

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez por su valioso apoyo en esta investigación y de tener una perspectiva amplia de lo que se puede desarrollar con los resultados obtenidos.

Al Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz y a la Dra. Mariana Beltrán Beache, por compartir sus experiencias del conocimiento y brindar aliento para culminar los objetivos propuestos.

Al Dr. Luis Mario Tapia Vargas por su amistad, por el apoyo en mi proyecto de investigación, por alentar mi superación profesional, por confiar en mí y por ser una guía en mi formación personal y académica estos últimos años.

Al Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz por el valioso apoyo brindado tanto económico como del conocimiento para poder culminar mi proyecto de investigación. Por su asesoramiento, ser una guía en mi formación académica y ejemplo a seguir.

A todos y cada uno de los catedráticos investigadores de mi alma mater que contribuyeron en mi desarrollo profesional, y contribuyeron para poder desarrollar y emprender proyectos académicos y personales.

A ustedes compañeros y amigos: Omegar, José Francisco, Roberto, Jazmine, Cesar Alejandro (de la UAAAN), a Blanquita, Carlos y Luis (del CNRG), que tuve la oportunidad de conocer, de convivir durante estos últimos años y que me apoyaron inmensamente en mi desarrollo profesional.

## Dedicatoria

A Dios, por haberme protegido durante todo este tiempo lejos de un hogar, el cual he añorado durante más de 10 años fuera de él. Por esos momentos de pensar, de análisis, por socorrerme para la toma de decisiones importantes en los ámbitos profesional y personales.

Escribo estas líneas con un gran cúmulo de emociones, lleno de un inmenso amor, cariño, respeto y admiración para reconocer a dos grandes personas, mis padres: **Germán Hernández Pérez y Enedina Pérez Gómez**, los cuales, me han guiado de la mejor manera en el transcurso de mi vida. Quiero que sepan que en los triunfos que he obtenido, ustedes siempre están presentes en mi mente, imaginándolos a mi lado y que en la distancia sé que comparten mis alegrías, por lo cual, mi pecho se estremece por querer apapacharlos y al mismo tiempo doy gracias a Dios por tener padres excepcionales, los más grandes, los mejores que mi Todopoderoso pudo haberme otorgado. Mil gracias, su hijo que los AMA.

A mi amada esposa, **Alma Mariana Padilla Martínez** y a esa semillita tan hermosa **Marianita Victoria**, que, pese a que no tenemos la dicha de poder abrazarla, ya la esperamos con la mayor alegría, entusiasmo y que desde el momento que supimos de su presencia hemos estado inmensamente felices como sólo ella lo puede lograr. Esposa, quiero que nunca olvides que agradezco a un Todopoderoso de tener la dicha de conocerte, que tengo a una gran mujer, mi Musa. Este objetivo lo alcanzo con esfuerzo y reconozco que tú has sido partícipe de él con tanto y gran apoyo brindado para culminar este ciclo. Mil gracias por tanta comprensión y amor brindado, no alcanzaría una vida para agradecerte.

A **Edwin Hernández Pérez y Germán Hernández Pérez**, a mis sobrinos tan queridos **Germancito** y **Santi**. Hermanos, quiero agradecerles por tanto apoyo, que tengan conocimiento de que los admiro por su gran capacidad, por sus logros obtenidos y por estar siempre al pendiente de nuestros padres, por eso y muchísimas cosas más los quiero mucho. Con gran cariño, respeto y admiración doy gracias de tener a la mejor hermana **Felisa Hernández Guzmán** y a mi cuñado **Leocadio Moreno Velázquez**. Sin duda alguna ustedes han sido grandes partícipes en el transcurso de mi vida, personas como

ustedes existen pocas en este mundo. Pudiera hacer mención de todas y cada una de las muestras de apoyo y cariño, pero lo resumo al decirles que son mi ejemplo a seguir, que vivo agradecido por todo y, por tanto. Enhorabuena, los quiero mucho y que Dios los siga Bendiciendo.

Para ustedes tíos, **Anselmo Hernández Pérez** y **Araceli Gómez Olivares**, que siempre han estado al pendiente de nosotros, que siempre nos han apoyado desmedidamente. Quiero que sepan que ocupan un lugar muy especial en nuestros corazones, que son un gran ejemplo a seguir de calidad de seres humanos. Tíos, mil gracias por tanto cariño, los admiro.

A las familias **Padilla Martínez** (Sra. Olga y Sr. Juan), **Montoya Padilla** (Coral, Valentina y Saúl), **Padilla Martínez** (Jessi, Mateo y Gil) y próximamente **Padilla Fernández** (Celeste y Juan). Hago de su conocimiento que me siento honrado de pertenecer a este núcleo de familia de calidad. Muchísimas gracias por tanto apoyo brindado, quiero que sepan que los considero personas admirables que son las que dan sentido a esta vida.

A esa persona que confió en mí en el 2011, al **Dr. Ignacio Vidales Fernández** (†), por ser una persona del saber y la elocuencia, que sembraba en todos los que rodeaba la semilla de la bondad, del buen ser. Gracias Dios por otorgarme el honor de haberlo conocido.

Al Ing. **Antonio Treviño Rivero** y a su esposa la Sra. **Martha Cueto Wong**, quienes me acogieron desde los primeros días que llegué a la ciudad de Saltillo, abriendo las puertas de su hogar, brindándome muestras de cariño y afecto. Mil gracias por tanto apoyo manifestado, los llevo en mi mente y corazón.

A mis compañeros, amigos, hermanos que he tenido la oportunidad de conocer y que me han hecho feliz durante todo este tiempo con esos momentos tan gratos de convivencia y de alegría. Gracias Luis Manuel Virrueta Martínez, Diego Alejandro Treviño Cueto, José Clemente Sánchez Canseco, Daniel y Jorge Siller Juárez.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es el fruto de un árbol originario de México y Centroamérica (Téliz, 2000). La producción mundial del cultivo supera 5,000,000 toneladas y el 70.3% de esta producción lo aporta el continente americano (FAOSTAT, 2016). La República Mexicana es la más importante productora, consumidora y exportadora de aguacate en el mundo, con una producción de casi 2 millones de toneladas anuales, de las cuales, el estado de Michoacán aporta 77% de la producción nacional, convirtiéndolo innegablemente en la capital mundial de este cultivo (SIAP, 2017). *P. americana* pertenece a la familia *Lauraceae*, uno de los grupos de angiospermas más antiguos (Renner, 1999). Se caracteriza por su gran variabilidad y por ser una de las familias del reino vegetal más numerosas, que se distribuyen por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Renner, 2004). La productividad del cultivo en esta amplia gama de ambientes, depende de un conjunto de factores, algunos más o menos ligados con las características agroambientales de los huertos. Sin embargo, factores bióticos y abióticos son limitantes para obtener buenos rendimientos y calidad de fruto esperado (Anguiano *et al.*, 2003). Hasta hace algunos años, las investigaciones se orientaban al fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi*, como el único patógeno responsable de la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero, no obstante, existen reportes actuales de nuevas especies de fitopatógenos causando marchitez en este cultivo tales como: *Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* (Dann *et al.*, 2011; Vitale *et al.*, 2012) y *Phytophthora vexans* aislado de raíces de aguacate en las Islas Canarias y mostrando una patogenicidad incluso más severa que *P. cinnamomi* (Rodríguez *et al.*, 2018).

Como respuesta a esta problemática, se ha producido un creciente interés en la investigación de la utilización de aceites esenciales y extractos de plantas como fungicidas naturales, que no sean perjudiciales para el medio ambiente (Benites *et al.*, 2009; Bajpai y Kang, 2010). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida (Wilson *et al.*, 1997; Gogoi *et al.*, 1997). Por lo cual, ha incrementado el interés de aplicación de este tipo de productos como agentes antimicrobianos naturales en alimentos y cultivos agrícolas (Celis *et al.*, 2012). Otra alternativa viable para hacer frente

a la problemática de plagas y enfermedades, sería la generación no sólo de patrones o portainjertos que presenten resistencia o tolerancia a fitopatógenos, sino de variedades que presenten características organolépticas de exportación. Sin embargo, las investigaciones deben seguir la forma tradicional de selección, por medio de caracteres morfológicos deseables y que conlleva periodos de hasta 45 años (Rogel-Castellanos, 1999). Una alternativa factible para fortalecer la caracterización morfológica y poder llegar a la obtención de registros de nuevas variedades podría ser la caracterización molecular, la cual presenta la ventaja de trabajar directamente con la base genética de los individuos, debido a esto, se caracteriza el germoplasma vegetal y permite realizar una identificación más precisa a nivel de ADN (Gutiérrez Díez *et al.*, 2009). En este sentido, el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR), han demostrado ser eficientes para caracterizar la variabilidad genética de aguacate, esto por la codominancia que presentan, alto grado de polimorfismo, por ser adecuados para investigar la estructura de la población, la historia de las especies y debido al alto nivel de diversidad alélica, aunado a una fácil detección por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), alta reproducibilidad y variabilidad; obteniendo como resultado identificar heterocigosidad, distancias genéticas y relevantemente la identificación de nuevas especies o cultivares (Litt y Luty, 1989; Smeets *et al.*, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989 y Garris *et al.*, 2005).

## Objetivos

- Identificar morfológica y molecularmente nuevos fitopatógenos asociados al cultivo del aguacate, en los principales municipios de la franja aguacatera del estado de Michoacán.
- Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) sobre nuevos fitopatógenos del cultivo del aguacate (*Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora vexans*) y determinar su CI50.
- Caracterizar mediante el uso de marcadores microsátélites, cuatro materiales prominentes de aguacate, seleccionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Uruapan, con el uso de marcadores moleculares microsátélites y comparar sus perfiles genéticos con la variedad comercial “Hass”.

## Hipótesis

- Existen nuevos fitopatógenos afectando al cultivo del aguacate en el estado de Michoacán.
- Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) podrán inhibir el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora vexans*.
- Los materiales prominentes de aguacate con características organolépticas para exportación, presentarán variabilidad genética y se podrán identificar con marcadores moleculares microsátélites.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Reporte de recientes fitopatógenos asociados al cultivo del aguacate

#### *Phytophthium vexans* Lévesque y Cock

El género *Phytophthium* fue descrito por Lévesque y Cock (2004), este nuevo género es morfológicamente intermedio entre el género *Phytophthora* y *Pythium*. De Cock *et al.* (2015) observaron que las especies de *Pythium* pertenecientes al clade K eran filogenéticamente distintas al resto de los *Pythium* spp. Cooke *et al.* (2000) demostraron que *Pythium vexans* era claramente diferente de otras *Pythium* spp. y *Phytophthora* usando la subunidad grande ribosomal (LSU) y el espaciador interno transcrito (ITS). Villa *et al.* (2006) demostraron que las especies de *Pythium* pertenecientes al clade K estaban estrechamente relacionados con *Phytophthora*. La diferenciación morfológica deriva en que es el único que presenta esporangios papilados y anteridios cilíndricos o lobulados.

*P. vexans* fue aislado junto a otros organismos patógenos considerándose un organismo patógeno secundario (Andrés, 2015). Sin embargo, fue aislado en plantas de *Metrosideros colinna* junto a *P. cinnamomi*, agente patógeno clave en este cultivo, así como en otras especies leñosas de importancia ornamental; las inoculaciones de *P. vexans* sobre plantas sanas de esta especie originó los síntomas de esta enfermedad, tratándose por tanto de un patógeno primario (Kliejunas y Ko, 1975; Van der Plaats-Niterink, 1981; Andrés, 2015). Es importante mencionar que Rodríguez *et al.* (2018) reportan a *P. vexans* aislado de raíces de aguacate en las Islas Canarias, mostrando una patogenicidad incluso más severa que *P. cinnamomi*.

#### *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma*

*Neonectria macrodidyma* Halleen, Schroers y Crous, su estado anamorfo es *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen y Crous (Booth, 1966; Mantiri *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004); recientemente fue nombrado como *Ilyonectria macrodidyma* (Halleen, Schroers y Crous) (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 y 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 7,000 plantas de seis meses hasta cuatro años de edad (Vitale *et al.*, 2012). Las lesiones se presentan principalmente en la raíz, seguido de daños a hojas y al tallo (Vitale *et al.*, 2012). Sin embargo, en México no existen reportes causando daños en viveros ni en huertos de aguacate.

### **Aceites esenciales**

Las plantas han sido capaces de protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos, produciendo grandes cantidades de metabolitos secundarios, antes que el hombre jugara un papel activo en su protección, mediante sustancias químicas con actividad antimicrobiana (Wilson *et al.*, 1999; Dixon, 2001). Entre los metabolitos secundarios importantes relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lectinas, polipéptidos y aceites esenciales (Cowan, 1999). Los aceites esenciales son una mezcla de lípidos o grasas de bajo peso molecular muy hidrofóbicos, generalmente menos densos que el agua, aromáticos y volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas (Stashenko, 2000; Batish *et al.*, 2008; Bosquez *et al.*, 2009). De acuerdo a Tajkarimi *et al.* (2010) se han encontrado alrededor de 1,340 plantas a las que se les han atribuido propiedades antimicrobianas y en las cuales se han identificado alrededor de 30,000 componentes.

La aplicación de aceites esenciales es un método muy atractivo para controlar enfermedades tanto en cosecha como en post-cosecha, estos materiales son una mezcla compleja de compuestos volátiles producidos en diferentes partes de las plantas, y han sido reconocidos por poseer diversas funciones, incluyendo conferir la resistencia a plagas y enfermedades (Oxenham, 2003); algunos aceites esenciales, así como sus constituyentes, han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas (Ahmet *et al.*, 2005; Karmen *et al.*, 2003). Existen numerosos estudios que revelan la actividad antimicrobiana, aunque no todos presentan la misma actividad y ésta dependería de sus componentes (Fisher y Phillips, 2006).

Aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en éste la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen (Schelz *et al.*, 2006; Keeler y Tu, 1991), en estudios recientes se reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidias, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas (Park *et al.*, 2009).

Respecto a la composición de los aceites esenciales, ésta varía en función de la zona de cultivo, condiciones ambientales y de acuerdo con las diferentes partes de la planta de las cuales se extrae (Burt, 2004). Dependiendo de la especie, se calcula que un aceite esencial puede contener entre 50 a 300 compuestos químicos, los cuales pertenecen a los grupos de hidrocarburos terpénicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, entre otros (Stashenko, 2000). Se ha reportado que los componentes mayoritarios pueden alcanzar hasta un 85% de la composición total del aceite esencial, mientras que los demás pueden estar presentes sólo como trazas (Kalemba y Kunicka, 2003; Fisher y Phillips, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010).

### **Marcadores moleculares microsatélites**

El uso de marcadores moleculares permite estimar parámetros básicos de diversidad genética, cuya información puede ser utilizada con fines de conservación, determinar el tamaño efectivo de la población, identificar cuellos de botella ocasionados por causas naturales o antropogénicas, conocer el origen poblacional, nivel de endogamia y el flujo génico (Hedrick, 2004). Las relaciones genéticas del aguacate han sido estudiadas con diversos marcadores moleculares como: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Furnier, *et al.*, 1990), minisatélites y microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Schnell *et al.*, 2003; Ashworth y Clegg 2003; Ashworth *et al.*, 2004 y Alcaraz y Hormaza 2007), polimorfismo de nucleótido único (SNP) (Chen *et al.*, 2008) y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Fielder *et al.*, 1998). Estos estudios han mostrado una complejidad genética, debido a que el aguacate, al ser una especie con polinización abierta, facilita la segregación genética y por ende una gran variabilidad (Sánchez, 1999). Los SSR (Simple Sequence Repeats), por sus siglas en inglés, también denominadas “microsatélites” (Litt & Luty, 1989), consisten en pequeñas

secuencias de 1 a 7 nucleótidos adyacentes repetidos. En genomas eucariontes, estas secuencias sencillas son frecuentes, arbitrariamente distribuidas y forman loci genéticos altamente polimórficos distribuidos a lo largo de los cromosomas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). El número de unidades repetidas varían ampliamente entre los organismos, hallándose hasta 50 copias o más, los alelos de cada locus se diferencian en el número de repeticiones (Hajeer, 2000).

El uso de microsatélites (SSR), han demostrado ser eficientes para caracterizar la variabilidad genética de aguacate, esto por la codominancia que presentan, alto grado de polimorfismo, por ser adecuados para investigar la estructura de la población, la historia de las especies y debido al alto nivel de diversidad alélica, aunado a una fácil detección por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), alta reproducibilidad y variabilidad; obteniendo como resultado identificar heterocigosidad y distancias genéticas (Litt y Luty, 1989; Smeets *et al.*, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989; Garris *et al.*, 2005). Algunos autores (Lavi *et al.*, 1994) estimaron en 45,000 el número de éstos, presentes en el genoma de este cultivo (aguacate) y marcadores de este tipo se desarrollaron para estudios de relaciones genéticas entre cultivares (Ashworth *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares microsatélites (SSR) se consideran con mayores ventajas que otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, lo anterior, por presentar alto grado de polimorfismo, segregan de manera mendeliana y son codominantes; aunado a la presencia de un sólo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas en geles de poliacrilamida sea clara y sencilla de interpretar; se consideran que son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, permitiendo hacer investigaciones comparativas entre especies o géneros de un mismo grupo (Rentarúa, 2005). En este orden de ideas, existen investigaciones que han realizado la comparativa de 12 combinaciones de cebadores de AFLP y 16 de los SSR desarrollados para el cultivo del aguacate, enfocados para determinar estimados de distancia genética e identificar cultivares de interés comercial (Ramírez *et al.*, 2005), mientras que, al utilizar AFLPs los autores indican la necesidad de usar marcadores más específicos como SSRs para diferenciar cultivares de aguacate de raza mexicana (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

## ARTÍCULOS

## Artículo 1.

## ΦΥΤΟΝ

REVISTA INTERNACIONAL DE BOTÁNICA EXPERIMENTAL  
INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANYTech Science Press  
871 Coronado Center Drive, Suite 200,  
Henderson, Nevada, 89052, USA  
www.techscience.com**First report of *Phytophthora vexans* causing the “Avocado sadness” in Michoacan, Mexico**Hernández Pérez A<sup>1</sup>, E Cerna Chávez<sup>2</sup>, JC Delgado Ortiz<sup>3</sup>, M Beltrán Beache<sup>4</sup>, LM Tapia Vargas<sup>5</sup>, YM Ochoa Fuentes<sup>2</sup>

**Abstract.** Mexico is the main producer, consumer and exporter of avocado in the world, being Michoacan the main producer state contributing more than 80% of the national production. There are phytopathogens that decimate the production causing the death of the tree. Root samples were collected in avocado trees that showed the characteristic symptomatology of the disease known as avocado sadness, the sampling was carried out in four of the main avocado producing towns, in the state of Michoacan, Mexico. The isolation consisted in sowing root tissue in Petri dishes with V8<sup>®</sup>-PARPH culture medium, subsequently they were identified morphologically and for species level it was determined by molecular biology, with the PCR-ITS technique. Pathogenicity tests were performed in triplicate with avocado seedlings with more than six leaves. After 24 hours, the inoculated plants expressed decay in the apical part, after 120 hours the leaves showed yellowing and after 15 days there was a generalized wilt on the stem and leaves, re-isolating the phytopathogen *Phytophthora vexans*.

This study confirms the first report of the oomycete *P. vexans* affecting avocado trees in the most important producing region of the Mexican Republic.

**Keywords:** *Molecular identification; Pathogenicity; Phytophthora vexans; Avocado.*

**INTRODUCTION**

The world production of avocado is of 4,700,000 tons, of which the American continent contributes 70.3% of the production (FAOSTAT, 2013). Mexico is considered the center of origin of this crop, standing out as the main producer, consumer and exporter of avocado in the world with an established area of 203,732 ha and a production that exceeds 1.8 million tons, of which, the 49% goes to the international market (SIAP, 2016).

In this sense, Michoacan is the main producer, contributing 8 out of every 10 tons produced by the Mexican Republic (SAGARPA, 2017). However, there are different phytosanitary limitations, highlighting the oomycete *Phytophthora cinnamomi* as the most important economically, this phytopathogen is the cause of the rot of the root system and in the aerial part of the tree a wilt known as avocado sadness (Zentmyer et al., 1994; Pérez, 2008). Until a few years ago only *P. cinnamomi* was mentioned as the only pathogen responsible for this symptomatology, however, some authors report new species causing wilt in this crop such as: *Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* (Dann et al., 2011; Vitale et al., 2012) and *Phytophthora vexans* isolated from avocado roots in the Canary Islands and showing a more severe pathogenicity than *P. cinnamomi* (Rodríguez et al., 2014). Therefore, the objective of the present investigation was to identify and determine the pathogenicity of *Phytophthora vexans* in avocado.

**MATERIALS AND METHODS**

Root samples were collected from avocado trees (*Persea americana* Mill. Hass var.) from August to September 2014, they showed typical symptoms of avocado wilt disease (“Avocado sadness”), the trees had necrotic roots and brittle, yellowing in leaves and a descending death. They were sampled 40 orchards from Peribán, Uruapan, Tancitaro and San Juan Nuevo Parangaricutiro, being the main producers of avocado. The area per orchard was variable 3-15 ha and was directed in trees with the characteristic symptomatology

<sup>1</sup> Estudiante del postgrado Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315.

<sup>3</sup> Catedrático CONACYT-UAAAN. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315.

<sup>4</sup> CULTA S.A. de C.V., Investigación y Desarrollo, Altavista, El Mante, Tamaulipas, México CP 898800.

<sup>5</sup> INIFAP, Campo Experimental Uruapan. Av. Latinoamericana No. 1101, Col. Revolución CP. 60500, Uruapan, Michoacán, México.

Address correspondence to: YM Ochoa Fuentes, e-mail: yisa8a@yahoo.com

of the disease “Avocado sadness”. The isolation procedure began by eliminating soil excess from the roots with water and making longitudinal cuts measuring less than 0.5 cm, only on dark brown brittle roots taken from the infection’s leading edge. The root cuts were disinfected with sodium hypochlorite at 3% during 3 min, followed by three sterile distilled water washes, before being seeded in petri dishes with selective medium (for oomycetes) PARPH (Pimaricin 10 µg/mL, Ampicillin 250 µg/mL, Rifampicin 10 µg/mL, PCNB 100 µg/mL and Hymexazol 50 µg/mL) proposed by Davison & Ribeiro (1996). The plates were incubated at 28 °C for 4 days and a mycelia disc of 0.5 cm in diameter was transferred to petri dishes with V8<sup>+</sup>-Agar cultural media, where it grew as pure isolate. These obtained colonies were identified up to the gender level with taxonomic keys proposed by De Cock & Lévesque (2004) and Bala *et al.* (2010). Molecular identification was done through PCR-ITS. DNA extraction was performed using the method Doyle and Doyle (1990), in which 0.2 g of mycelium was grinded with liquid nitrogen and resuspended in 500 µL of extraction buffer (Tris-HCl pH 8.0, 100 mM; EDTA pH 8.5, 50 mM; NaCl 50mM & 2% SDS) the DNA was visualized on a 2% agarose gel. PCR was used to amplify internal transcript regions with ITS1 primers (5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) and ITS4 (5′- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′). The PCR reaction conditions were: 1 cycle of initial denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 95 °C for 10 seconds, 30 cycles of alignment at 57 °C for 30 seconds, 30 cycles of extension to 72 °C for 2 min and 1 cycle of final extension at 72 °C for 5 min (Ochoa *et al.*, 2012). Results from the reaction were seen through electrophoresis in agarose gel at 2% stained with GelRed (GenScript<sup>®</sup>). The PCR products of the synthesized chain were sequenced in both directions by Macrogen USA. The sequences were compared in NCBI Gene Bank data base (National Center for Biotechnology Information [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Pathogenicity tests were replicated three times using avocado seedlings with 6 true leaves, 3 control plants were used, treated with sterile distilled water, 3 positive control inoculated with *P. cinnamomi* and the inoculation technique described by Van den Berg *et al.* (2007) and Engelbrecht & Berg (2013). 500 mg of mycelia were weighted and fractioned by forced stirring during 5 minutes in 150 mL of sterile distilled water. Aliquotes of 50 mL were transferred to sterilized glass flasks with 100 mL of sterile distilled water. The seedlings’ roots were washed with sterile distilled water to eliminate substrate residues. Once cleaned, the plants were introduced inside the flasks containing the oomycetes solution, one plant per flask. The flasks were kept at 23 °C inside a bio-climatic chamber with 14/10 h of light and darkness periods, in order to conduct daily observations. At the end of the pathogenicity tests, the inoculated pathogens from necrotic roots were re-isolated, using hereinabove described methodology and replicates were made to confirm the isolates’ identity.

## RESULTS AND DISCUSSION

Derived from the purification of the strains, 40 isolates were obtained, highlighting the presence of two oomycetes (*P. cinnamomi* and a second oomycete). However, the second had a higher incidence rate with 72.2% and the rest (27.7%) for *P. cinnamomi*. Due to the above, the oomycete with greater incidence was morphologically identified, observing constrictive or lobulated elongated anteridia, and papillary non-globular circular sporangia, coinciding broadly (dimensions and structures) with that reported by de Cock *et al.* (2015) for *Phytopythium vexans*. This result is similar with that reported by Vawdrey *et al.* (2005) who used the selective medium P10ARP, isolating *P. vexans* more frequently than *Phytophthora palmivora*, noting that the latter was considered the main pathogen causing durian (*Durio zibethinus*) death in northern Queensland. The variant in our work was to add the active ingredient Hymexazole (50 µg / mL) to the selective medium. On the other hand, Kato *et al.* (1990) and later Davison & Ribeiro (1996) report resistance of some oomycetes (*Pythium*) to Hymexazol, without mentioning the pathogenicity of these species. In the molecular identification, similarity values of 99% were obtained with the sequences HQ85346 and HQ853459 of *Phytopythium* spp. already reported in the Mexican Republic; *Pythium vexans* sequences showed a similarity of 99% with the sequence LM651020, reclassified as *Phytopythium vexans* (Cock *et al.*, 2015). While the isolate S4-39 showed a similarity of 99% with LM651019 (*Phytopythium vexans*), phytopathogen that causes the symptomatology of the avocado sadness disease reported by Rodríguez *et al.* (2014) in the Canary Islands, mentioning that some isolates were more aggressive than *P. cinnamomi*. Since there is literature confirming the pathogenicity of this oomycete, the pathogenicity test was performed. Pass by 24 h after inoculation, the plants showed apical decay; the leaves turned yellow after 120 h (post inoculation), and after 15 days the leaves and stems were dry and brittle. The isolate S4-39 caused the wilting of the inoculated plants, in the radicular system a necrosis was observed in some cases greater than the control inoculated with *P. cinnamomi*; while the control inoculated with sterile distilled water did not show any decay, yellowing or any other symptom related to the disease known as “Avocado sadness”. Fulfilling the postulates of Koch, it gives us the certainty that *P. vexans* is the causal agent of the symptomatology of the sadness of the avocado tree. This phytopathogen agrees with the symptomatology described by Mora *et al.*, (2007) for the oomycete *P. cinnamomi*. It is important to note that *P. vexans* has been reported since 2005, in where different authors obtain similar results to the present investigation, reporting its pathogenicity in vegetables and fruit trees, causing root rot in kiwi, apple and grapevine (Vawdrey *et al.*, 2005; Spies *et al.*, 2011; Polat *et al.*, 2017).

Affectations have been reported in woody non-fruit species (family: fabaceae) in association with *Phytophthora palmivora* (Steinrucken *et al.*, 2017). With the above, the first report of the oomycete *P. vexans* affecting avocado trees in the

most important producing region of the state of Michoacan in the Mexican Republic is confirmed.

## REFERENCES

- Bala, K., G.P. Robideau, C.A. Lévesque, A.W.A.M. De Cock, Z.G. Abad, A.M. Lodhi, S. Shahzad, A. Ghaffar & M.D. Coffey (2010). *Phytophthora* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytophthora sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Persoonia* 24: 136-137.
- Dann, E., L. Forsberg, A. kooke, K. Pegg, R. Shivas & Y. Tan (2011). The “*Cylindro*” complex of avocado root pathogens. In Memories of the VII World Avocado Congress. Cairns Australia. pp. 1-12.
- Davison, E. & O. Ribeiro, 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press, Minnesota. pp. 269-280.
- de Cock A., A.M. Lodhi, T.L. Rintoul, K. Bala, G.P. Robideau, Z.G. Abad, M.D. Coffey, S. Shahzad & C.A. Lévesque (2015). *Phytophthora*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25-39.
- De Cock, A.W.A.M. & C.A. Lévesque (2004). New species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Studies in Mycology* 50: 481-487.
- Doyle, J. & J.L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Engelbrecht, J. & N. Berg (2013). Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal of Science* 109: 18.
- FAOSTAT. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible.
- Kato, S., R. Coe, L. New & M.W. Dick (1990). Sensitivities of various Oomycetes to hymexazol and metalaxyl. *Journal of General Microbiology* 136: 2127-2134.
- Mora, A., D. Téliz, A.G. Mora & J. D. B. Echevers (2007). Tristeza del aguacatero (*Phytophthora cinnamomi*). El aguacate y su manejo integrado. Segunda Edición. Ediciones Mundi Prensa. pp. 192-202.
- Ochoa Fuentes, Y.M., E. Cerna, G. Gallegos, G. Landeros, J.C. Delgado, J.C. Hernández, S. Rodríguez & R. Olalde (2012). Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología* 36: 27-32.
- Pérez, R.M. (2008). Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2: 1-24.
- Polat, Z., Q.N. Awan, M. Hussain & D.S. Akgül (2017). First report of *Phytophthora vexans* causing root and collar rot of kiwifruit in Turkey. *Plant Disease* 101: 1058.
- Rodríguez Padrón, C., A. Rodríguez & F. Silverio (2014). Patogenicidad en aguacate de Aislados Locales de Especies de *Phytophthora* y *Phytophthora*. Primera descripción de *Phytophthora niederhauserii* como Patógeno del Aguacate. XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lleida, España, octubre 7-10, pp. 130.
- SAGARPA (2017). Secretaria de Agricultura Ganadería desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
- SIAP (2016). Sistema de Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.
- Spies C.F.J., M. Mazzola & A. McLeod (2011). Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Forest Pathology* 131: 103.
- Steinrucken, T.V., S. Aghighi, G.E. Hardy, A.C. Bissett, J.R. Powell & R.D. Klinken (2017). First report of oomycetes associated with the invasive tree *Parkinsonia aculeata* (Family: Fabaceae). *Australasian Plant Pathology* 46, 313-321.
- Van den Berg, N., D.K. Berger, I. Hein, P. Birch, M.J. Wingfield & A. Viljoen (2007). Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular Plant Pathology* 8: 333-341.
- Vawdrey L.L., P. Langdon & T. Martin (2005). Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland. *Australas Plant Pathol* 34: 127-128.
- Vitale, A., D. Aiello, V. Guarnaccia, G. Perrone, G. Stea & G. Polizzi 2012. First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology* 160: 156-159.
- Zentmyer G., H. Ohr & J. Menge (1994). Compendium of tropical fruit diseases. The American Phytopathological Society, pp. 76.

DOI 10.7764/rcia.v45i3.1905

RESEARCH NOTE

## First report of avocado tree wilt by *Pythium sp. amazonianum* in Mexico

Yisa M. Ochoa Fuentes<sup>1</sup>, Anselmo Hernández Pérez<sup>1</sup>, Juan C. Delgado Ortiz<sup>1</sup>, Mariana Beltrán Beache<sup>2</sup>, Luis M. Tapia Vargas<sup>3</sup>, Omegar Hernández Bautista<sup>2</sup>, and Ernesto Cerna Chávez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315.

<sup>2</sup>CULTA S.A. de C.V Bulevar Luis Echeverría Álvarez No. 1700, Colonia Altavista, CP. 89880, CD. Mante, Tamaulipas, México.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Uruapan. Avenida. Latinoamericana No. 1101 Colonia Revolución CP. 60500, Uruapan, Michoacán, México.

### Abstract

**Yisa M. Ochoa Fuentes, A. Hernández Pérez, J.C. Delgado Ortiz, M. Beltran Beache, L.M. Tapia Vargas, O. Hernández Bautista, and E. Cerna Chavez. 2018. First report of avocado tree wilt by *Pythium sp. amazonianum* in Mexico. Cien. Inv. Agr. 45(3): 301-305.** In August and September 2014, different avocado orchards (*Persea americana* Mill. Var. Hass) were sampled in four municipalities (Tancítaro, Uruapan, San Juan Nuevo Parangaricutiro and Peribán) of the “Franja aguacatera” in Michoacan State, Mexico. Samples were collected from avocado trees showing symptoms of the “Tristeza del aguacate” disease. Strains of *Pythium* sp. were obtained consistently from symptomatic tissue isolated in the selective medium V8®-Agar-PARPH. Morphological identification was made through taxonomic keys, and molecular identification was obtained by sequencing Internal Transcribed Spacer (ITS) gene. Koch’s postulates were corroborated by pathogenicity tests carried out on *P. americana* seedlings with six true leaves, identifying the strain of *P. sp. amazonianum* as the causal agent of the “Tristeza del aguacate” disease. This is the first report that associates the “Tristeza del aguacate” with *P. sp. amazonianum* in Michoacan, Mexico.

**Key words:** Avocado, Michoacan, oomycete, *Pythium*, pathogenicity.

### Introduction

Global avocado production is approximately 4,700,000 tons, and Mexico is the largest producer in the world, with more than 175,000 ha; Michoacan State represents most of the planted

surface area with more than 127,000 ha and 10 ton/ha yields. In the state of Michoacan, the region known “Franja aguacatera” has an area of 7,752 km<sup>2</sup>, which represents 13% of the total state territory. The “Franja aguacatera” is located in the neovolcanic axis region, which has a forest ecosystem characterized by moderate, humid and subhumid weather, with temperatures from 8 °C to 21 °C and annual rainfall between

1,200 and 1,600 mm (SAGARPA, 2017). Avocado production is affected by a wide range of diseases that cause low yields, malformations in the fruits and even the death of trees; such diseases are caused by different phytopathogens, such as *Sphaceloma perseae* (scabies), *Colletotrichum gloeosporioides* (anthracnose) and *Phytophthora cinnamomi* (“Tristeza del aguacate”). Species of the genera *Phytophthora* have the greatest economic impact on root rot, leaf and branch wilt and tree death (Davison and Ribeiro, 1996; Pérez, 2008). *P. cinnamomi* has traditionally been considered the only pathogen related to these symptoms; however, some authors reported new species of pathogens associated with this symptomatology, such as *Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendra* and *Ilyonectria macrodidyma* (Dann *et al.*, 2011; Vitale *et al.*, 2012), as well as *Phytophthora vexans* isolated from the roots of avocado trees in the Canary Islands, which showed more severe pathogenicity than *Phytophthora cinnamomi* (Rodríguez *et al.*, 2014). Therefore, the objective of this research was to confirm the species and pathogenicity of *Pythium sp.* involved as a causative agent of wilt in the avocado orchards of Michoacan, Mexico.

## Materials and methods

### Isolation

From August to September 2014, root samples were collected from avocado trees (*Persea americana* Mill. Hass var.) that showed typical symptoms of avocado wilting disease (Tristeza del aguacate); the sampled trees had necrotic and brittle roots, yellow leaves and progressive descending mortality. Root samples of infected trees were collected from 40 avocado groves located within the “Franja Aguacatera” area in Uruapan, Peribán, Tancítaro and San Juan Nuevo Parangaricutiro, all belonging to the state of Michoacan, Mexico. The isolation procedure

began by eliminating excess soil from the roots with water and making longitudinal cuts no longer than 0.5 cm each; only dark brown brittle roots were taken from the infection’s leading edge. The root cuttings were disinfected with 3% sodium hypochlorite for 3 min, followed by three washes with sterile distilled water, before being seeded in Petri plates with PARPH selective medium (pimaricin 10 µg mL<sup>-1</sup>, ampicillin 250 µg mL<sup>-1</sup>, rifampicin 10 µg mL<sup>-1</sup>, PCNB 100 µg mL<sup>-1</sup> and hymexazol 50 µg mL<sup>-1</sup>) according to Davison and Ribeiro (1996). PARPH is the standard selective medium for oomycetes. The Petri plates were incubated during four days at 28 °C. Pure isolates were obtained by transferring 0.5-cm-diameter discs with mycelia to Petri plates with V8®-Agar media.

### Identification

Colonies of pure isolates were identified at the genus level based on taxonomic keys proposed by De Cock and Lévesque (2004) and Bala *et al.* (2010). Molecular identification was based on ITS-PCR. DNA was extracted from pure and identified isolates using 0.2 g of mycelia, according to the method of Doyle and Doyle (1990). PCR amplification of the ITS (internal transcript region) was performed with the primers ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) and ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′). The PCR amplification conditions were as follows: 1 cycle of initial denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 95 °C for 10 seconds, 30 cycles of alignment at 57 °C for 30 seconds, 30 cycles of extension at 72 °C for 2 min and 1 cycle of final extension at 72 °C for 5 min (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2012). The PCR-amplified products were visualized through electrophoresis in a 2% agarose gel stained with GelRed (GenScript®). The PCR products were sequenced in both directions. Sequences were compared with the NCBI gene bank database (National Center for Biotechnology Information) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### Pathogenicity tests

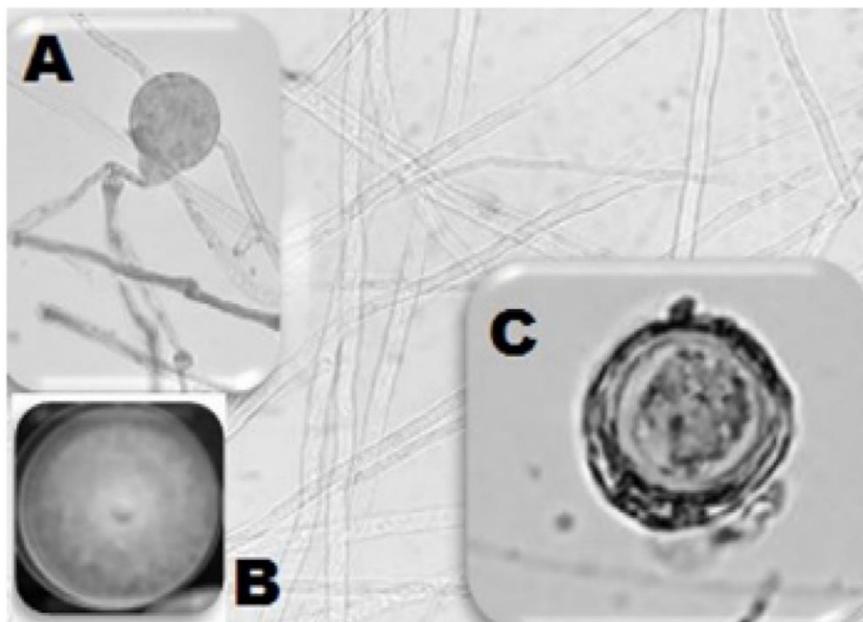
Pathogenicity tests using six-leaf-stage avocado seedlings were based on the inoculation techniques described by Van den Berg *et al.* (2007) and Engelbrecht and Berg (2013). Control plants were treated with sterile distilled water, and a positive control inoculated with *P. cinnamomi* was also included. All inoculated treatments were replicated three times. The inoculum was prepared with 500 mg of mycelia fractioned by forced stirring for 5 min in 150 mL of sterile distilled water. Aliquots of 50 mL were transferred to sterilized glass flasks with 100 mL of sterile distilled water. These flasks were used as inoculum. The avocado seedlings for evaluation were obtained from a certified vivarium of the National Institute of Agricultural and Livestock Forestry Research (NIFAP-CEU). Root seedlings were washed with sterile distilled water to remove residues from the substrate. Plant roots were placed in the flasks containing the inoculum (mycelia solution), using one plant per flask. All plants in flasks were kept at 23 °C in a bioclimatic chamber with a 14/10 h light/darkness period. Observations were recorded daily for 30 days to detect symptoms that could be expressed by the phytopathogen evaluated in the avocado seedlings.

Finally, the inoculated pathogens were reisolated from necrotic roots using the previously described methodology; replicated tests were conducted to confirm the isolates' identity.

### Results and discussion

From the purification of the strains, 20 isolates were obtained that coincided with the morphology of *P. cinnamomi*; however, 10 isolates did not coincide with the characteristics of *P. cinnamomi*. The isolates were identified from the above colonies by locating hyaline colonies with aerial, coenocytic mycelium, oogonia with antheridia, and spherical and globular sporangia, confirming the reports of De Cock and Lévesque (2004) and Bala *et al.* (2010) (Figure 1).

The resulting sequence exhibited 97% homology with the strain of *Pythium. sp. amazonianum* (Gene bank access number: EU003445). The isolated strains were deposited in the microorganism collection of the National Center for Genetic Resources, which is part of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock, with the registration number 1006 and in the world



**Figure 1.** Growth and structures of *P. sp. amazonianum*, A) sporangium, B) growth in PDA culture medium and C) oogonium.



**Figure 2.** Photographs of avocado plants inoculated with sterile distilled water (left) and plants inoculated with *P. sp. Amazonianum* with symptoms of the disease “Tristeza del aguacate” (right).

federation of culture collections (CM-CNRG) with registration number CM-CNRG 409. In the pathogenicity tests, after the first 24 h from artificial inoculation of the isolates, all the plants showed apical decay (Figure 2). One repetition showed declining and total defoliation in 48 h. At the end of the test (six days), the defoliated stem was turgid and had axillary buds. The root system showed more necrosis, yellowing in the aerial parts of the plant and more brittle roots than our check test inoculated with *P. cinnamomi*, while the check test inoculated with sterile water did not show any decline or any other symptom of the disease known as avocado wilt or “Tristeza del aguacate”.

Symptoms from *P. sp. amazonianum* plant pathogens are similar to the symptoms reported by Téliz and Mora (2007) from *P. cinnamomi* oomycete and *P. vexans* isolated from the roots of avocado trees in the Canary Islands (Rodríguez *et al.*, 2014). *P. sp. amazonianum* has been reported in isolates from South African moderate-climate fruit (apple) and citrus trees (Spies *et al.*, 2011), and the same author suggests that the tested pathogen (*P. sp. amazonianum*) should be considered a new species of the genus *Pythium*, within K-clade, B-group, Subclade III, as indicated by the morphological differences between the observed structures and the phylogenetic analysis. This is the first report of avocado wilt caused by *P. sp. amazonianum* in avocado orchards of Michoacan, Mexico.

### Resumen

**Yisa M. Ochoa Fuentes, A. Hernández Pérez, J.C. Delgado Ortiz, M. Beltran Beache, L.M. Tapia Vargas, O. Hernández Bautista, y E. Cerna Chavez. 2018. Primer reporte del marchitamiento del aguacatero por *Pythium sp. amazonianum* en México. Cien. Inv. Agr. 45(3): 301-305.** En los meses de agosto y septiembre del 2014 se muestrearon diferentes huertas de aguacate (*Persea americana* Mill. Var. Hass) en cuatro municipios (Tancítaro, Uruapan, San Juan Nuevo Parangaricutiro y Peribán) de la “Franja aguacatera” en el estado de Michoacán, México. Las muestras se recolectaron de árboles de aguacate que mostraban síntomas de la enfermedad “Tristeza del aguacate”. Se obtuvieron cepas de *Pythium sp.* consistentemente de tejido sintomático, aisladas en medio selectivo V8®-Agar-PARPH. La identificación morfológica se realizó mediante claves taxonómicas y la identificación molecular se obtuvo a través de ITS-PCR. Los postulados de Koch se corroboraron mediante pruebas de patogenicidad llevadas a cabo en plántulas de *P. americana* con seis hojas verdaderas, identificando la cepa de *P. sp. amazonianum* como agente causal de la “Tristeza del aguacate”. Este es el primer reporte que asocia la “Tristeza del aguacate” con *P. sp. amazonianum* en Michoacán, México.

**Palabras clave:** Aguacate, Michoacán, oomiceto, patogenicidad, pythium.

## References

- Bala, K., G. Robideau, C.A. Levesque, A. Cock, Z. Abad, A.M. Lodhi, S. Shahzad, A. Ghaffar, and M. Coffey. 2010. *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium* sindhum Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 24. 137.
- Dann, E., L. Forsberg, A. kooke, K. Pegg, R. Shivas, and Y. Tan. 2011. The “Cylindro” complex of avocado root pathogens. In *Memories of the VII World Avocado Congress*. Cairns Australia. p 1–12.
- Davison, E., and O. Ribeiro, 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press, Minnesota. pp. 269–280.
- De Cock, A.W.A.M., and C.A. Lévesque. 2004. New species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Studies in Mycology* 50:481–487.
- Doyle, J., and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Engelbrecht, J., and N. Berg, 2013. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal of Science* 109:1–8.
- Ochoa-Fuentes, Y.M., E. Cerna, Gallegos, G. Landeros, J. Delgado, J.C. Hernández, S. Rodríguez, and Raúl. Olalde, V. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de micología* 36:27–32.
- Pérez, R.M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(1):1–24.
- Rodríguez, P.C., A. Rodríguez, and F. Silverio. 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. Lleida, España, octubre 7–10, p. 130.
- SAGARPA (2017). Secretaria de Agricultura Ganadería desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa>.
- Spies, C.F.J., M. Mazzola, W.J. Botha, M. Van der Rijst, L. Mostert, and A. McLeod. 2011. Oogonial biometry and phylogenetic analyses of the *Pythium vexans* species group from woody agricultural hosts in South Africa reveal distinct groups within this taxon. *Fungal Biology* 115:157–168.
- Téliz, D., and A. Mora. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Segunda edición. Editorial Mundi Prensa. pp: 192–202.
- Van den Berg, N., D.K. Berger, I. Hein, P. Birch, M.J. Wingfield, and A. Viljoen. 2007. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular Plant Pathology* 8:333–341.
- Vitale, A., D. Aiello, V. Guarnaccia, G. Perrone, G. Stea, G. Polizzi. 2012. First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology* 160:156–159.

## Artículo 3.

## Primer reporte de *Mortierella elongata* como patógeno del cultivo del aguacate en Michoacán, México

First report of *Mortierella elongata* as a pathogen of avocado crop in Michoacán, Mexico

Anselmo Hernández Pérez<sup>1</sup>, Ernesto Cerna Chávez<sup>1</sup>, Juan Carlos Delgado Ortiz<sup>2</sup>, Mariana Beltrán Beache<sup>3</sup>, Omegar Hernández Bautista<sup>3</sup>, Luis Mario Tapia Vargas<sup>4</sup>, Yisa María Ochoa Fuentes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, CP 35315, Coahuila, México.

<sup>2</sup> CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, CP 35315, Coahuila, México. <sup>3</sup> Culta S.A. de C.V. Boulevard Luis Echeverría Álvarez No. 1700, Col. Altavista, Ciudad Mante, CP 89880, Tamaulipas, México.

<sup>4</sup> INIFAP, Campo Experimental Uruapan. Av. Latinoamericana No. 1101 Col. Revolución, Uruapan, CP 60500, Michoacán, México.

### RESUMEN

**Antecedentes:** Las especies del género *Mortierella* prosperan usualmente como saprófitas en el suelo y materia orgánica de diversos ecosistemas forestales. Tradicionalmente, se han aislado de los sistemas radicales de diversas especies vegetales. Adicionalmente, investigaciones realizadas en suelo de cultivo de aguacate para lograr la purificación de *Pythophthora cinnamomi* indican que *Mortierella* spp. son hongos contaminantes, sin mencionar su patogenicidad.

**Objetivo:** Esta investigación tuvo como objetivo identificar la presencia de *Mortierella* sp. y evaluar su posible patogenicidad en el cultivo del aguacate.

**Métodos:** Las cepas se aislaron de suelo de huertas ubicadas en los principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán. Las cepas fueron identificadas y se sometieron a pruebas de patogenicidad con plantas de aguacate de tres meses de edad y con plántulas con seis hojas verdaderas.

**Resultados y conclusión:** Las cepas fueron identificadas morfológica y molecularmente como *Mortierella elongata*. El fitopatógeno causó síntomas de decaimiento en las partes aéreas de las plántulas de aguacate. Este trabajo entonces demuestra por primera ocasión, que existen cepas del género *Mortierella* que son patógenas en plántulas de aguacate.

**Palabras clave:** patogenicidad, *Persea americana*, Zygomycota, Uruapan

### ABSTRACT

**Background:** *Mortierella* species usually thrive as saprophytes in the soil and organic matter from diverse forest ecosystems. Traditionally, they have been isolated from the root systems of various plant species. Additionally, research carried out in avocado soil to achieve the purification of *Pythophthora cinnamomi* consider that *Mortierella* spp. are microbial non-pathogenic contamination.

**Objective:** Therefore, this research aimed to identify the presence of *Mortierella* sp. and to evaluate its possible pathogenicity in avocado crop.

**Methods:** Strains were isolated from orchard soils of the main avocado producing municipalities in the state of Michoacán. The strains were identified and subjected to pathogenicity tests with three months old avocado plants and with seedlings with six true leaves.

**Results and conclusions:** The strains were morphologically and molecularly identified as *Mortierella elongate*. The phytopathogen caused symptoms of decay in the shoots of the avocado seedlings. This work then demonstrates for the first time that there are strains of the genus *Mortierella* that are pathogenic to avocado seedlings.

**Keywords:** pathogenicity, *Persea americana*, Zygomycota, Uruapan

### ARTICLE HISTORY

Received 06 October 2017 / Accepted 18 September 2018

On line 02 November 2018

### CORRESPONDING AUTHOR

✉ Yisa María Ochoa Fuentes, yisa8a@yahoo.com

La producción mundial del cultivo del aguacate es de 5 028756 toneladas, siendo el continente americano el principal productor con 68.8 %, seguido del continente Africano con 15.9 % (FAOSTAT, 2013).

México, es el principal país productor y consumidor de aguacate en el mundo, con una superficie de 203 732 ha, 72.5 % de las cuales se encuentran en el estado de Michoacán. La producción nacional es de 1

878 599 toneladas, con rendimientos promedio de 10 ton/ha y un consumo per cápita de 7 Kg (SAGARPA, 2015; SIAP, 2014). Sin embargo, existen diferentes limitantes fitosanitarias, las cuales, reducen significativamente el rendimiento, ocasionan malformaciones del fruto e incluso originan la muerte de los árboles de aguacate. El Oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, causante de la pudrición del sistema radical, es el fitopatógeno de mayor importancia económica (Ploetz et al., 1994; Pérez, 2008). Hasta hace algunos años solo se mencionaba a *P. cinnamomi* como el único patógeno responsable de esta sintomatología. Sin embargo, también existen reportes de fitopatógenos aislados de tejido de raíz de aguacate como: *Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* y *Phytophythium vexan*; los cuales, logran causar una marchitez generalizada (Dann et al., 2011; Vitale et al., 2012; Rodríguez et al., 2014). El género *Mortierella*, cuenta con más de 100 especies reportadas (Nagy et al., 2011). Tsao y Guy (1977), en una investigación realizada con suelo de cultivo de aguacate para lograr la purificación de *P. cinnamomi* indicaron que los hongos del género *Mortierella* son contaminantes sin hacer mención de su patogenicidad. Dichos autores propusieron el uso del hymexasol para su inhibición ya que sin este ingrediente activo logran desarrollarse un gran número de colonias superando significativamente al oomiceto *P. cinnamomi*. Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo identificar la presencia del género *Mortierella* y corroborar su posible patogenicidad en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill., variedad "Hass").

En los meses de agosto y septiembre de 2014, se recolectaron muestras de raíces en árboles de aguacate que presentaban la sintomatología característica de muerte descendente conocida como tristeza del aguacate. El muestreo se efectuó en la zona de goteo y se realizó en 40 huertos de los municipios de Uruapan, Peribán, Tancítaro y San Juan Nuevo Parangaricutiro, en el estado de Michoacán, México. El aislamiento consistió en eliminar el exceso de suelo de las raíces con agua corriente, se realizaron cortes longitudinales menores a 0.5 cm de la zona infectada. Solo se seleccionaron raíces que presentaban coloración café oscuro y consistencia quebradiza. Los fragmentos fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio a 3 % durante 3 minutos, seguido de 3 lava-

dos de agua destilada estéril y sembrados en placas de Petri con medio V8®-PARPH (Davison y Ribeiro, 1996). Las placas se incubaron a 28 °C por 3 días. La purificación se realizó por la técnica de punta de hifa, transfiriéndose a cajas Petri con medio de cultivo V8®-agar, donde crecieron como aislamiento puro, posteriormente la identificación morfológica se efectuó con las claves de identificación de Gams (1977). Para la identificación molecular, se utilizó la técnica PCR-ITS; de las cepas aisladas se extrajo ADN, a partir de 0.2 g de micelio del cultivo puro, de acuerdo a la metodología de Doyle y Doyle (1990). Para la amplificación de la region ITS se emplearon los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3'). Se visualizó el producto de la reacción por medio de electroforesis en gel de agarosa a 2 %. Este se tiñó con GelRed (GenScript®), se visualizó en un transiluminador; y los productos de PCR se secuenciaron. Las pruebas de patogenicidad se realizaron mediante dos técnicas de inoculación, la primera con plantas de aguacate de 3 meses de emergencia y la segunda con plántulas que presentaban 6 hojas verdaderas. La técnica de inoculación para las plantas de 3 meses de emergencia consistió en la maceración del micelio extraído de 5 cajas Petri de cada cepa (5). Posteriormente se realizó el conteo con apoyo de un hemacitómetro; se inocularon 3 plantas por tratamiento en la base del tallo, con 250 mL del macerado a una concentración de  $1 \times 10^6$  de propágulos infectivos (Ochoa et al., 2015). Para las plántulas de 6 hojas verdaderas se realizó una adaptación de la técnica descrita por Engelbrecht y Berg (2013) y Van den Berg et al. (2007), la cual consistió en pesar 500 mg de micelio de las cepas en estudio, el cual fue fraccionado mediante agitación forzada durante 5 minutos en 150 mL de agua destilada estéril, de éste se tomaron alícuotas de 50 mL y se colocaron en frascos de cristal previamente esterilizados que contenían 100 mL de agua destilada estéril, las raíces de las plántulas fueron lavadas con agua destilada estéril para eliminar los residuos del sustrato. Una vez limpias, fueron introducidas en frascos que contenía la solución de *Mortierella* sp., colocando una planta por frasco. Dichos unidades fueron mantenidas en una cámara bioclimática a 23 °C. Adicionalmente, se utilizaron 3 testigos tratados con agua destilada estéril y al término de la evaluación se recuperó el patógeno en los medios descritos previamente.

Las cepas aisladas se identificaron hasta especie, observándose hifas hialinas y septadas, clamidosporas de pared gruesa, esporangios terminales, crecimiento rápido de 1.65 cm por día y al llenar las cajas Petri se observó una macromorfología colonial en forma arrosetada. Dichas características coincidieron con las reportadas por Gams (1977) y Tsuneo (2010) para *Mortierella*. La secuencia obtenida se alineó con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de EUA ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), dando como resultado desde un 97 % hasta un 99 % de similitud con *Mortierella elongata* (Tabla 1).

TABLA 1. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA

CEPA	ESPECIE	NO. DE ACESSO	Is
1	<i>Mortierella elongata</i>	KU574262.1	99%
2	<i>Mortierella elongata</i>	FJ161928.1	98%
3	<i>Mortierella elongata</i>	FJ161928.1	97%
4	<i>Mortierella elongata</i>	FJ161928.1	97%
5	<i>Mortierella elongata</i>	FJ161921.1	97%

La prueba de patogenicidad de las plantas inoculadas presentaron decaimiento en la parte apical, seguido de una marchitez generalizada en hojas y tallo. Mientras que las plantas no inoculadas no presentaron ninguna sintomatología. Se tiene conocimiento que el género *Mortierella* es un habitante endémico de bosque, se encuentra presente como saprófito en diferentes ecosistemas y regiones del mundo. Diversos autores han señalado que se ha logrado aislar del sistema radical de diversas especies de plantas pero no existe información de su carácter patológico (Lumley *et al.*, 2001; Yadav *et al.*, 2014; Bonito *et al.*, 2014 y Uehling *et al.*, 2017). A la fecha este es el primer reporte de una especie del género *Mortierella* como agente causal en plántulas de aguacate. Sin embargo, es necesario continuar con la evaluación de la patogenicidad de diferentes cepas en plantas jóvenes de aguacate y realizar un estudio de la interacción que presenta dicho hongo con otros fitopatógenos de raíz.

#### LITERATURA CITADA

Bonito, G., H. Reynolds, M.S. Robeson, J. Nelson, B.P. Hodkinson, G. Tuskan, C.W. Schadt, R. Vilgalys, 2014. Plant host and soil origin

- influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology* 23: 3356-3370.
- Dann, E., L. Forsberg, A. Cooke, K. Pegg, R. Shivas, Y. Tan, 2011. The "Cylindro" complex of avocado root pathogens. VII World Avocado Congress. Cairns, Australia. Pp. 1-12.
- Doyle, J., J.L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Engelbrecht, J., N. Berg, 2013. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal of Science* 109: 1-8.
- Davison, E., O. Ribeiro, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, Minnesota. Pp. 269-280.
- FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database consulted on January 2017: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>
- Gams, W., 1977. A key to the species of *Mortierella*. *Persoonia* 9: 381-391.
- Lumley, T., D. Gignac, R. Currah, 2001. Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. *Canadian Journal of Botany* 79: 76-92.
- Nagy, L., T. Petkovits, G.M. Kovacs, K. Voigt, C. Vagvolgyi, T. Papp, 2011. Where is the unseen fungal diversity hidden. A study of *Mortierella* reveals a large contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytologist* 191: 789-794.
- Ochoa, Y.M., E. Cerna, G. Gallegos, M. Cepeda, J. Landeros, A. Flores, 2015. Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill. de Michoacán, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2(5): 211-215.
- Pérez, R.M., 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2(1): 1-24.
- Ploetz, R., G. Zentmyer, W. Nishijima, k. Rohrbach, H. Ohr, 1994. *Compendium of tropical fruit diseases*. APS Press, Minnesota.
- Rodríguez-Padrón, C., A. Rodríguez, F. Silverio, 2014. Patogenicidad en aguacate de aislados locales de especies de *Phytophthora* y *Phytophthium*. Primera descripción de *Phytophthora niederhauserii* como patógeno del aguacate. XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lleida, España. Pp. 130.
- SAGARPA, 2015. Secretaría 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 abril del 2017.
- SIAP, 2014. Sistema de Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://www.siap.gob.mx>. Fecha de consulta abril del 2017.
- Tsao, P., S. Guy, 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora*-isolation médium containing Hymexazol. *Phytopathology* 67: 796-801.
- Tsuneo, W., 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultural fungi and key to species. Third edition. CRC Press, Florida.
- Uehling, J., A. Gryganskyi, K. Hameed, T. Tschaplinski, P.K. Mszal, S. Wu, A. Desirò, N. Vande Pol, Z. Du, A. Zienkiewicz, K.

- Zienkiewicz, E. Morin, E. Tisserant, R. Splivallo, M. Hainaut, B. Henrissat, R. Ohm, A. Kuo, J. Yan, A. Lipzen, M. Nolan, K. LaButti, K. Barry, A.H. Goldstein, J. Labbé, C. Schadt, G. Tuskan, I. Grigoriev, F. Martin, R. Vilgalys, G. Bonito, 2017. Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. *Environmental Microbiology* 19: 2964-2983.
- Van den Berg, N., D.K. Berger, I. Hein, P. Birch, M.J. Wingfield, A. Viljoen, 2007. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular Plant Pathology* 8: 333-341.
- Vitale, A., D. Aiello, V. Guarnaccia, G. Perrone, G. Stea, G. Polizzi, 2012. First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonecrotia*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*). *Journal of Phytopathology* 160: 156-159.
- Yadav, D.R., S.W. Kim, A.G. Babu, M. Adhikari, C. Kim, H.B. Lee, Y.S. Lee, 2014. First report of *Mortierella alpina* (Mortierellaceae, Zygomycota) isolated from crop field soil in Korea. *Mycobiology* 42(4): 401-404.

## Artículo 4.

Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 10 número 4 16 de mayo - 29 de junio, 2019

Nota de investigación

### Control orgánico *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* con aceites esenciales de orégano y clavo

Yisa María Ochoa Fuentes<sup>1</sup>  
 Anselmo Hernández Pérez<sup>1</sup>  
 Juan Carlos Delgado Ortiz<sup>2</sup>  
 Omegar Hernández Bautista<sup>2</sup>  
 Ernesto Cerna Chavez<sup>1</sup>  
 Luis Alberto Aguirre Uribe<sup>1</sup>  
 Luis Mario Tapia Vargas<sup>3§</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (yisa8a@yahoo.com; jabaly1@yahoo.com; luisaguirreu@yahoo.com.mx).

<sup>2</sup>CONACYT-UAAAN Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (hernandez.anselmol@gmail.com; moe-788@hotmail.com). <sup>3</sup>Campo Experimental Uruapan- INIFAP. Avenida Latinoamericana No. 1101, Colonia Revolución, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60500.

§Autor para correspondencia: mariotv60@hotmail.com.

## Resumen

Michoacán es el principal estado productor de aguacate en el mundo; sin embargo, las enfermedades radiculares diezman y dañan los árboles ocasionando su muerte. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el control orgánico del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* con aceites esenciales de orégano (*Lippia berlandieri*) y clavo (*Syzygium aromaticum*). En los meses de octubre y noviembre de 2016, se recolectaron muestras de raíces en árboles con síntomas de la enfermedad en aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass), en la huerta experimental del INIFAP ubicada en San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Los aislados se identificaron morfológica y molecularmente. Se evaluó el control de *P. cinnamomi* con aceites esenciales de orégano y clavo determinando la concentración media inhibitoria y sus límites fiduciales al 95% mediante una regresión Probit por el método de máximas verosimilitud. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R 3.4. De acuerdo con los resultados obtenidos, en relación con la inhibición del crecimiento hay una reducción en el crecimiento de *P. cinnamomi*. Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia berlandieri*) son una alternativa natural para el control del oomiceto *P. cinnamomi* por su actividad fungicida a bajas concentraciones y pueden incluirse en programas de manejo integrado de enfermedades.

**Palabras clave:** *Persea americana* Mill. var. Hass., aceite esencial, inhibición, tasa de crecimiento.

Recibido: marzo de 2019

Aceptado: junio de 2019

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es el fruto de un árbol originario de México y Centroamérica (Téliz, 2000). La producción mundial del cultivo es de alrededor de 4 700 000 toneladas y 70.3% de esta producción lo aporta el continente americano (FAOSTAT, 2015). La República Mexicana es la más importante productora y exportadora de aguacate en el mundo, con una producción de casi 2 millones de toneladas, de las cuales el estado de Michoacán aporta 77% de la producción nacional, convirtiéndolo en la capital mundial de este cultivo (SIAP 2017).

Sin embargo, existen diferentes limitantes fitosanitarias, las cuales, reducen significativamente el rendimiento, ocasionando malformaciones del fruto, causan pérdidas considerables en postcosecha 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 cosmopolita *Phytophthora cinnamomi*, causante de la pudrición del sistema radicular y en la parte aérea del árbol una marchitez conocida como tristeza del aguacatero, *P. cinnamomi* es considerado de gran importancia económica (Zentmyer *et al.*, 1994; Pérez, 2008).

Este patógeno, ataca a todas las variedades de aguacate en el mundo, dañando las raíces por efecto de un taponamiento de los haces vasculares, traduciéndose en 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, como por ejemplo en la región de Atlixco, Puebla, donde ocasionó la casi desaparición de este cultivo Reyna (1983). En la región productora de Michoacán, se considera que alrededor de 4 000 ha están afectadas por la enfermedad, presentando una tendencia exponencial (Téliz, 2000).

En este sentido, es necesario tener amplio conocimiento del comportamiento *in vitro* de *P. cinnamomi* así como de alternativas orgánicas para su control. Por consiguiente, se requiere partir de medios de cultivos alternativos para acelerar su desarrollo y por ende poder efectuar evaluaciones rápidas en cuanto a su crecimiento, ya que este fitopatógeno es afectado en su desarrollo *in vitro* por diferentes factores como la temperatura. El control de las enfermedades fúngicas, ha dependido en gran medida de los tratamientos con agroquímicos; sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medio ambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011).

Para reducir este problema, existe la necesidad de investigar, generar, validar, transferir y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini *et al.*, 2010). En la actualidad, los productos naturales gozan de amplia aceptación y reemplazan cada vez más a los productos de síntesis química.

Como respuesta a esta tendencia, se ha producido un creciente interés en la investigación de la posible utilización de aceites esenciales y extractos de plantas como fungicidas naturales, que no sean perjudiciales para el medio ambiente (Benites *et al.*, 2009; Bajpai y Kang, 2010). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida (Wilson *et al.*, 1997; Gogoi *et al.*, 1997), por lo cual, ha incrementado el interés por la aplicación de este tipo de productos como agentes antimicrobianos naturales en alimentos y cultivos agrícolas (Celis *et al.*, 2012). Por ende, la agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos inocuos y libres de residuos de productos químicos, seguros para la salud humana (Ponce *et al.*, 2004).

Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la dinámica del crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* en medios de cultivo alternativos y su control con aceites esenciales de orégano (*Lippia berlandieri*) y clavo (*Syzygium aromaticum*).

Muestreo: en los meses de octubre y noviembre de 2016, se recolectaron muestras de raíces en árboles de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) bajo presión de inóculo que presentaban sintomatología característica de muerte descendente conocida como tristeza del aguacate. El sitio de recolección fue la huerta experimental del INIFAP ubicada en San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán, cuyas condiciones climáticas semicálidas, subhúmedas con lluvias en verano, oscilan entre los 1200 a 1600 mm de precipitación y temperaturas de 10 a 28 °C (García, 1981).

Se realizó un muestreo dirigido cercano al área de goteo a una profundidad de 30 cm en cuatro puntos equidistantes. Con ayuda de una pala recta se tomaron las muestras de raíz (2 a 6 mm de diámetro), con presencia de daño (tejido necrosado color café oscuro) y se colocaron en bolsas de polietileno previamente rotuladas con los datos de la huerta, municipio y georreferenciación, posteriormente se transportaron al laboratorio de fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Aislamientos de los fitopatógenos: se lavaron las raíces con agua destilada estéril para fragmentarlas en trozos no mayores a 0.5 cm, con un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal seleccionando los límites de tejido sano y enfermo, los cortes de raíz se lavaron en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente previamente esterilizado. Posteriormente, se sembraron en medio selectivo V8<sup>®</sup>-PARPH colocando cuatro 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 obscuridad total (Fierro, 2011).

Purificación y multiplicación: Se transfirieron a medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar (Erwin y Ribeiro, 1996), cepas con crecimiento característico de *P. cinnamomi*. La técnica de purificación utilizada fue por punta de hifa por triplicado, colocadas el centro de la caja Petri, fueron selladas con filme plástico sellador (*cling wrap*) y se incubaron a 28 °C en cámara bioclimática durante 72 h en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola.

Identificación morfológica y molecular: la esporulación del patógeno se indujo con tiempo de incubación de 7 días y temperatura controlada de 28 °C ± 2, se identificaron morfológicamente considerando micelio cenocítico, hialino, con presencia de oogonio y crecimiento coraloide, coincidiendo con lo reportado por Erwin y Ribeiro (1996) y molecularmente mediante la técnica PCR-ITS, extrayendo ADN de acuerdo con la metodología de Doyle y Doyle (1990), a partir de 0.2 g de micelio del cultivo puro 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<sup>®</sup>). 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<sup>®</sup>) y el producto del PCR se mandó secuenciar al laboratorio de diagnóstico fitosanitario UA-LAB.

Bioensayos: los aceites esenciales (AE) se obtuvieron de hojas de orégano (*Lippia berlandieri*) (T1) y botones florales de clavo (*Syzygium aromaticum*) (T2), mediante a la técnica de arrastre de vapor (Ortuño, 2006). Se determinó la efectividad biológica de los AE sobre *P. cinnamomi* con la metodología del medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar envenenado con diferentes concentraciones 5, 45, 80, 200, 400 y 800 ppm con cuatro repeticiones cada una y un testigo absoluto, se agregó alcohol, tween 80 y goma xantana como agentes emulsificantes.

La siembra se realizó transcurridas las 24 h colocando explantes de 5 mm de diámetro en el centro de las cajas Petri y se incubaron en oscuridad total a  $28 \pm 2$  °C. Para registrar el crecimiento micelial, se midió el crecimiento radial cada 24 h en los cuatro puntos cardinales de las cajas y finalizó cuando los testigos absolutos (TA) del fitopatógeno llenaron la caja Petri. Se calculó el porcentaje de inhibición en *P. cinnamomi* empleando la fórmula utilizada por Ochoa *et al.* (2012) la cual consiste en determinar el porcentaje mediante la razón de la diferencia de los tratamientos y el testigo, respecto al crecimiento del testigo.

Análisis estadístico: en los bioensayos, se determinó la concentración media inhibitoria y sus límites fiduciales al 95% mediante una regresión Probit por el método de máximas verosimilitud. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R 3.4.

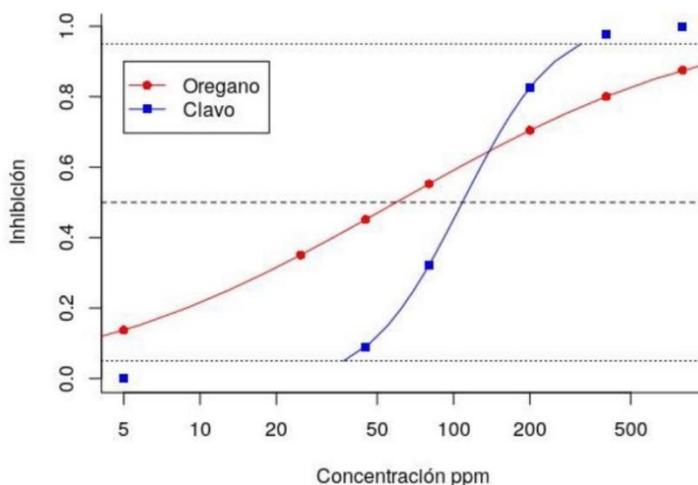
Derivado del aislamiento e identificación morfológica y molecular de los fitopatógenos obtenidos de los muestreos realizados en la huerta experimental bajo presión de inóculo, se lograron obtener diferentes cepas de la misma especie coincidiendo con las claves de identificación de Erwin y Ribeiro (1996) para *P. cinnamomi*, confirmando la identificación mediante comparar los productos de la secuenciación con los registros de la base de datos del GenBank (Cuadro 1).

**Cuadro 1. 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>	Núm. de acceso <sup>2</sup>	Especie	Similaridad <sup>3</sup>	Origen <sup>4</sup>
Pc-33	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
Pc-41	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
Pc-42	KP183223.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Australia B

<sup>1</sup>= nomenclatura para los diferentes aislamientos; <sup>2</sup>= número de acceso en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information); <sup>3</sup>= índice de similitud entre las secuencias de las especies aisladas y las especies comparadas; <sup>4</sup>= origen geográfico de los aislados.

Referente a la inhibición obtenida con los aceites esenciales, las regresiones son altamente significativas en los tratamientos evaluados ( $\alpha = 0.05$ ) a que a mayor concentración se observó una reducción en el crecimiento de *P. cinnamomi* (Figura 1). La concentración media inhibitoria estimada para el aceite esencial de orégano fue 59.36 ppm, obteniendo una inhibición de 100% contra el crecimiento micelial del Oomiceto a una concentración de 800 ppm.



**Figura 1. Inhibición de *P. cinnamomi* con aceite esencial de orégano y clavo a diferentes concentraciones.**

En *P. infestans*, fitopatógeno perteneciente al mismo género, Soylu *et al.* (2006) Reportó inhibición total con aceite esencial de orégano a una dosis de  $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ , investigaciones similares refieren el uso de este aceite para el control del Deuteromicetos, Cueto *et al.* (2010) presenta resultados de la acción fungicida del aceite y extracto etanólico de orégano sobre *Fusarium oxysporum*, sin embargo la acción antifúngica pueden variar según la biología del patógeno: por ejemplo, García *et al.* (2006) reportó una inhibición de 100% a una concentración de 100 ppm en *Aspergillus flavus*, cuyo valor de  $CI_{50}$  es más bajo respecto a nuestra investigación. Por otra parte, Carrillo *et al.* (2010) atribuye su efecto fungicida asociándolo con el contenido de timol y carvacrol.

Estos compuestos de unidades terpénicas presentes en los aceites esenciales de algunas especies de la familia Lamiaceae, actúan causando alteraciones en la morfología y agregados hifales, provocando una reducción del crecimiento mediante la lisis entre la pared y la membrana celular del agente patógeno (Kordal *et al.*, 2008).

El carvacrol aumenta la fluidez de la membrana causando fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y la inhibición de la síntesis del ATP (Fisher y Phillips, 2008). Respecto al aceite esencial AE clavo (T2), presentó una  $CI_{50}$  más alto que AE orégano siendo 1.824x mayor (Cuadro 2); sin embargo, al observar su  $CI_{95}$ , este valor es menor respecto a T1 (AE orégano), considerando la Figura 1, esto se debe a la homogeneidad de la susceptibilidad del patógeno al aceite esencial (T2), la cual se encuentra con menor cantidad de aceite, diferente de T1, el cual requiere mayor concentración para incrementar la inhibición, actualmente, este aceite esencial es utilizado en la agricultura para contrarrestar otros fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae* (Browers y Locke, 2004). *S. aromaticum* obtenidos por destilación tradicional y asistido por microondas, es eficiente para inhibir el desarrollo de *Alternaria solani* y *Colletotrichum gloeosporioides* en 30 y 10% aislados de tomate y papaya, respectivamente (Ramírez *et al.*, 2016). Por otra parte, Damián *et al.* (2010) reportaron que el extracto de *Artemisa* sp., inhibe 100% del crecimiento micelial de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. mirabilis*, así como 60% de *P. infestans*, a una dosis 100 ppm, esta información difiere a los resultados del presente estudio se necesitan mayores concentraciones para el control de *P. cinnamomi*.

**Cuadro 2. Concentración media inhibitoria de los aceites esenciales sobre *P. cinnamomi*.**

Tratamiento	n	gl	ppm				Ec. Pred.	P valor
			CI <sub>50</sub>	LFI - LFS	CI <sub>05</sub>	CI <sub>95</sub>		
<i>Lippia berlandieri</i>	24	5	59.36	26.84-114.09	1.437	2451.75	y= -1.8+1.01	6.5e <sup>-06</sup>
<i>Syzygium aromaticum</i>	24	5	108.3	87.29-134.06	36.862	318.208	y= -7.15+3.51	1.71e <sup>-11</sup>

N= número de repeticiones; gl= grados de libertad; CI= concentración inhibitoria, LFI y LFS limite fiducial superior e inferior al 95%; Ec. pred.= ecuación de predicción, P valor, valor de probabilidad ( $\alpha= 0.05$ ).

Raina (2001) por cromatografía de gases evaluó la composición del aceite de clavo, señalando que el alilbenceno eugenol es el principal compuesto con 94%, cuyo modo de acción propicia la disrupción de la actividad citoplasmática de la membrana aumentando su permeabilidad no específica, además sugiere que eugenol posee actividad inhibitoria de la ATPasa (Gutiérrez *et al.*, 2017). Ambos tratamientos son agentes potenciales de control que pueden ser incluidos en programas de manejo de la tristeza del aguacatero causada por *P. cinnamomi*, los compuestos y metabolitos secundarios de las diferentes especies botánicas juegan un papel importante en su resistencia contra plagas, por lo cual, las investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales permiten descubrir nuevos agentes para el control de fitopatógenos de forma orgánica (Kordali *et al.*, 2007; Lee, 2007).

## Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, el medio de cultivo Centeno-agar fue el más eficiente para el aislamiento y proliferación de *Phytophthora cinnamomi* obteniendo un mayor crecimiento de estructuras morfológicas. Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia berlandieri*) son una alternativa botánica para el control del oomiceto *P. cinnamomi* por su actividad fungicida por lo que pueden incluirse en programas de manejo integrado de enfermedades, a un costo más bajo que agroquímicos convencionales.

## Literatura citada

- AALPAUM. 2016. Asociación agrícola local de productores de aguacate de Uruapan, Michoacán. <http://www.aalpaum.com>.
- Abdel-Monahim, M. F.; Abo-Elyousr, K. A. M. and Morsy, K. M. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop Prot. 30:185-191.
- Bajpai, V. K. and Kang. S. C. 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. J. Am. Oil Chem. Soc. 87:327-336.
- Benites, N. P.; Meléndez, E. and Stashenco, E. E. 2009. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada en Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromática. 8(4):301-304.
- Bowers, J. and Locke, J. C. 2004. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotiana* in soil and control of Phytophthora blight in the greenhouse. Plant. Dis. 88:11-16.

- Carrillo, Y. A.; Gómez, M. I.; Cotes, J. M. y Núñez, C. E. 2010. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. *Agron. Colomb.* 28(2):245-253.
- Celis, F. A.; Mendoza, F. C. y Pachón, S. E. 2012. Plantas aromáticas silvestres promisorias por su contenido de aceites esenciales. Universidad de Cundinamarca. Ed. Produmedios. Bogotá, DC. Colombia. 56 p.
- Coffey, M. D. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. *In: Plant.* 22:423-444.
- Cueto, W. M. C.; Rivas-Morales, C.; Alanís-Guzmán, M. G.; Oranday-Cárdenas, A.; Amaya-Guerra, C. A.; Núñez-González, A.; Samaniego-Gaxiola, J. A. and Cano-Ríos, P. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Mex. Micol.* 31:29-35.
- Damián, B. L. M.; Martínez, M. R. E.; Salgado, G. R. and Martínez, P. M. M. 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 9(2):136-142.
- Doyle, J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.
- Erwin, D. and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwite. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. 269-280 pp.
- FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fisher, K. and Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol.* 19:156-64.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, Adaptado para las Condiciones de la República Mexicana. 3ª Ed. Offset. Lario (Ed). SA. 252 p.
- García-Camarillo, E.; Quezada-Viay, M.; Moreno-Lara, J.; Sánchez-Hernández, G.; Moreno-Martínez, E. y Pérez-Reyes, M. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangerh) K. Koch]. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24(1):8-12.
- Gogoi, R.; Baruah, P. and Nath, S. C. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Lisea cubeba* Pers. *J. Essential Oils Res.* 9:213-215.
- Gutiérrez-Jiménez, E.; Pedroza-Sandoval, A.; Martínez-Bolaños, L.; Samaniego-Gaxiola, J. A. and García-González, F. 2017. Effect of natural oils against *Mycosphaerella jiansis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals. *Rev. Mex. Fitopatol.* 36(1).
- Kordal, S.; A. Cakir, H.; Ozer, R.; Cakmakci, M.; Kesdek and Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour. Technol.* 99(18):87-95.
- Kordali, S.; Kotan, R. and Cakir, A. 2007. Screening of *in vitro* antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes as plant disease control agents. *Allelopathy J.* 19:373-392.
- Lee, H. 2007. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Biores. Techn.* 98:1324-1328.
- Naeini, A.; Ziglari, T.; Shokri, H. and Khosravi, A. R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *J. Med. Mycol.* 20(3):174-178.
- Ochoa-Fuentes, Y. M.; Cerna, E.; Gallegos, G.; Landeros, Delgado, J. C.; Hernández, S.; Rodríguez, R. and Olalde, V. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Micol.* 36:27-32.
- Ortuño, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana, 1ª edición. 121 p.

- Pérez, J. R. M. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. 2(1):1-24.
- Ponce, A. G.; Del Valle, C. and Roura, S. I. 2004. Evaluation of plant essential oil as natural posharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Inter. Soc. Hortic. Sci.* 628:737-745.
- R Core Team. 2018. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.
- Raina, V. K.; Srivastava, S. K.; Aggarwal, K. K.; Aggarwal, K. V. and Syamasundar, S. K. 2001. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour Fragr. J.* 16:334-336.
- Ramírez-González, S.; López-Báez, O.; Espinosa-Zaragoza, S. y Wong-Villarreal, A. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(8):1879-1891.
- Reyna, T. T. 1983. Consideraciones sobre el cultivo del aguacate *Persea americana* Mill. en Atlixco, Puebla. *Invest. Geog.* 13:55-103.
- SAGARPA. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación. Sistema de Información agroalimentaria y pesquera. Boletín Informativo. México, DF. <https://www.sagarpa.gob.mx/siap>.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México. <https://www.siap.gob.mx>.
- Soylu, E. M.; Soylu, S. and Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathol.* 161(2):119-128.
- Tajkarimi, M.; Ibrahim, S. and Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control.* 21(19):1199-1218.
- Téliz, O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa. México, DF. 219 p.
- Téliz, O. D. y Marroquín, P. F. 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. In: Téliz, O. D. y Mora, A. (Eds.). El aguacate y su manejo integrado. 2ª (Ed.). Mundi-Prensa. México. 3-16 pp.
- Whiley, A.W.; Schaer, By. y Wosltenholme, B. N. 2007. El Palto, botánica producción y usos. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Chile. 364 p.
- Wilson, C. L.; Ghaouth, A.; Wisniewski, M. E. and Wisniewski, M. E. 1999. Prospectin in mature's storehouse for Biopesticides. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17:49-53.
- Zentmyer, G.; Ohr, H. and Menge, J. 1994. Compendium of tropical fruit diseases. The American Phytopathological Society. 76 p.

**Artículo en redacción.****Caracterización Molecular de Cuatro Selecciones de Aguacate Mediante  
Microsatélites****Molecular Characterization of Two Avocado Selections using Microsatellite  
Markers**

**Anselmo Hernández Pérez<sup>1\*</sup>, Moisés Cortés-Cruz<sup>2</sup>, Yisa María Ochoa Fuentes<sup>3</sup>,  
Ernesto Cerna Chávez<sup>3</sup>, Juan Carlos Delgado Ortiz<sup>4</sup>, Mariana Beltrán Beache<sup>5</sup>, Luis  
Mario Tapia Vargas<sup>6</sup>.**

<sup>1</sup>Estudiante del postgrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México C.P. 25315.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos, Laboratorio de ADN y Genómicas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Blvd. de la Biodiversidad 400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, C.P. 47620.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México C.P. 25315.

<sup>4</sup>Catedrático CONACYT-UAAAN. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México C.P. 25315.

<sup>5</sup>CULTA S.A. de C.V., Investigación y Desarrollo, Altavista, El Mante, Tamaulipas, México C.P. 89880.

<sup>6</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Uruapan. Av. Latinoamericana No. 1101 Col. Revolución C.P. 60500, Uruapan, Michoacán, México.

hernandez.anselmo@inifap.gob.mx (\*Autor de correspondencia)

**Resumen**

México es considerado el centro de origen del cultivo del aguacate. Sin embargo, existe un limitado número de variedades registradas alternativas al monocultivo "Hass". Una alternativa para llegar a la obtención de registros de nuevas variedades, puede ser la caracterización con marcadores moleculares. Por lo anterior, el objetivo de la presente

investigación fue caracterizar mediante el uso de marcadores microsatélites, cuatro materiales prominentes de aguacate, seleccionados por el INIFAP, Campo Experimental Uruapan con el uso de marcadores moleculares microsatélites y comparar sus perfiles genéticos con la variedad comercial "Hass". Se analizaron muestras foliares de 24 árboles de aguacate ubicados en huertas experimentales del INIFAP; se realizó la extracción de ADN para su amplificación con 10 marcadores microsatélites. Se determinó los pesos moleculares de los productos de PCR para la construcción de la matriz de datos codominantes. El análisis de datos se realizó en el programa GenAlex v6.5 y la construcción del dendrograma con el programa Mega 5.2. Se detectaron un total de 90 alelos. Las poblaciones en estudio resultaron polimórficas, permitiendo su diferenciación. Los resultados promedio para la heterocigosidad esperada fue de 0.574. Los diez marcadores detectaron alelos exclusivos para el total de poblaciones, destacando la población Gotcha que se identifica con el 80% de los marcadores. El análisis de agrupamiento por el método "Neighbor-Joining", identificó dos grupos principales, destacando el Grupo II por la separación de las poblaciones Gotcha y Jicalán, poblaciones diferentes al material de referencia ("Hass") y que pueden ser sujetas a registro como nuevas variedades de aguacate para la República Mexicana.

### **Abstract**

Mexico is considered the center of origin of avocado cultivation. However, there is a limited number of alternative varieties to the "Hass" monoculture. An alternative to obtain the registration of new varieties, can be the characterization with molecular markers. Therefore, the objective of this research was to characterize, through the use of microsatellite markers, four prominent avocado materials, selected by the INIFAP, Experimental Field Uruapan with the use of microsatellite molecular markers and to compare their genetic profiles with the commercial variety "Hass ". Foliar samples of 24 avocado trees located in experimental gardens of INIFAP were analyzed; DNA extraction was performed for its amplification with 10 microsatellite markers. The molecular weights of the PCR products were determined for the construction of the codominant data matrix. The data analysis was performed in the Gen Alex v6.5 program and the construction of the dendrograms with the Mega 5.2 program. A total of 90 alleles were detected. The

populations under study were polymorphic, allowing their differentiation. The average results for the expected heterozygosity was 0.574. The ten markers detected exclusive alleles for the total populations, highlighting the Gotcha population that is identified with 80% of the markers. The grouping analysis by the method "Neighbor-Joining", identified two main groups, highlighting the Group II by the separation of the populations Gotcha and Jicalán, populations different from the reference material ("Hass") and that can be subject to registration as new avocado varieties for the Mexican Republic.

**Palabras clave:** Aguacate, microsatélites, distancias genéticas, caracterización varietal.

**Key words:** Avocado, microsatellites, genetic distances, varietal characterization.

## INTRODUCCIÓN

La República Mexicana es la más importante productora, exportadora y consumidora de aguacate (*Persea americana* Mill) en el mundo, con una producción de casi 2 millones de toneladas anuales, de las cuales el estado de Michoacán aporta el 77% de la producción nacional (SIAP 2017). El aguacate es el fruto de un árbol originario de México y Centroamérica (Téliz, 2000). Se tiene conocimiento que en México existen al menos 20 diferentes especies, de las cuales el 66 % son endémicas y se distribuyen principalmente en los estados de Puebla, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Morelos, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Yucatán y la región de las Huastecas Potosina e Hidalguense (Cadena *et al.*, 2016). No obstante, y a pesar de la gran diversidad que existe entre especies, razas y tipos criollos, existe un limitado número de variedades registradas alternativas al monocultivo "Hass", por lo anterior es necesario hacer frente a la demanda de los productores, exportadores y consumidores a fin de contar con nuevas variedades que presenten características organolépticas de acuerdo con las necesidades del mercado nacional e internacional. Uno de los factores a esta problemática se atribuye a los esquemas clásicos de mejoramiento genético en frutales, que requieren largos periodos de tiempo para la hibridación, selección y caracterización morfológica. En algunos casos, estos esquemas pueden llevar hasta 45 años, como sucedió en el desarrollo de algunas variedades generadas por el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del

Aguacate del Estado de México (CICTAMEX). Este tiempo se explica debido a la problemática que presenta el mejoramiento genético del cultivo del aguacate por las características propias de la especie, la condición altamente heterocigótica y un periodo de juvenilidad extendido (Rogel-Castellanos, 1999). Ante esta problemática, las investigaciones enfocadas en el mejoramiento genético del aguacate podrían generar variedades alternativas siguiendo metodologías que engloben la selección de materiales tipos criollos, variantes de cultivares, evaluación de segregantes, promoción de polinjertos y generación de híbridos por cruzas controladas, con la finalidad de obtener registro de nuevos materiales alternativos al cultivar ‘Hass’ (Rogel-Castellanos, 1999; Cadena *et al.*, 2016). Una alternativa para fortalecer el proceso de selección de materiales sobresalientes de aguacate, así como para realizar la caracterización (y eventualmente poder llegar a la obtención de registros de nuevas variedades), puede ser la caracterización molecular. Esta metodología permite trabajar en cualquier etapa fenológica del cultivo, generalmente no es afectada por el ambiente, es de rápida implementación y actualmente, los costos de ejecución se han reducido considerablemente (Gutiérrez Díez *et al.*, 2009).

El conocimiento de la diversidad genética es fundamental para el desarrollo de cualquier estrategia significativa para la recolección, manejo y conservación del germoplasma, la domesticación y el mejoramiento de los recursos genéticos de las especies (Chiveu *et al.*, 2009). Estudiar la biología molecular de las plantas permite conocer la estructura, propiedades y funciones de los componentes moleculares básicos de las células individuales y cómo actúan en la conducción y regulación de procesos, como lo es la transmisión de información genética (Vitale, 2017). El uso de marcadores moleculares permite estimar parámetros básicos de diversidad genética, cuya información puede ser utilizada con fines de conservación, determinar el tamaño efectivo de la población, identificar cuellos de botella ocasionados por causas naturales o antropogénicas, conocer el origen poblacional, nivel de endogamia y el flujo génico (Hedrick, 2004). Las relaciones genéticas del aguacate han sido estudiadas con diversos marcadores moleculares como: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Furier, *et al.*, 1990), minisatélites y microsátélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Schnell *et al.*, 2003; Ashworth y Clegg 2003; Ashworth *et al.*, 2004; Alcaraz y Hormaza 2007), polimorfismo de nucleótido único (SNP) (Chen *et al.*, 2008) y ADN polimórfico

amplificado al azar (RAPD) (Fielder *et al.*, 1998). Estos estudios han mostrado una complejidad genética, debido a que el aguacate, al ser una especie con polinización abierta, facilita la segregación genética y por ende una gran variabilidad (Sánchez, 1999).

El uso de microsatélites (SSR), han demostrado ser eficientes para caracterizar la variabilidad genética de aguacate. Las características que presentan estos marcadores como codominancia y alto grado de polimorfismo son adecuadas para investigar la estructura de la población, la historia de las especies y la diversidad alélica. Adicionalmente, su detección por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), alta reproducibilidad y variabilidad, favorecen su implementación y análisis para la identificación de parámetros genéticos como la heterocigosidad, estructura y distancias genéticas entre poblaciones (Litt y Luty, 1989; Smeets *et al.*, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989 y Garris *et al.*, 2005). Estas ventajas de los marcadores SSR, evidencia que la caracterización molecular puede ser el inicio y una alternativa fiable para la identificación de nuevas especies o cultivares, inclusive cuando genéticamente sean muy similares. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar mediante el uso de marcadores microsatélites, cuatro materiales prominentes de aguacate, seleccionados por el INIFAP, Campo Experimental Uruapan con el uso de marcadores moleculares microsatélites y comparar sus perfiles genéticos con la variedad comercial “Hass”.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Recolección de material vegetal**

En el mes de septiembre del 2018, se recolectaron muestras de tejido foliar de árboles de aguacate en huertas experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicadas en el municipio de Tacámbaro (población 1), en el Campo Experimental Uruapan (poblaciones 2, 3 y 4) y en la localidad de Jicalán (población 5), todas pertenecientes al estado de Michoacán, México. Las condiciones climáticas que presentan cada sitio de muestreo son semicálidas, subhúmedas con lluvias en verano, oscilan entre los 1200 a 1600 mm y temperaturas de 10 a 28 °C (García, 1981).

El muestreo fue dirigido en cuatro puntos cardinales de la copa de los árboles en estudio; se muestrearon cinco árboles de cada población y cinco hojas jóvenes por cada árbol (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Datos georreferenciales de las selecciones de aguacate en estudio.

<b>Población</b>	<b>Nombre de la población</b>	<b>Número de individuos</b>	<b>Altitud (*msnm)</b>	<b>Latitud N</b>	<b>Longitud W</b>
1	Gotcha	5	1640	19°13'40"	101°28'19"
2	Hass	4	1621	19°24'27"	102°03'06"
3	Ceu-Biotec	5	1621	19°24'27"	102°03'06"
4	Ceu-Cocher	5	1621	19°24'27"	102°03'06"
5	Jicalán	5	1653	19°24'13"	102°04'47"

\*msnm: metros sobre el nivel del mar.

Posteriormente, cada muestra fue identificada y conservada en fresco (16 °C) para su posterior traslado al Laboratorio de ADN y Genómicas, del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP. Al momento de la recepción en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas a -80 °C por al menos 48 h. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas durante 5 días, a una presión de 0.035 Bar en el equipo FreeZone Plus 12 (LABCONCO, Kansas City, MO, EE. UU.). Transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se inspeccionaron visualmente, para asegurarse que estuvieran completamente deshidratadas. Las muestras liofilizadas fueron pulverizadas con el equipo Tissue Lyser II (QIAGEN, Hilden, Germany), a una velocidad de 30 Hz (30 oscilaciones por segundo) durante 90 segundos o hasta que estuvieran completamente pulverizadas. Finalmente, las muestras pulverizadas fueron almacenadas a -80°C, hasta el momento de realizar la extracción de ADN.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN genómico se realizó con el protocolo específico para plantas tropicales (Huang *et al.*, 2013) con modificaciones propias del laboratorio. Para iniciar este proceso, de cada muestra se colocaron aproximadamente 50 mg de tejido pulverizado en tubos eppendorf de 2 mL. En campana de flujo laminar, bajo condiciones asépticas y con apoyo de micropipeta, a cada tubo se le adicionó 1 mL de solución amortiguadora CTAB a 65°C (200 mM de Tris-HCl, 2 M NaCl, 25 mM de EDTA, 20 mM de Borax, 140 mM de 2-mercapto-etanol, 2% CTAB, 2 % PVP y 1% LSS). Se aseguró la homogeneización de la mezcla con apoyo de un palillo de madera previamente esterilizado y posteriormente se incubaron durante 45 min a 65 °C en agitación constante. Transcurrido el tiempo, se retiraron las muestras de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 10 min aproximadamente. Posteriormente se agregaron 700 µl de diclorometano, se mezclaron con apoyo de vortex hasta formar una solución homogénea, seguido de un paso de centrifugación a 14 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Del resultado anterior, la fase superior acuosa fue transferida a tubos eppendorf nuevos de 2 mL a los cuales se les dispensó previamente 700 µl de diclorometano, repitiendo el paso de lavado y centrifugado descrito previamente. Seguido de este paso, se transfirió de cada muestra la fase superior acuosa a tubos eppendorf de 2 mL que contenían 30 µl de RNasa (10 mg/mL), mezclando con inversiones suaves e incubando las muestras a 37 °C durante 30 min. El ADN fue precipitado agregando 800 µl de etanol absoluto frío, mezclando suavemente, para posteriormente incubar a -20 °C por 20 min. Después de este tiempo, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 5 000 rpm para concentrar en el fondo del tubo la pastilla de ADN. La solución fue decantada cuidadosamente, evitando que la pastilla de ADN se desprendiera del fondo. El siguiente paso fue realizar dos lavados de etanol, el primero, a una concentración del 75% y el segundo al 95%; la cantidad adicionada a cada muestra fue de 1 mL, mezclando por inversión durante 5 min, seguido de un paso de centrifugación después de cada lavado a 7 000 rpm durante 5 min. El alcohol se decantó y la muestra de ADN se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche. Finalmente, las pastillas de ADN se disolvieron en 200 µl de amortiguador TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su cuantificación.

### **Cuantificación de ADN**

La concentración, pureza e integridad del ADN obtenido de cada extracción realizada se determinó mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.) La concentración de la muestra de ADN se calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido por la longitud de onda de los valores 260 y 280 nm. La relación de absorbancia A260/280 se utilizó para evaluar la pureza de las muestras. Posteriormente se corroboró la integridad del ADN en geles de agarosa al 1% a los cuales se adicionó GelRed (GenScript®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En cada pocillo se cargaron 100 ng de ADN genómico, empleando como marcador de referencia el fago Lambda sin cortar (100 ng) (PROMEGA, Madison, WI, EE. UU.). Las condiciones de electroforesis fueron de 45 min a 80 voltios, con solución amortiguadora 1X TBE. Después de este tiempo, las muestras de ADN fueron visualizadas en un transluminador de luz ultra violeta (UV) y se capturaron las imágenes para la evaluación de la calidad del ADN con el sistema de fotodocumentación KODAK Gel Logic 100 (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.).

### **Análisis moleculares**

Para la realización de los análisis moleculares, se emplearon inicialmente 49 pares de microsatélites, de los cuales se seleccionaron diez con base en su polimorfismo, reproducibilidad y número de alelos identificados (Cuadro 2). Todas las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 7  $\mu$ L. Cada reacción de PCR fue realizada con 30 ng de ADN, 0.8 X de RedTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EE. UU.), 1  $\mu$ M de cada primer (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EE. UU.), 2.5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub> y agua bidestilada estéril (ddH<sub>2</sub>O). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 95 °C durante 40 s, un paso de alineamiento a 55 °C durante 40 s y un paso de extensión de 72 °C durante 90 s. Finalmente, un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min, para después mantener las muestras a 10 °C.

La amplificación de los marcadores microsatélites se realizó en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los productos amplificados por PCR fueron separados en cámaras verticales (C.B S. Scientific SG-160,

Del Mar, CA, EE. UU.) en geles de poliacrilamida sin urea 8% con dimensiones de 14 × 14.5 cm. Se colocaron 3.5 µl del producto de PCR en cada carril y marcador de peso molecular de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, EE. UU.) en cada extremo del gel. El ADN migró a través del gel, de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica (del polo negativo hacia el polo positivo), utilizando amortiguador de corrimiento 1X TBE por 1.5 h, a una alimentación de energía eléctrica constante de 250 Volts. Los fragmentos de PCR fueron visualizados mediante tinción de plata, de acuerdo con la metodología descrita por Sanguinetti *et al.* (1994). De cada gel, se capturaron imágenes con el sistema KODAK Gel Logic 100 (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.) para determinar los pesos moleculares de los productos de PCR de manera visual, considerando los fragmentos conocidos del marcador molecular de 100 pb y se construyó la matriz de datos codominantes.

### **Análisis de datos**

Para los análisis de datos, se empleó el software GenAlex v6.5 (Peakall y Smouse, 2012) para calcular los parámetros de diversidad genética a nivel poblacional: porcentaje de loci polimórficos ( $% P$ ), número promedio de alelos por locus ( $Na$ ), número efectivo de alelos ( $Ne$ ), heterocigosidad observada ( $Ho$ ) y la heterocigosidad esperada ( $He$ ). El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó a nivel de la población para mostrar gráficamente su dispersión, utilizando la matriz de distancias genéticas entre pares de accesiones en el software GenAlex v6.5. Se realizó un dendrograma entre las poblaciones mediante el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA5.2.

**Cuadro 2.** Marcadores utilizados para el análisis molecular de las diferentes poblaciones.

LOCUS	SECUENCIA 3' - 5'	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño esperado (pb)
ESTAVGA_01	F: GAGCGTTCCTTTTCATTCTA R: ATCCTTGTCGAACAAGCTAA	55	143
ESTAVTC_03	F: TCGTAAGGTTGAGTAGTTTTGA R: TTCAGCAAGCAATAGTGAGA	55	184
ESTAVTC_13	F: GCCGAATCGACTCTCTCT R: CCTTGTTGTGATTGTGTTTG	55	124
LMAV_03	F: CAGAGAATACGGATTTGC R: GTTCGAAGAAGCCTCAGTTA	55	156
LMAV_05	F: TGAAAGGCATGTGTGTGTAT R: AGTAAGTCGTACGTGGAGGA	55	239
LMAV_15	F: TTACCAGTGCTCCTGCTAAT R: TGCTCTCAAACCACTTCTCT	55	247
LMAV_22	F: ATTTTGGTGTGGGGGTAAT R: GCACTTTCTTCCCTCTAAGC	55	241
LMAV_24	F: CCCTTTCCAAGTTTCCTAAC R: CTGCAGAGGTAAGTCACCAT	55	195
LMAV_27	F: TCCAATTTGTGAGGAAATGT R: CCTTTGCATCTGCTTCTACT	55	152
LMAV_29	F: GAAAGTTCATCTGCTTCTGG R: CTCCAAGGACCGTACATATT	55	145

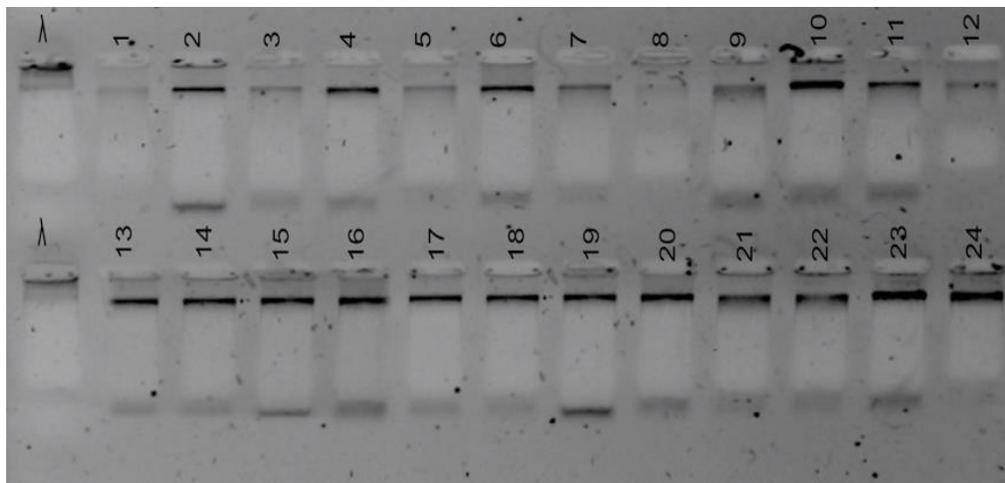
(Gross-German y Viruel, 2013).

Para el análisis de alelos que pudieran ser útiles para la identificación de las diferentes poblaciones de aguacate bajo estudio, se elaboró una matriz de datos que incluyera los marcadores y los pesos moleculares de los alelos identificados para cada población. Posteriormente, se identificaron aquellos alelos que estuvieran presentes exclusivamente en cada una de las poblaciones.

## RESULTADOS

### Calidad de ADN

La integridad de las muestras de ADN extraídas de las cinco poblaciones élite de aguacate (24 individuos) se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (figura 1).



**Figura 1.** Verificación de la integridad del ADN extraído en gel de agarosa al 1% de 24 individuos de cinco poblaciones élite de aguacate.

Esta imagen nos muestra que el protocolo de extracción de ADN utilizado en la presente investigación (Huang *et al.*, 2013 con modificaciones) fue eficiente para obtener una alta calidad e integridad del ADN de tejido de aguacate (*Persea americana sp.*) desde el punto de vista cualitativo. Todas las bandas de ADN presentan un peso molecular similar al marcador de referencia (ADN de alto peso molecular) y una banda sólida, sin barrido.

### Diversidad Genética

De los diez microsatélites polimórficos empleados en la presente investigación, se lograron detectar un total de 90 alelos ( $N_a$ ), en las cinco poblaciones analizadas. Los marcadores con mayor  $N_a$  fueron LMAV\_24 y LMAV\_27 con 16 y 15 alelos, respectivamente. Contrastado con los marcadores ESTAVTC\_03 y LMAV\_22, los cuales presentaron cuatro alelos y superados por LMAV\_15, ESTAVGA\_01, LMAV\_05,

LMAV\_03 con 5, 7, 8 y 9, respectivamente. Los marcadores LMAV\_29 y ESTAVTC\_13 presentaron un número similar de alelos (11) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Número de alelos por locus basados en diez marcadores polimórficos de cinco poblaciones de aguacate élite.

<b>Marcador</b>	<b><i>Na</i></b>
LMAV_24	16
LMAV_27	15
ESTAVTC_13	11
LMAV_29	11
LMAV_03	9
LMAV_05	8
ESTAVGA_01	7
LMAV_15	5
ESTAVTC_03	4
LMAV_22	4
PROMEDIO	9

### **Diversidad genética**

El valor promedio de polimorfismo ( $%P$ ) en las cinco poblaciones de estudio, fue del 100%. El menor valor de polimorfismo fue del 80% para las poblaciones 1 (Gotcha) y 2 (Hass) mientras que las poblaciones 3 (Ceú-Biotec), 4 (Ceú-Cocher) y 5 (Jicalán) presentaron un valor de 90%. El número promedio de alelos por locus ( $Na$ ) a través de todas las poblaciones fue de 3.06. Los valores oscilaron de 2.4 para la población 1 (Gotcha) a 3.6 para la población 4 (Ceú-Cocher) (cuadro 4).

Respecto al número de alelos efectivos ( $Ne$ ) se obtuvo un promedio de 2.736 para las cinco poblaciones y los valores fluctuaron de 2.239 (población 1) a 3.064 (población 3). La heterocigosidad observada ( $Ho$ ) en la población 1 fue de 0.800 (valor más alto) y de 0.660 (valor más bajo) en las poblaciones 3 y 4, registrando una media de 0.705.

Los resultados obtenidos de heterocigosidad esperada ( $He$ ) oscilaron de 0.458 a 0.592 para la población 1 y 4, respectivamente y una media de 0.534 (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Parámetros de diversidad genética en cinco poblaciones élite de aguacate.

<b>Nombre</b>	<b>Población</b>	<b><math>N</math></b>	<b><math>\%P</math></b>	<b><math>N_a</math></b>	<b><math>N_e</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>
Gotcha	1	5	80.00	2.400	2.239	0.800	0.458
Hass	2	4	80.00	2.800	2.522	0.700	0.472
Ceu-Biotec	3	5	90.00	3.500	3.064	0.660	0.584
Ceu-Cocher	4	5	90.00	3.600	3.034	0.660	0.592
Jicalán	5	5	90.00	3.000	2.821	0.700	0.566
	<b>Promedio</b>		86.00	3.060	2.736	0.704	0.534
	<b>*Acervo</b>		100	9.00	4.000	0.704	0.766

$N$  = Número de individuos,  $\%P$  = Porcentaje de polimorfismo,  $N_a$  = número promedio de alelos por locus,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $H_o$  = heterocigosidad observada,  $H_e$  = heterocigosidad esperada.

\*Para calcular los valores del acervo, asumimos que no había una estructura poblacional y que había una sola población panmítica.

### **Alelos exclusivos**

La identificación de los alelos exclusivos por cada marcador para las diferentes poblaciones analizadas se muestra en el cuadro 5. De los 10 marcadores empleados en el presente estudio, solo dos marcadores no detectaron alelos exclusivos para la población 1 (ESTAVTC\_13 y LMAV\_24) y no fueron considerados en el análisis. Los marcadores LMAV\_24, LAMV\_29, LMAV\_27 y LMAV\_03 detectaron alelos exclusivos para la población 2. Para la población 3, los marcadores que presentaron alelos exclusivos fueron ESTAVTC\_13, LMAV\_24, LMAV\_27 y LMAV\_03. Tres marcadores (LMAV\_27, LMAV\_03 y LMAV\_05) detectaron alelos exclusivos en la población 4 y los marcadores ESTAVGA\_01, ESTAVTC\_13, LMAV\_24, LMAV\_29 y LMAV\_22 detectaron alelos exclusivos para la población 5.

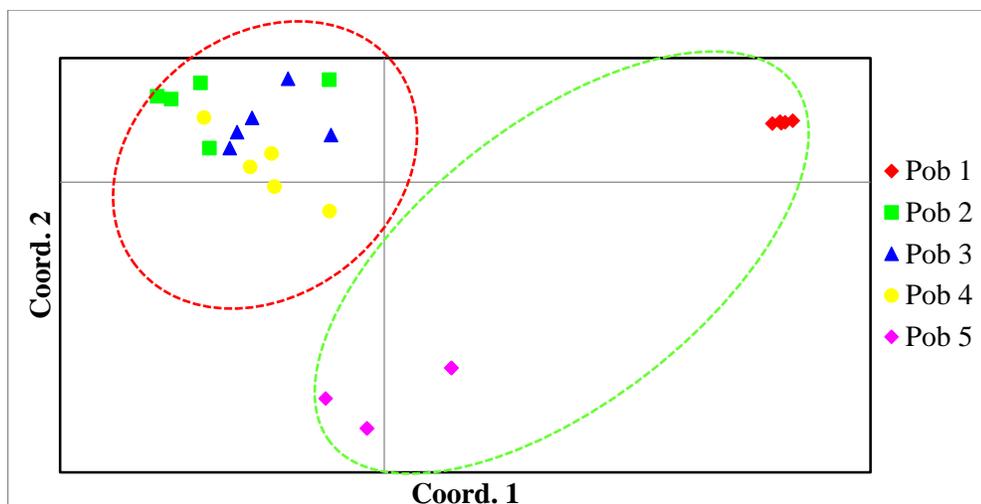
### **Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)**

De manera general las poblaciones 2 (Hass), 3 (Ceu-Biotec) y 4 (Ceu-Cocher) se agrupan en un mismo cuadrante, en contraste con las poblaciones 5 y 1 (Figura 2).

A nivel individual, las poblaciones 2, 3 y 4 muestran una mayor dispersión de sus individuos dentro de la población. En contraste, la población 1 muestra la menor dispersión de los individuos y en menor proporción, la misma tendencia se observa en la población 5.

**Cuadro 5.** Alelos exclusivos para las diferentes selecciones élite de aguacate.

<b>Marcador</b>	<b>Pob.</b>	<b>Nombre de la Población</b>	<b>Alelo identificado (pb)</b>												
ESTAVTC_03	1	Gotcha	440												
LMAV_15	1	Gotcha	880												
ESTAVGA_01	1	Gotcha	280	-											
	5	Jicalán	-	302											
ESTAVTC_13	3	Ceu-Cocher	178	182	188	-	198	204							
	5	Jicalán	-	-	-	194	-	-							
LMAV_22	1	Gotcha	716	-	800										
	5	Jicalán	-	780	-										
LMAV_05	1	Gotcha	808	-	820										
	4	Ceu-Cocher	-	810	-										
LMAV_24	2	Hass	-	544	-	-	-	620	-	-	626	-	-	640	
	3	Ceu-Biotec	532	-	-	-	-	-	610	-	-	-	-	-	
	5	Jicalán	-	-	546	552	562	-	-	622	-	628	636	-	
LMAV_29	1	Gotcha	-	362	366	368	388	392	-	-	-				
	2	Hass	-	-	-	-	-	-	396	-	-				
	5	Jicalán	336	-	-	-	-	-	-	400	404				
LMAV_03	1	Gotcha	-	-	-	-	-	418							
	2	Hass	-	388	-	-	-	-							
	3	Ceu-Biotec	386	-	-	-	410	-							
	4	Ceu-Cocher	-	-	396	406	-	-							
LMAV_27	1	Gotcha	-	-	-	-	368	-	383	-	-	398	-	402	
	2	Hass	-	-	362	-	-	-	-	-	-	-	400	-	
	3	Ceu-Biotec	-	356	-	366	-	-	-	386	394	-	-	-	
	4	Ceu-Cocher	352	-	-	-	-	380	-	-	-	-	-	-	

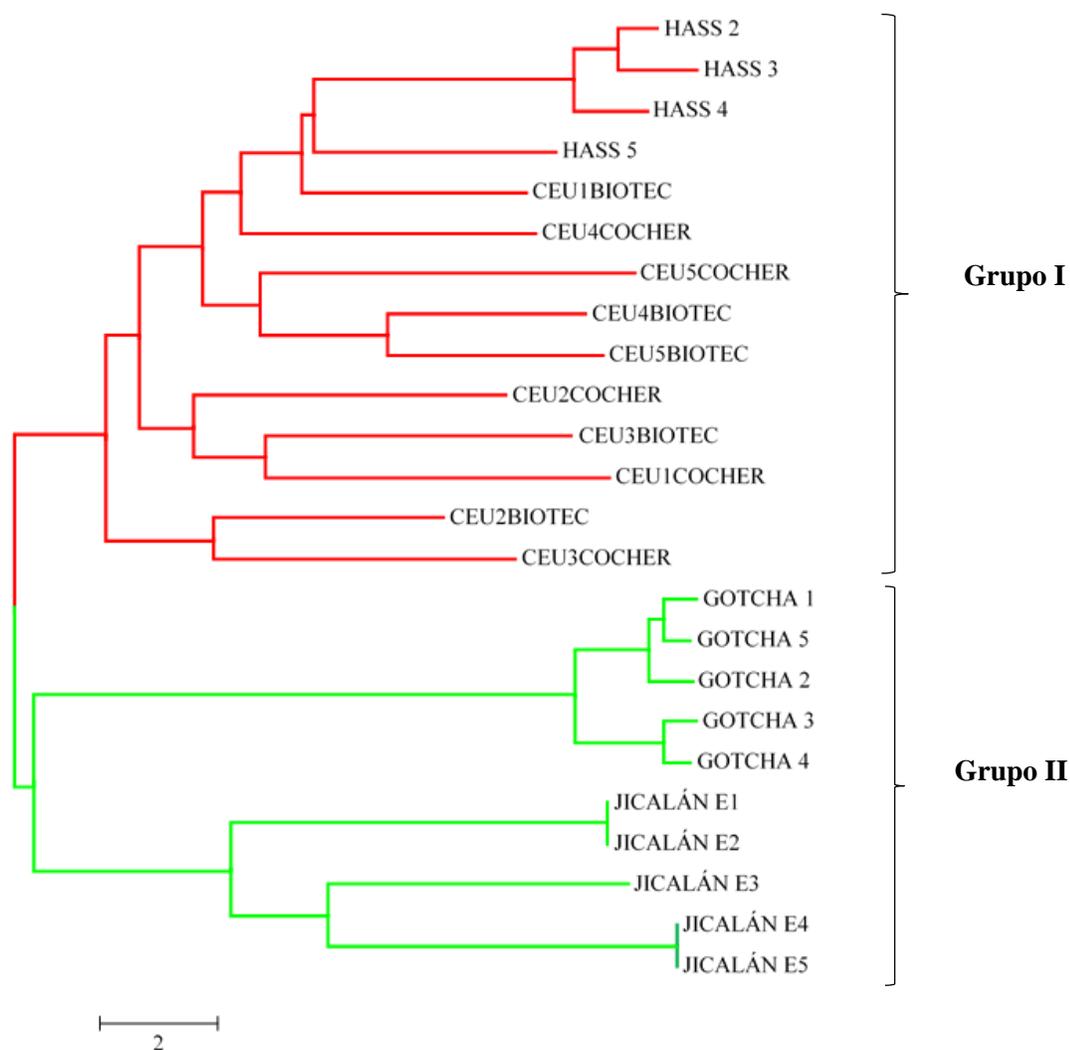


**Figura 2.** Dispersión gráfica de 5 poblaciones mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA). Pob 1: Gotcha, Pob 2: Hass, Pob 3: Ceú-Biotec, Pob 4: Ceú-Cocher y Pob 5: Jicalán.

#### **Análisis de Agrupamiento por el Método Neighbor-Joining**

Los valores de la distancia genética sirvieron de base para la construcción del dendrograma con el método Neighbor-Joining establecido sobre las poblaciones élite de aguacate (Figura 3).

En el dendrograma se observa claramente la separación de dos grupos principales. En primera instancia se agrupan las poblaciones Hass (población 2), Ceú-Biotec (población 3) y Ceú-Cocher pertenecientes al Grupo I y en el Grupo II las poblaciones 1 (Gotcha) y 5 (Jicalán), las cuales se separan del resto de las poblaciones y principalmente de la población 2 (Hass), que fue el material de referencia.



**Figura 3.** Dendrograma con el método Neighbor-Joining de cinco poblaciones élite de aguacate.

## DISCUSIÓN

Las cinco poblaciones (Gotcha, Hass, Ceu-Biotec, Ceu-Cocher y Jicalán) de aguacate objeto de estudio, surgen de una selección por más de 40 años del programa de mejoramiento genético del cultivo del aguacate del INIFAP, Campo Experimental Uruapan. Estas selecciones presentan características organolépticas propicias para la exportación (Tapia *et al.*, 2017), las cuales, podrían ser una alternativa al cultivar “Hass”.

En nuestro país, se tiene conocimiento de que la mayoría de las variedades comerciales de aguacate se derivan de hibridaciones interraciales, generadas a partir del intercambio de materiales entre las diferentes razas existentes de árboles nativos criollos y de cultivares seleccionados reproducidos de manera asexual. Generalmente se considera que las variaciones organolépticas presentes en este tipo de materiales, son el resultado de las interacciones con el ambiente (Mijares y López, 1998; Bergh, 1995). La identificación de las plantas realizada por caracterización fenotípica es un procedimiento lento y limitado, debido a que la expresión de los caracteres cuantitativos está sujeta a factores ambientales y fenológicos. Una alternativa a estos factores limitantes, puede ser el uso de marcadores moleculares, los cuales pueden ser útiles para la identificación, clasificación y aprovechamiento sustentable de la diversidad genética (Gutiérrez *et al.*, 2009).

### **Niveles de Diversidad Genética**

Existen diferentes investigaciones que mencionan el desarrollo o la evaluación de un gran número de marcadores moleculares, lo anterior, con la finalidad de evaluar la diversidad genética de plantas, incluyendo especies silvestres y plantas cultivadas (Bensch y Akesson, 2005; Tatikonda *et al.*, 2009). En este trabajo se utilizaron marcadores tipo SSR para evaluar la diversidad genética de cuatro selecciones de aguacate generados por el INIFAP, Campo Experimental Uruapan, en el estado de Michoacán, México, incluyendo el cultivar Hass como testigo. De los 49 pares de microsatélites inicialmente evaluados, se seleccionaron diez con base en su polimorfismo, reproducibilidad y número de alelos detectados. El empleo de los diez marcadores, permitió la identificación de un total de 90 alelos variando de 4 a 16 alelos, con un número promedio de alelos por locus de 9. Este valor promedio es superior al reportado por Borrone *et al.* (2007), quien empleó 70 marcadores microsatélites en 24 materiales de aguacate (*Persea americana* Mill).

Respecto al total de alelos (90) en los diez marcadores, el valor es superior a lo reportado por Galindo *et al.* (2011), quienes analizaron 44 muestras (7 poblaciones) de *P. americana* con cuatro marcadores microsatélites. Contrastamos de lo reportado por Galindo *et al.* (2011), quienes evaluaron mayor número de poblaciones (7) y 44 muestras *P. americana* en diferentes municipios del estado de Veracruz obteniendo un total de 43 alelos y un promedio de 10.75 alelos por locus.

Por su parte, Alcaraz y Hormaza (2007) trabajaron con 75 accesiones (224 muestras) de aguacate en las cuales se incluyeron ecotipos locales de España, así como de diferentes países. Las accesiones fueron caracterizadas con 16 microsatélites de aguacate diferentes a los utilizados en este estudio, detectando un total de 156 alelos diferentes, con un promedio de 9.75 alelos/locus. Aunque el valor promedio del presente estudio es cercano al reportado por Alcaraz y Hormaza (2007) (9 vs 9.75), el número total de alelos identificados es 0.75 mayor. Esto puede deberse a varios factores, primeramente, a la diversidad de muestras empleadas en el estudio de Alcaraz y Hormaza, mientras que las muestras del presente estudio son selección de un material común (“Hass”). Otro factor para considerar es el número de marcadores polimórficos empleados (10 vs 16). El uso de un mayor número de marcadores y el empleo de muestras genéticamente contrastantes conlleva a la detección de un mayor número de variantes alélicas.

### **Diversidad genética**

Respecto al polimorfismo obtenido, los 10 pares de marcadores (SSR) revelaron perfiles robustos de amplificación y fueron 100% polimórficos a través de todas las poblaciones, lo que permitió la diferenciación entre las cinco poblaciones evaluadas. A nivel de poblaciones, el polimorfismo osciló de 80% en dos poblaciones (Gotcha y Hass) y 90% para el resto (Ceu-Biotec, Ceu-Cocher y Jicalán). Estos resultados son similares a lo reportado por Galindo *et al.*, (2011), quienes en su estudio reportan dos poblaciones con un valor de polimorfismo del 75%, contrastando con Ashworth y Clegg (2003) quienes obtienen resultados de polimorfismo del 60.7% al analizar 35 cultivares de aguacate con marcadores microsatélites. Nuestros resultados coinciden ampliamente con lo obtenido por Mhameed *et al.* (1997), quienes reportaron mayor variabilidad para la raza fisiológica mexicana (83%) de aguacate.

La heterocigosidad esperada fue menor que la heterocigosidad observada con promedios de 0.574 y 0.704, respectivamente; sugiriendo una deficiencia de heterocigotos en todas las poblaciones. Sin embargo, estos valores deben tomarse con reserva, debido al número pequeño de muestras analizadas en cada población en el presente estudio y que la estimación de la diversidad no fue el objetivo principal de este estudio. Diferentes estudios realizados respecto a diversidad genética ( $H_e$ ) difieren de nuestros resultados obtenidos.

Tal es el caso de Guzmán *et al.* (2017) quienes reportan un promedio de 0.78 para la *He* con 28 marcadores, (siete de estos marcadores fueron empleados en esta investigación). No obstante, estos autores en su investigación analizaron mayor número de genotipos morfológicamente diferentes (318 accesiones con 28 marcadores microsátélites), por lo anterior es de esperarse que la *He* será mayor que en estudios donde los materiales estén relacionados, como en el presente trabajo. Por su parte Gross-German y Viruel (2003) reportan resultados de heterocigosidad esperada promedio de 0.831, contrastando con el resultado promedio obtenido (0.574). Como lo señalan diferentes investigaciones, la discrepancia obtenida en nuestros resultados se puede atribuir al bajo número de individuos analizados (24), al corto rango geográfico que existe entre las poblaciones evaluadas (todas en el Estado de Michoacán, México) (Gross-German y Viruel, 2003; Guzmán *et al.*, 2017).

#### **Análisis de alelos exclusivos**

Los resultados obtenidos que se aprecian en el cuadro 5, indican que para la identificación molecular de la población 1 (Gotcha), se pueden emplear los marcadores ESTAVTC\_03, LMAV\_15, ESTAVGA\_01, LMAV\_22, LMAV\_05, LMAV\_29, LMAV\_03 y LMAV\_27. Para identificar la población 5 (Jicalán) los marcadores ESTAVGA\_01, ESTAVTC\_13, LMAV\_22, LMAV\_24 y LMAV\_29 se pueden usar para su identificación. Para la identificación molecular del material de referencia usado en este estudio (población 2) se pueden utilizar los marcadores LMAV\_24, LMAV\_29, LMAV\_03 y LMAV\_27.

Los microsátélites evaluados demuestran que pueden ser una herramienta molecular para identificar nuestras diferentes poblaciones. Es relevante mencionar que la población 1 (Gotcha) es la que se puede identificar con el 80% de los marcadores (ESTAVTC\_03, LMAV\_15, ESTAVGA\_01, LMAV\_22, LMAV\_05, LMAV\_29, LMAV\_03 y LMAV\_27), y dos de estos marcadores amplifican exclusivamente en esta población (ESTAVTC\_03 y LMAV\_15). Por su parte, la población 5 (Jicalán) se puede identificar con el 50% de los marcadores (ESTAVGA\_01, ESTAVTC\_13, LMAV\_22, LMAV\_24 y LMAV\_29), seguida de la población 2

(Hass) que se puede identificar con el 40% de los marcadores moleculares analizados.

Derivado del análisis de alelos exclusivos, los resultados obtenidos sugieren la factibilidad de la utilización de marcadores moleculares para la caracterización de materiales de aguacate genéticamente cercanos. Se observó que algunos marcadores presentan mayor o menor facultad discriminativa en las diferentes selecciones de aguacate élite, e incluso para la variedad “Hass”, incluida en este trabajo de investigación como material de referencia.

Es importante señalar que existe limitada información respecto a la utilización de marcadores moleculares para la caracterización de materiales de aguacate. Esto puede explicarse que la mayoría de las investigaciones que emplean marcadores moleculares, se centran en la asignación de razas botánicas, estudios de diversidad genética, estudios evolutivos, etc. Adicionalmente, de acuerdo con la normativa vigente para el registro de materiales vegetales en nuestro país (UPOV), se emplean únicamente descriptores morfológicos y datos de pedigrí. Sin embargo, los datos moleculares pueden ser información adicional de soporte para la identificación y caracterización rápida y precisa de nuevos materiales, respecto a los ya existentes.

La estrategia del empleo de marcadores moleculares para la identificación de materiales nuevos desarrollados en aguacate implicaría la utilización de materiales de referencia para la evaluación y estandarización de marcadores microsatélites para este propósito. El empleo de marcadores moleculares para la identificación de materiales vegetales no es nuevo. Xiong *et al.* (2011) emplearon marcadores ISSR para la caracterización de la huella genética de diferentes variedades de mango (*Mangifera indica*), plátano (*Musa paradisiaca*) y longan (*Dimocarpus longan*); teniendo resultados positivos. En secuencia a este enfoque, los microsatélites que se evaluaron también podrían ser utilizados en futuros trabajos con fines de corroborar o identificar materiales de aguacate. Pese a que México es el principal país productor de aguacate en el mundo, las entidades regulatorias no han establecido normatividad respecto al control o verificación de la multiplicación de cultivares de aguacate. Las herramientas moleculares ofrecen este tipo de ventajas al ser posible la identificación de los materiales propagados con

respecto al material registrado (fidelidad genética). Sin embargo, dentro de un contexto general, el presente estudio es pequeño, por lo que es necesario verificar la reproducibilidad del empleo de marcadores moleculares en un mayor número de individuos, poblaciones y marcadores.

El análisis de agrupamiento por el método “Neighbor-Joining”, identificó dos grupos principales. Esta división también fue observada en los resultados del PCoA. En el Grupo I se ubican las poblaciones 2 (Hass), 3 (Ceu-Biotec) y 4 (Ceu-Cocher), mientras que las poblaciones 1 (Gotcha) y 5 (Jicalán) se encuentran en el Grupo II. Este último grupo resulta de interés, al estar completamente separado del Grupo I, donde se encuentra la variedad “Hass”. Estos resultados sugieren que las poblaciones 1 y 5 son materiales diferentes a “Hass” y que pueden ser susceptibles de registro para título de obtentor ante el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), autoridad competente en México para la asignación de título de obtentor.

Adicionalmente, también se puede observar que la dispersión de los individuos de cada población del Grupo II, en los cuadrantes del PCoA y en las subramas del dendrograma, es mínima en comparación con los materiales de las poblaciones de Hass, Ceu-Biotec y Ceu-Cocher (Grupo I). Este patrón de agrupamiento también sugiere la homogeneidad que existe en los individuos que conforman las poblaciones 1 y 5.

Para la caracterización molecular de la Población 1 (Gotcha) con respecto a la Población 2 (Hass) se pueden emplear los marcadores LMAV\_29, LAMV\_03 y LMAV\_27 (cuadro 5). Para la caracterización molecular de la Población 5 (Jicalán) con respecto a la Población 2 (Hass) se pueden emplear los marcadores LMAV\_24 (cuadro 5). Para la caracterización molecular de la Población 1 (Gotcha) con respecto a la Población 5 (Jicalán) se pueden emplear los marcadores LMAV\_29, LAMV\_22 y ESTAVGA\_01 (cuadro 5). Los marcadores ESTAVTC\_03 y LMAV\_15 amplificaron exclusivamente en materiales de la población 1 (Gotcha). Finalmente, el marcador LMAV\_29 presenta alelos de diferentes pesos moleculares que permiten la identificación de materiales Gotcha, Jicalán y Hass.

### **Perspectivas del trabajo**

Para asegurar la reproducibilidad de los resultados presentados, es necesario que en futuros trabajos se incluyan un mayor número de materiales de aguacate, así como se evalúen un mayor número de marcadores. La armonización de protocolos (reactivos, plataformas de detección, software para la determinación de los tamaños de los alelos) debe considerarse como una actividad primordial en el campo de la caracterización varietal. Este trabajo fue un primer acercamiento a la caracterización varietal de un pequeño número de muestras de genotipos de aguacate y el uso de marcadores microsatélites.

La monitorización subsecuente de los materiales caracterizados molecularmente y que han sido propagados de manera asexual (como en el caso del aguacate), permitirá mantener la integridad genética de los materiales en el campo.

### **Conclusiones**

Con la presente investigación se logra proponer diferentes marcadores moleculares microsatélites (SSR), para la caracterización de los materiales Gotcha y Jicalán empleando como referencia el cultivar “Hass”. Pese a que la forma tradicional de identificar diferentes variedades de aguacate se realiza por medio de características morfológicas (UPOV), se evidencia que es inminente permitir la inclusión de nuevos métodos para su caracterización y una alternativa puede ser a través de marcadores moleculares como los microsatélites.

## Literatura citada

- Alcaraz, M. L., y Hormaza, J. I. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*. 144:244-253. doi: 10.1111/j.2007.0018-0661.02019x.
- Ashworth, V. E., y Clegg, M. T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *The journal of Heredity*. 94:407-415. doi: 10.1093/jhered/esg076.
- Ashworth, V., Kobayashi, M., De la Cruz, M., and Clegg, M. (2004). Microsatellites markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae*. 101: 255-267.
- Bensch S., Akesson, M. (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*. 14:2899-2914.
- Bergh, B. O. (1995). Avocado. *In*: Smartt, J. and Simmonds, N. W. (Eds.). *Evolution of crop plants*. Longman Scientific and Technical. 240-245 pp.
- Borrone J.W, Schnell, R.J., Violi, H.A, Ploetz, R.C. (2007). Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes*. 7:439-444.
- Cadena I. J., M. de la C. Espíndola B., J. M. Mejía M., A. Flores E. y G. Solís A. (2016). Nuevas variedades para el desarrollo del campo mexicano. Vol. 1. Colegio de Postgraduados. México. 40 pp.
- Chen, H., Morrell, P. L., De la Cruz M., Clegg, M. T. (2008). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *The journal of Heredity*. 99:382-389.
- Chiveu C.J., Dangasuk O.G., Wachiira F.N. (2009). Quantitative variation among Kenyan populations of *Acacia senegal* (L.) Wild. for gum production, seed and growth traits. *New Forests*. 38:1-14. doi:10.1007/s11056-008-9128-1.

- Fielder, J., Buffer, G., Bangerth, F. (1998). Genetic relations of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphatica*. 101: 249-255.
- Furier, G., Cummings, M. P., and Clegg, M. T. (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity*. 81:183-188.
- Galindo-Tovar, M., & Milagro-Pérez, P., Alejandre-Rosas, J., Leyva-Ovalle, O., Landero-Torres, I., Lee-Espinosa, H., Murguía-González, J. (2011). Relaciones genéticas del aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios del centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13 (3), 339-346.
- 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.
- Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S. (2005). Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169:1631-1638.
- Gross-German, E., and Viruel, M. A. (2013). Molecular characterization of avocado germplasm with a new set of SSR and EST-SSR markers: genetic diversity, population structure, and identification of race-specific markers in a group of cultivated genotypes. *Tree Genetics Genomes*. 9:539-555. doi: 10.1007/s11295-012-0577-5.
- Gutiérrez-Díez, A.; Martínez, de la C. J.; García, Z. E. A.; Iracheta, D. L.; Ocampo, M. J. D. y Cerda, H. I. M. (2009). Estudio de la diversidad genética del aguacate en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32(1):9-18.
- Guzmán LF, Machida-Hirano R, Borrayo E, Cortés-Cruz M, Espíndola-Barquera MdC, Heredia García E. (2017). Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. *Frontiers in Plant Science* 8:243.
- Hedrick, P. W. (2004). Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management*. 197:3-19.

- Huang, Q. X., Wang, X. C., Kong, H., Guo, Y. L., and Guo, A. P. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*. 12:2727-2732. doi: 10.5897/AJB12.524.
- Litt M. and J.A. Luty. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle gene. *American Journal of Human Genetics*. 44:397-401.
- Mhameed S, Sharon D, Kaufman D, Lahav E, Hillel J, Degani C, Lavi U. (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 94:279-286.
- Mijares, O. P. y López, L. L. (1998). Variedades de aguacate y su producción en México. Departamento de Fitotecnia. Memoria 1998 de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de Investigaciones y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. Coatepec de Harinas. México. 88-99 pp.
- Peakall, R., and Smouse, P. E. (2012). GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—anupdate. *Bioinformatics*. 28:2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Rogel-Castellanos, I. (1999). Mejoramiento genético del aguacate en la fundación Salvador Sánchez Colín- CICTAMEX S.C. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 5:43-48.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- Sánchez, J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 7-18.
- Sanguinetti, C. J., E. D. Neto, and A. J. G Simpson. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17: 915-918.

- Schnell, R. J., Brown, J. S., Olano, C. T., Power, E. J., Krol, C. A., Kuhn, D. N., Montemayor J. C. (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *Journal American Society Horticultural Science*. 128:881-889.
- SIAP. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México.
- Smeets, A.J.M., Brunner, H.G., Ropers, H.H., Wieringa, B. (1989). Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to the study of myotonic dystrophy. *Human Genetics*. 83:245-251.
- Tapia-Vargas, Luis Mario, Larios-Guzmán, Antonio, Vidales-Fernández, Ignacio, Ramos-Aguilar, Ana Lourdes, Guillen-Andrade, Héctor y Ornelas-Paz, José de Jesús. (2017). Evaluación de genotipos de aguacate tipo “Hass” por la calidad y precocidad de fruto en Michoacán. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*. 3(8):8-14.
- Tatikonda, L., Wani, S., Kannan, S., Beerelli, N., Thakur, K.S., Hoisington, D., Prathibha, D., y Varshney, R. (2009). AFLP-based molecular characterization of an elite germoplasm collection of *Jatropha curcas* L, a biofuel plant. *Plant Science*. 176:(4)505-513.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 17:(16)6463-6471. doi:10.1093/nar/17.16.6463.
- Téliz, O.D. (2000). El Aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa, México, D. F. 219p.
- Vitale, I. (2017). *Molecular Biology*. University of Rome Tor Vergata, Rome Italy. Reference Module in Life Sciences pp:1-2.
- Weber, J. K. and P. E. May. (1989). Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 44:388-396.

Xiong FQ, Jiang J, Han ZQ, Zhong RC, He LQ, Zhuang WJ, Tang RH (2011). Molecular characterization of high plant species using PCR with primers designed from consensus branch point signal sequences. *Biochemical Genetics*. 49:352-363.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se comprueba que existe un complejo de fitopatógenos asociados a la enfermedad conocida como la tristeza del aguacatero: *Phytophthora vexans*, *Pythium* sp. *amazonianum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Mortierella elongata*.

Se obtienen tres primeros reportes: *Phytophthora vexans* y *Pythium* sp. *amazonianum* y *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 aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) son una alternativa botánica para el control de los oomicetos *P. cinnamomi* y *P. vexans*, comprobando en esta investigación su actividad fungicida. Es relevante mencionar que *P. cinnamomi* es un fitopatógeno que presenta mayor tolerancia, ya que *P. vexans* se logra inhibir a concentraciones inferiores.

Es importante mencionar que el aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) podría ser una alternativa novedosa para la purificación de *P. cinnamomi*, ya que algunos medios selectivos existentes permiten el crecimiento de otros oomicetos. No obstante, se necesita continuar con esta línea de investigación.

Con la presente investigación se logra proponer diferentes marcadores moleculares microsatélites (SSR), para la selección de los materiales Gotcha y Jicalán e incluso al monovarietal “Hass”. Pese a que la forma tradicional de identificar diferentes variedades de aguacate se realiza por medio de características morfológicas (UPOV) se evidencia que es inminente permitir la inclusión de nuevos métodos para su caracterización y una alternativa altamente viable es a través de marcadores moleculares como los microsatélites.

## LITERATURA CITADA

- Ahmet C, Saban K, Hamdullah K, Ercan K. (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics Ecology*. 33(3):245-256.
- Alcaraz, M., y Hormaza, J. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*. 144:244-253.
- Andrés, A. J. L. (2015). *Plantas Leñosas Ornamentales: Control de enfermedades producidas por hongos y cromistas*. Mundi-Prensa. Madrid. España. 405 p.
- Anguiano C.J., V.M. Coria A., J. A. Ruiz C., G. Chávez L., Y J.J. Alcantar R. (2003). Caracterización edáfica y climática del área productora de aguacate *Persea americana* cv. "Hass" en Michoacán México. V. Congreso Mundial del Aguacate. Málaga, España. p. 146-147.
- Ashworth, V. E., and Clegg, M. T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity*. 94:407-415. doi: 10.1093/jhered/esg076
- Ashworth, V., Kobayashi, M., De la Cruz, M., & Clegg, M. (2004). Microsatellites markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae*. 101:255-267.
- Bajpai, V. K. y Kang, S. C. (2010). Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87:327-336.
- Batish, D., Singh, H., Kohli, R., Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*. 256(12):2166-2174.
- Benites, N. P., Meléndez, E. y Stashenco, E. E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática*. 8(4):301-304.

- Besoian C.X y Piontelli, L.E. (1999). Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. Boletín Micológico. 14:41-47.
- Booth C. (1966). The Genus *Cylindrocarpon*. Kew Surrey England, Commonwealth Mycology Institute, pp 56.
- Bosquez M, Bautista E, Morales J. (2009). Essential oils: biopreservatives of High potential in the food industry. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. International Journal of Food Microbiology. 94(3):223-253.
- Celis, J., Duque, M. y Ramírez, C. (2012). Doctorados en ingeniería para promover la innovación: una propuesta para acrecentar la competitividad empresarial basada en la inserción de doctores en ingeniería en Colombia. Bogotá: ACOFI & UniAndes.
- 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
- Chen, H., Morrell, P. L., De la Cruz M., Clegg, M. T. (2008). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). The journal of Heredity. 99:382-389.
- Cooke D.E.L., A. Drenth, J.M. Duncan, G. Wagels and C.M. Brasier, (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology. 30:17-32.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. American Society for Microbiology. 12:564-565.
- 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. Pp 1-12.

- De Cock A.W.A.M., A.M. Lodhi, T.L. Rintoul, K. Bala, G.P. Robideau, Z. Gloria Abad, M.D. Coffey, S. Shahzad and C.A. Lévesque. (2015). *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia*. 34:25-39.
- Dixon, N. R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Journal of Young Investigators*. 411:843-847.
- FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Ferreira, M. E., and Grattapaglia, D. (1998). Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. (N. J. Fernández, A. Sánchez, & L. Rodríguez, Trads.) Brasilia: EMBRAPA-CERNAGEN.
- Fielder, J., Buffer, G., Bangerth, F. (1998). Genetic relations of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphitica*. 101:249-255.
- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*. 101(6):1232-1240.
- Furnier, G., Cummings, M. P., and Clegg, M. T. (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity*. 81:183-188.
- Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S. (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169:1631-1638
- Gogoi, R.; P. Baruah and S. C. Nath. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Lisea cubeba* Pers. *Journal Essential Oil Research*. 9:213-215.
- Gutiérrez-Díez, Adriana, Martínez-de la Cerda, Jesús, García-Zambrano, Eduardo A., Iracheta-Donjuan, Leobardo, Ocampo-Morales, Jesús D., & Cerda-Hurtado, Ivón M. (2009). Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32(1):09-18.

- Hajeer A, Worthington J, John S (eds.) (2000). SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. Biotechniques: Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester, UK.
- 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.
- Hedrick, P. W. (2004). Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management*. 197:3-19.
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10(10):813-829.
- Karmen V, Bojana B, Margareta V, Pohleven F. (2003). Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int Biodeter and Biodegr*. 51(1):51-59.
- Keeler, R.F. and Tu, A.T. (1991). eds. *Toxicology of Plant and Fungal Compounds*. (Handbook of Natural Toxins Vol. 6) Marcel Dekker, Inc. NY Pp. 665.
- Kliejunas, J. T. & Ko, W. H. (1975). The occurrence of *Pythium vexans* in Hawaii and its relation of Ohia decline. *Plant Disease Reporter*. 59(5):392-395.
- Lavi, U.; Akkaya, M.; Bhagwat, A.; Lahav, E. y Cregan, P. B. (1994). Methodology of generation and characteristics of single sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* Mill.). *Euphytica*. 80:171-177.
- Lévesque C.A. and A.W.A.M. De Cock. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*. 108:1363-1383.
- Litt M. y J.A. Luty. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle gene. *American Journal of Human Genetics*. 44:397-401.

- 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. *Canadian Journal of Botany*. 79(3):334-340. doi:10.1139/cjb-79-3-334
- Oxenham SK. (2003). Classification of an *Ocimum basilicum* germplasm collection and examination of the antifungal effects of the essential oil of basil [Tesis doctoral]. Glasgow: University of Glasgow.
- Park, M.J.; Gwaka, K.S.; Yang, K.W.; Kim, E.B.; Jeung, J.W.; Chang, I.G.; Choi, A. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. *Fitoterapia*. 80:290-296.
- Ramírez, I. M.; Fuentes, J. L.; Rodríguez, N. N.; Coto, O.; Cueto, J.; Becker, D. y Rhode, W. (2005). Diversity analysis of Cuban avocado varieties based on agromorphological traits and DNA polymorphisms. *Journal of Genet and Breeding*. 59:241-252.
- Renner, S. S. (1999). Circumscription and phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological data. *American Journal of Botany*, 86(9):1301-1315. doi:10.2307/2656778
- Renner, S.S (2004). Variation in diversity among Laurales, Early Cretaceous to present. *Biologiske Skrifter Kongelige Danske*. 55:441-458
- Rentaría-Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En: L.E. Eguiarte, et al., editores, *Ecología molecular*. SEMARNAT, MEX. p. 541-566.
- Rodríguez-Padrón, C., Siverio, F., Pérez-Sierra, A., y Rodríguez, A. (2018). Aislamiento y patogenicidad de especies de *Phytophthora* y *Phytophthora vexans* recuperadas de huertos de aguacates en las Islas Canarias, incluyendo *Phytophthora niederhauserii* como un nuevo patógeno del aguacate. *Phytopathologia Mediterranea*. 57(1):89-106. doi: 10.14601 / Phytopathol\_Mediterr-22022

- Rogel-Castellanos, I. (1999). Mejoramiento genético del aguacate en la fundación Salvador Sánchez Colín- CICTAMEX S.C. Revista Chapingo Serie Horticultura. 5:43-48.
- Sánchez, J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. Revista Chapingo Serie Horticultura. 7-18.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. Fitoterapia. 77:279-285.
- SIAP. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México. <https://www.siap.gob.mx>
- Smeets, A.J.M., Brunner, H.G., Ropers, H.H., Wieringa, B. (1989). Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to the study of myotonic dystrophy. Human Genetics. 83:245-251.
- Stashenko, E. (2000). Estudio prospectivo de aceites esenciales colombianos de interés industrial. Universidad Industrial de Santander. 18(1):645-673.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. y Cliver, D. (2010). Antimicrobial her and spice compounds in food. Food Control. 21(19):1199-1218.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research. 17(16):6463-6471. doi:10.1093/nar/17.16.6463
- Téliz, O.D. (2000). El Aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa, México, D. F. 219 p.
- Van der Plaats-Niterink J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. 21, 123 p.
- 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-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. (2012). First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*). Italy Journal of Phytopathology. 160(3):156-159.
- Weber, J. K. and P. E. May. (1989). Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal Human Genetics. 44:388-396
- Wilson, C. L., Ghaouth, A., Wisniewski M. E. and Wisniewski, M. E. (1999). Prospectin in mature's storehouse for Biopesticides. Revista Mexicana de Fitopatología. 17:49-53.
- Wilson, C. L.; J. M. Solar, A. El Ghaouth and M. E. Wisniewski. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease. 81:204-210.
- 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 radicola* in Israel. Proceedings VI World Avocado Congress 2007. Viña Del Mar, Chile. 12-16 nov. 2007.