

**VARIABILIDAD GENETICA Y PATOGENICA DE *Phytophthora*
cinnamomi RANDES EN MICHOACÁN MEXICO**

YISA MARIA OCHOA FUENTES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Marzo de 2006



**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

**VARIABILIDAD GENETICA Y PATOGENICA DE *Phytophthora cinnamomi*
Rands EN MICHOACÁN MEXICO
POR**

YISA MARIA OCHOA FUENTES

TESIS

**ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITE PARTICULAR DE
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

COMITE PARTICULAR:

ASESOR PRINCIPAL:

Dr. Alberto Flores Olivas

ASESOR :

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

ASESOR:

Dr. Jerónimo Landeros Flores

ASESOR:

Dr. Víctor Olalde Portugal

ASESOR

Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez

**Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Postgrado**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México; Marzo del 2006

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Silverio Ochoa Macias
Ma. del Carmen Fuentes Recio

Que me han dado la vida y todo el apoyo para lograr la culminación de mis estudios.

A MIS HERMANOS:

Gualberto S. Ochoa Fuentes
Laura Alicia Ochoa Fuentes
Mary Carmen Ochoa Fuentes
Wendy Patricia Ochoa Fuentes

A MIS SOBRINOS:

Aldo Aldebaran Ochoa Fuentes
Guadalupe Montserrat Ochoa Fuentes

Que con su cariño, me alentaron toda la carrera a dar lo mejor de mí.

A MI ESPOSO:

Ernesto Cerna Chavez

Gracias Ernesto, por haberme enseñado lo que es el amor a través de comprensión y respeto.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

Que me brindaron su apoyo moral y grata compañía, en los momentos que me encontraba lejos de mi hogar.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por su apreciable amistad y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Víctor Olalde Portugal**, por su amable disposición para participar asesorando la presente investigación.

Al **Dr. Jerónimo Landeros Flores**, por su apreciable amistad y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo**, por su participación en la asesoría de la presente investigación.

Al **Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez**, por su disposición y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Gustavo Frías Treviño**, gracias por su apreciable amistad y por su confianza.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por su apoyo durante mi estancia en el postgrado.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por cobijarme en su seno durante la realización de mis estudios de postgrado.

Al **Personal del Departamento de Parasitología**, por brindar el apoyo necesario para concluir con el grado académico.

ABSTRACT

**Genetic and Pathogenic Variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in
Michoacan, Mexico**

By

Yisa Maria Ochoa Fuentes

DOCTOR'S DEGREE IN SCIENCES

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MARCH 2006

Dr. Alberto Flores Olivas - Advisor-

Key Words: Avocado Tree's Tristeza, compatibility groups, AFLP, RAPD's, incidence, severity.

The research work was conducted at "Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro" in Saltillo, jointly with the Research Center of Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), Irapuato and the Center of Biochemical Sciences of "Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo" from March 2003 to July 2005.

The purpose of this work was to determine the sexual compatibility groups, as well as the genetic and pathogenic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands' isolates, obtained from Michoacan, an avocado producing region in Mexico. The presence of the sexual compatibility groups A1 and A2 of *P. cinnamomi*, was determined in 25 isolates obtained from 5 different localities of Michoacan state, Mexico. The isolates were challenged in V8 juice- clarified agar culture medium. The oospores production was determined. A1 sexual compatibility group was identified using PCR and the initiator OPS-13, which amplifies a band of 2.7 kb. Six isolates were identified within sexual compatibility group A 1, while 19 isolates belonged to A2. However in A1, only one isolate produced oospores when being challenged with the rest of the isolates. After the sexual compatibility groups had been determined, a second sampling process was conducted on 42 isolates. Their genetic variability was determined using Random Amplified Polymorphisms of DNA (RAPDs) and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP). 21 oligonucleotides of 10 bases were used in RAPDs, showing a total of 23 bands. In AFLP, the amplifications showed 296 bands. The trial in both cases used the genetic dissimilarity matrix by means of the multiple coupling method and the non-weighted average methods, to obtain the dendrogram. The isolates were classified in two main groups that were associated with the geographical location from which they were obtained. The analysis and determination of the confidence levels demonstrate that these geographical groupings are extremely strong. Eight genetic variations of *P. cinnamomi* were identified from the inoculums obtained from the strains that were actively growing in the V-8- clarified agar culture medium. Nine avocado plants were inoculated with each genetic variation and the check plants were treated with sterile water. Incidence and severity of the disease were determined, using

Zentmyer (1984) proposed scale in the severity test. A multi-variable analysis was applied to the data using SAS (Statistical Analysis System). Mean trials were conducted using Tukey's mean at 0.05. *P. Cinnamomi*'s incidence in avocado plants presented a significant difference when strain C4 was compared against the check test. The severity analysis revealed that strains C6 , C7 and C8 from Uruapan and Peribam died at the end of the experiment, while strains C3, C4 and C5 showed severe damage only and strains C1 and C2 from Salvador Escalante suffered moderate damage. Therefore, the study demonstrated the existence of genetic and pathogenic variability in strains of *Phytophthora cinnamomi* obtained from places located at 60 kilometers of distance.

COMPENDIO

Variabilidad Genética y Patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en

Michoacán México

POR

Yisa Maria Ochoa Fuentes

DOCTORADO

PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MARZO 2006

Dr. Alberto Flores Olivas - Asesor-

Palabras clave: Tristeza del aguacatero, grupos de compatibilidad, AFLP, RAPDs, incidencia, severidad.

El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN) Unidad Irapuato y el Centro de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el periodo de Marzo del año 2003 a Julio del año 2005.

Teniendo como objetivo determinar los grupos de compatibilidad sexual, variabilidad genética, y patogénica de aislados de *Phytophthora cinnamomi* Rands obtenidos de la región productora de aguacate de Michoacán, México. Se determinó la presencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *P. cinnamomi*, en 25 aislados obtenidos de cinco localidades del estado de Michoacán, México. Los aislados se confrontaron en medio jugo V8-agar clarificado, se determinó la producción de oosporas. Se identificó el grupo de compatibilidad sexual A1 mediante PCR, usando el iniciador OPS-13, el cuál amplifica una banda de 2.7 kb. Se identificaron seis aislados como grupo de compatibilidad sexual A1 y 19 aislados A2; sin embargo de los aislados A1, solo uno produjo oosporas al confrontarse con el resto de los aislamientos. Una vez determinados los grupos de compatibilidad sexual, se realizó un segundo muestreo obteniendo 42 aislados, a los cuales se les determinó variabilidad genética utilizando polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs) y polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). En RAPDs, se utilizaron 21 oligonucleótidos de 10 bases, los cuales mostraron un total de 23 bandas. Para AFLP, las amplificaciones mostraron 296 bandas; el análisis en ambos casos consistió en la obtención de la matriz de disimilaridades genéticas utilizando el coeficiente de apareamiento múltiple y el método del promedio no ponderado, para la obtención del dendograma. Los aislados se clasificaron dentro de dos grupos principales; asociados con la localización geográfica de la cual fueron obtenidos los aislados. El análisis y la determinación de los niveles de confianza muestran que estas agrupaciones geográficas son extremadamente fuertes.

Se seleccionaron ocho variantes genéticas de *P. cinnamomi*, obteniendo el inóculo a partir de cepas en crecimiento activo en medio de cultivo V-8 agar clarificado. Inoculando nueve plantas de aguacate, con cada una de las variantes genéticas y las plantas testigo fueron tratadas con agua destilada estéril. Se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad, esta última en base a la escala propuesta por Zentmyer (1984). Los datos fueron analizados por medio del análisis multivariado utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System). Las pruebas de medias fueron realizadas por Tukey al 0.05. La incidencia de *P. cinnamomi* en las plantas de aguacate, presentó diferencia significativa en la cepa C4 con respecto al Testigo. Referente a severidad, de acuerdo al análisis se obtuvo que las cepas C6, C7 y C8 provenientes de Uruapan y Peribán murieron al final del experimento; mientras que las cepas C3, C4 y C5 presentaron solamente daños severos y las cepas C1 y C2 de Salvador Escalante ambas presentaron un daño moderado; por lo que este estudio demostró la variabilidad genética y patogénica que presentan cepas de *Phytophthora cinnamomi* obtenidas en poblaciones a 60 kilómetros de distancia.

INDICE DE CONTENIDO

Pagina

INDICE DE CONTENIDO	xi
INTRODUCCION	1
Objetivos.....	3
REVISION DE LITERATURA	4
Tristeza del Aguacate <i>Phytophthora cinnamomi</i>	
Generalidades	4
Distribución	5
Importancia económica.....	5
Ubicación taxonómica	6
Características morfológicas	6
Sintomatología.....	8
Condiciones que predisponen la enfermedad	
Humedad del suelo.....	8
Temperatura.....	9
Aireación	9
Ciclo de la enfermedad y epidemiología.....	10
Variabilidad de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	
Importancia.....	11
Tipos y fuentes de variación.....	12
Estado Sexual de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	
Reproducción sexual.....	13
Descubrimiento de grupos de compatibilidad.....	15

Reportes del estado sexual.....	16
Efectos de la reproducción sexual de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	17
ARTICULO CIENTIFICO I	
COMPATIBILIDAD SEXUAL DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands EN MICHOACÁN MEXICO.....	20
ARTICULO CIENTÍFICO II	
VARIABILIDAD GENETICA DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands EN MICHOACÁN MEXICO (RAPDs).....	31
ARTICULO CIENTÍFICO III	
GENETIC VARIABILITY OF <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands IN MICHOACAN MEXICO.....	49
ARTICULO CIENTÍFICO IV	
VARIABILIDAD PATOGENICA DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands EN MICHOACÁN MEXICO.....	67
CONCLUSIONES GENERALES	80
LITERATURA CITADA	82

INTRODUCCION

Actualmente México es el principal productor y consumidor de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el mundo, con una producción de 1,040,390 ton en una superficie de 102,467 ha (FAOSTAT, 2005). Los estados con mayor producción, SON Michoacán, Nayarit, Morelos y el Estado de México, los cuales en 2003 contribuyeron con el 82.8 por ciento de la producción nacional. El principal estado productor, es Michoacán, con una superficie de 86,145 ha, lo que representa el 79 por ciento de la producción total del país (SAGARPA-SIAT, 2004). De las áreas productoras del estado de Michoacán sobresalen por su superficie plantada y producción los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, San Juan Nuevo y Salvador Escalante; los que representan el 64 por ciento de la superficie total plantada en el estado de Michoacán; es decir 55,322 ha con una producción 510,281 ton. Entre los problemas del frutal destacan por su importancia la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero provocada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, la cual es considerada como el principal problema de este cultivo a nivel mundial (Zentmyer y Ohr, 1978). Este fitopatógeno presenta gran capacidad destructiva y un amplio rango de hospederos, atacando más de mil especies de plantas (Zentmyer, 1980). *P. cinnamomi* posee dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 (Erwin *et al.*, 1996; Alexopoulos, 1996); siendo el estado sexual una fuente potencial de variabilidad intraespecífica en especies heterotálicas (Boccas *et al.*, 1976). A nivel mundial provoca pérdidas económicas en la mayoría de los países productores de aguacate. En California, se ha estimado que puede afectar entre 60 y el 75 por ciento

de las huertas causando una pérdida anual de aproximadamente 44 millones de dólares; ataca a todas las variedades de aguacate dañando las raíces lo que puede dar lugar a la muerte del árbol. (Coffey, 1992). Aunque la enfermedad se ha estudiado por más de 60 años, las estrategias de control no han sido las adecuadas (Menge, 2002). En México se ha detectado la presencia de la tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras; destacando por la severidad de los daños, la región de Atlixco, Puebla donde ha causado la muerte de miles de árboles; actualmente en la región productora de Michoacán, México, se reporta alrededor de 4,000 ha afectadas por la enfermedad, la cual tiende a incrementarse (Téliz, 2000). Diversos factores han propiciado que la pudrición de raíz del aguacate ocasionada por *P. cinnamomi* en México alcance niveles epidémicos. Por una parte, las características propias de la biología del alga que le confiere una gran capacidad infectiva y la propia actividad de explotación del cultivo que no siempre utiliza técnicas apropiadas de manejo para la disminución del riesgo de contaminación (Ochoa, 2000). La enfermedad aparece cuando se tiene humedad excesiva en el suelo y la presencia del patógeno que la produce. El patógeno entra en actividad cuando existe un drenaje deficiente, o bien, en suelos relativamente bien drenados en los que se aplican riegos excesivos, afectando a las plantas en vivero como a los árboles establecidos de diferente edad, (Brom, 1970). Actualmente la diversidad genética y patogénica de *P. cinnamomi* en Michoacán, México no ha sido determinada, por ello se requiere realizar estudios que determinen la variabilidad genética y patogénica de *Phytophthora cinnamomi*, con la finalidad de planear estrategias eficientes de control, así como para el desarrollo de programas de mejoramiento genético de porta injertos con atributos de resistencia a esta enfermedad. Por lo anterior en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivos

- Determinar la presencia de los grupos de compatibilidad sexual de *P. cinnamomi* en la región productora de aguacate de Michoacán México.
- Determinar la variabilidad genética de *P. cinnamomi* en la región productora de aguacate de Michoacán México.
- Determinar la variabilidad patogénica de las variantes genéticas detectadas de *P. cinnamomi* aisladas de las principales áreas productoras de aguacate de Michoacán.

REVISIÓN DE LITERATURA

Tristeza del Aguacatero *Phytophthora cinnamomi* Rands

Generalidades

P. cinnamomi fue descrito por Rands en 1922 en árboles de canela (*Cinnamomum burmanii*) en Sumatra, y posteriormente se ha reportado en 67 países reconociéndose como uno de los patógenos de plantas más cosmopolitas y destructivos, siendo esta especie la de mayor rango de hospederos y la de más distribución en el mundo (Erwin *et al.*, 1996).

En 1927 se observó por primera vez en Puerto Rico atacando aguacate, en 1940 se informa de su existencia en Sudáfrica, para 1942 fue aislado de aguacate en California, en 1951 se encontró en Honduras y en México. El origen de este patógeno ha sido controversial, ya que se ha considerado nativo de Sudamérica, Sudeste asiático y Sudeste australiano (Zentmyer, 1976); sin embargo, Gallegos (1983) supone que fue llevado a Australia y de ahí paso a Centroamérica, Hawai, México, Guatemala y California con las primeras introducciones de 1871. La pudrición de raicillas ocasionada por *P. cinnamomi* ha sido encontrada en casi toda área donde se cultiva esta especie frutal (Zentmyer *et al.*, 1994).

Distribución

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

Importancia económica

P. cinnamomi es un parásito facultativo y cosmopolita, es decir, es un habitante natural de la mayoría de los suelos de todo el mundo; se alimenta de restos de cosecha en descomposición, pero bajo condiciones favorable puede atacar raíces vivas y el cuello de mas de 600 plantas de interés económico para el hombre incluyendo piña, durazno, manzano, mango, macadamia, papaya, azaleas, pino, ciprés, eucalipto y encino, entre otras (Zentmyer, 1980).

Ubicación taxonómica de *P. cinnamomi* (Rands) (Alexouopoulos, *et al.*, 1996)

Reino: Stramenopila

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *cinnamomi*

Características Morfológicas

P. cinnamomi presenta micelio cenocítico, muy toruloso, con vesículas globosas a piriformes, las hifas tienen un diámetro variable de 3.5 a 21.0 μm , la colonia micelial presenta aspecto de camelia, debido al crecimiento deprimido y algodonoso del micelio, que tiene lugar a intervalos regulares; esporangióforos simples o ramificados en simpodio, a veces por proliferación esporangial, generalmente los esporangios no se producen en medios sólidos; sin embargo, en extracto de suelo se forman en abundancia, los cuales presentan forma ovoide, piriforme, elipsoidal a elipsoidal – elongado, con un ápice compacto, no sobresaliente y sin papila, se estrechan o redondean hacia la base y no son caducos (Erwin y Ribeiro, 1996); miden en promedio 75 μm de largo y 40 μm de ancho, aunque esto último es variable (Ho y Zentmyer, 1977). Posee zoosporas móviles con una marcada habilidad para enquistar en pocos minutos (Bartnicki y Wang,

1983). Las zoosporas, naturalmente infectivas, proveen un potencial de enfermedad grande y explosivo (Zentmyer, 1983). Las clamidosporas son estructuras de sobrevivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados, con un diámetro promedio de 41 μm (Erwin y Ribeiro, 1996), son globosas y de paredes delgadas (Zentmyer, 1980). Pueden ser terminales o intercalares en el micelio y a menudo aparecen como racimos de uvas de 3-10 clamidosporas (Erwin y Ribeiro, 1996). Estas estructuras son liberadas en el suelo donde persisten por períodos de hasta 13 años, germinando con varios tubos germinativos (Coffey, 1991). *P. cinnamomi* es una especie heterotálica, las oosporas se forman cuando los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 se aparean (Haasís y Nelson, 1963; Galindo y Zentmyer, 1964; Zentmyer *et al.*, 1979). El tipo A2 está más ampliamente distribuido a nivel mundial que el tipo A1 (Zentmyer, 1980). Las oosporas se pueden formar sin fertilización en cultivos del tipo A2 cuando es incubado en extractos de raíces (Zentmyer, 1952; Zaki *et al.*, 1983), en tejidos de raíces de árboles de aguacate enfermos (Mircetich y Zentmyer, 1966) o en granos de avena (Royle y Hickman, 1964). La producción de oosporas puede ser estimulada por el hongo *Trichoderma viridae* (Reeves y Jackson, 1972). Los anteridios son generalmente anfígenos y promedian un tamaño de 19 x 17 μm . Los oogonios son redondos y a menudo con una base estrecha son de pared lisa y hialina, con un diámetro promedio 40 μm (Royle y Hickman, 1964). Durante la fertilización se forma un tubo desde el anteridio a el oogonio (Ho y Zentmyer, 1977). Las oosporas son pleróticas redondas, hialinas a amarillas-cafesosas y su diámetro promedio depende del medio de cultivo, aunque varía en un rango de 20-40 μm (Erwin y Ribeiro, 1996).

Sintomatología

Los síntomas externos son: decaimiento progresivo del árbol, las hojas, son pequeñas, pálidas o amarillentas y a menudo parecen marchitas. Ocurre una defoliación progresiva en árboles, con carencia de nuevos crecimientos y disminución en la producción de frutos, los cuales son pequeños y de mala calidad; las ramas se secan y se defolian en la copa. Las raíces primarias y secundarias se vuelven quebradizas con coloraciones rojizas-castañas, por lo que la destrucción lenta del sistema radicular lleva finalmente a la muerte del árbol. (Rodríguez, 1982; Gallegos, 1983; Brom, 1970; Coffey, 1991; Ochoa, 2000).

Condiciones Abióticas que Predisponen la Enfermedad

Humedad del suelo

La humedad del suelo es el principal factor ambiental que influye en el desarrollo de la pudrición de raíces causada por *P. cinnamomi*. La relación entre exceso de humedad del suelo y el desarrollo de la enfermedad ha sido reconocida hace años. La alta humedad del suelo aumenta la infección, principalmente debido al incremento de la formación de esporangios y las condiciones apropiadas para la liberación de zoosporas (Zentmyer *et al.*, 1994). Kuan y Erwin (1980) estudiaron el efecto de la saturación del suelo sobre la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora* en alfalfa, y concluyeron que ésta se debe al incremento del daño a las raíces y consecuente exudación de nutrientes, lo que incrementa la atracción quimiotáctica de zoosporas a la zona de las raíces.

Temperatura

P. cinnamomi presenta un reducido rango de temperatura en el cual puede formar esporangios, lo que limita su actividad patogénica a ciertas estaciones del año (Zentmyer, 1980). La liberación de zoosporas del esporangio se presenta a temperaturas de 20-25 °C (Gisi *et al.*, 1980). La infección por *P. cinnamomi* es óptima a temperaturas de 21-30 °C, el desarrollo del micelio de *P. cinnamomi* en agar y la formación de clamidosporas en suelo naturalmente infestado son inactivadas a temperaturas a bajo de 0 °C. La velocidad de inactivación está directamente relacionada al número de grados bajo cero, la inactivación del micelio ocurre en 2, 6 o 16 días a -6.7, -3.8 y -1.4 °C, respectivamente (Benson, 1982).

El patógeno puede sobrevivir en el suelo como oosporas, cuyas temperaturas de formación son más bajas que las de crecimiento o formación de otros tipos de esporas y oscilan entre 15-21°C en cruzamientos y 18-24 °C en extractos de raíces. Los gametangios son formados entre 9-33 °C pero las oosporas sólo entre 15-30 °C. La temperatura no afecta el tamaño de las esporas sexuales pero sí afecta la velocidad de desarrollo y el número de oosporas producidas (Zentmyer, 1980).

Aireación

La aireación, en conjunto con la humedad, son importantes en la formación de esporangios (Zentmyer, 1980). Por su parte Mitchell y Zentmyer (1971) reportaron que la producción de esporangios de varias especies de *Phytophthora* es inhibida por bajas concentraciones de oxígeno (O₂) y también por altas concentraciones de anhídrido

carbónico (CO₂). Sin embargo, *P. cinnamomi* no es favorecida por ninguno de los tratamientos, debido a que necesita un medio líquido para la formación de esporangios; sin embargo, el rango de tolerancia de *P. cinnamomi* a niveles de O₂ y CO₂, es amplio, y algunos datos indican que es un patógeno menos aeróbico que los demás patógenos comunes del suelo como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Phytophthora cactorum* (Durbin, 1959).

Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Las plantas de aguacate pueden ser afectadas por la pudrición de raíces si el suelo contiene a *P. cinnamomi*, asociada con exceso de humedad. El patógeno comúnmente llega a ser activo como resultado de pobre drenaje del suelo, sobrerriego o lluvia excesiva (Zentmyer *et al.*, 1994).

El patógeno puede ser diseminado de varias maneras, como lo son, movimiento del suelo en vivero, agua, la que puede llevar zoosporas y otros propágulos e infectar trozos de raíces, y ocasionalmente por semillas provenientes de frutos infectados (Zentmyer *et al.*, 1994). La mayor propagación de *P. cinnamomi* ocurre por la actividad del hombre; por ejemplo, por el acceso vehicular que lleva la enfermedad a zonas no infestadas, otras vías de diseminación consiste en el transporte de cualquier tipo de material vegetal, equipos de cultivo, zapatos, botas o animales que lleven suelo y la comercialización de plantas enfermas (Zentmyer, 1980; Shea 1975).

La humedad del suelo es un factor clave en el ciclo de la enfermedad, el alto contenido de humedad del suelo favorece la liberación de zoosporas desde los esporangios, el agua facilita el movimiento de las zoosporas hacia la superficie de las raicillas absorbentes. Así mismo, la liberación de exudados radiculares crea un gradiente quimiotáxico capaz de atraer un gran número de zoosporas (Coffey, 1991). La atracción primaria es aparentemente por aminoácidos exudados de las raíces de esa área, siguiendo la atracción y enquistamiento de las zoosporas sobre raíces de aguacate susceptibles y la invasión toma lugar a través de penetración inter e intracelular, las lesiones aparece en 24 h y el micelio es encontrado a lo largo de las raicillas después de 72 h (Zentmyer *et al.*, 1994). Así, rápidamente viene la infección y muerte de raicillas, los esporangios y clamidosporas pueden ser formados en pocos días en el hospedero, perpetuándose el ciclo de la enfermedad (Coffey, 1991). La pudrición de raíces puede atacar árboles de todas las edades incluyendo árboles jóvenes de vivero sobre portainjertos tolerantes, la enfermedad es más grave en suelos pesados con drenaje deficiente por un subsuelo de arcilla o roca, los síntomas más evidentes en aguacate son el decaimiento o muerte del follaje (Coffey, 1991).

Variabilidad de *Phytophthora cinnamomi*

Importancia

Variación es la propiedad o capacidad que tienen los organismos para cambiar sus características de generación en generación (Agrios, 1988). Al respecto McDonald (1989) señala que la cantidad de variación en las poblaciones afecta su habilidad para adaptarse a condiciones ambientales fluctuantes; en general, poblaciones altamente

variables son más hábiles para adaptarse a condiciones cambiantes que aquellas con poca variación.

Tipos y fuentes de variación

Brasier (1992) menciona que aislados de especies de *Phytophthora* manifiestan a menudo una amplia variación en muchos caracteres; cita también que el sistema genético en este género presenta una amplia gama de mecanismos para la expresión de variación.

Agrios (1988) señala que en la mayoría de los fitopatógenos la variación en la progenie es debida a la segregación y recombinación de genes ocasionada por la reproducción sexual.

Robertson (1991) puntualiza que se han realizado múltiples esfuerzos para entender las bases de la variabilidad en *Phytophthora infestans* y el respaldo genético de tal variación. El mismo autor señala que, por si sola, la reproducción sexual normal no explica por si misma la gran variabilidad de este patógeno.

Se sugiere que en *P. infestans* se presenta una forma desconocida de recombinación sin sexo, la que es responsable de la abundante variación en fenotipos encontrados dentro de las colecciones de *P. infestans* (A1), fuera de México (Shaw, 1991).

Los mecanismos diferentes a la reproducción sexual, que se mencionan como responsable de la variación en *P. infestans*; son la mutación (Gallegly y Eichenmuller, 1959, Mills y Peterson, 1952, Howatt y Grainger, 1955, y Van der Plank, 1963), así como la recombinación somática (Leach y Richl, 1969 y Malcolmson, 1970).

Dentro de las manifestaciones de variación en *P. cinnamomi* así como otras especies de *Phytophthora*, se reportan las siguientes: en requerimientos nutricionales (Cantino y Turian, 1959 y Holh, 1991), morfología colonial (Zentmyer y Guillmet ,1981; Tommerup *et al.*, 2000), en comportamiento sexual (Galindo y Zentmyer, 1964), germinación de esporangios (Ayers y Zentmyer, 1971), morfología del anteridio (Huberli *et al.*, 1997), isoenzimas (Mosa, *et al.*, 1993 y Tooley *et al.*, 1985), resistencia a productos químicos (Ritch, 1991), en contenido de DNA del núcleo (Spielman *et al.*, 1990), en patogenicidad (Zentmyer y Guillmet ,1981; Huberli *et al.*, 2001; Romero y Erwin, 1969), y respuesta a antibióticos (Zentmyer y Guillmet, 1981) entre otros.

Estado Sexual de *P. cinnamomi*

Reproducción sexual

La etapa sexual de *P. cinnamomi* puede ser producida por cruces interespecíficos e intraespecíficos, normalmente de especies heterotálicas, en otras palabras, el tipo de apareamiento A1 y A2, y la iniciación de la sexualidad se puede dar por varios estímulos (Zentmyer, 1980), como lo son los que se explican enseguida.

Sustancias químicas en las raíces de los árboles de aguacate que inicia la producción de un gran número de oosporas en el grupo de compatibilidad A2 de *P. cinnamomi*; Sin embargo, esta sustancia no afecta al grupo de compatibilidad sexual A1 (Zentmyer, 1979). Zaki (1982) menciona que la raíz de aguacate contiene ácido oleico, y este inicia la producción de oosporas en el grupo A2 pero no en el A1 de *P. cinnamomi*, siendo el ácido oleico un factor activo.

La producción de oosporas de *P. cinnamomi* es estimulada por *Trichoderma viride* en cepas A2 y otras especies de *Phytophthora* (Brasier, 1971; Reeves y Jackson, 1972), la base de este estímulo no se sabe, pero existen referencias de un químico tóxico volátil producido por *Trichoderma* que provoca cambios morfológicos que pueden ser relacionados a la formación de oosporas. Un producto metabólico de *T. viride* se ha identificado en cultivos, pero su papel en la reproducción sexual es dudoso.

Reeves y Jackson (1974) mostraron que las oosporas se puede inducir mecánicamente por lesiones en el micelio en A2.

La reproducción sexual en *P. cinnamomi* y varias especies de *Phytophthora* se induce por una sustancia tipo hormona que estimula la producción de oosporas, en este sistema, la producción de oosporas ocurre en A1 así como también en A2 (Ko, 1978) .

Así, el grupo de compatibilidad sexual A2 de *P. cinnamomi* puede funcionar como un patógeno homotálico cuando el estímulo apropiado se proporciona, esto puede ser una respuesta nutritiva, sustancia química más específica (como el extracto de raíz de

aguacate y/o el estímulo de *Trichoderma*), o una respuesta a una "hormona" en algunos casos.

Descubrimiento de grupos de compatibilidad

La compatibilidad sexual en el género *Phytophthora* fue establecida en 1958 cuando Gallegly y Galindo designaron grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *P. infestans*, desde aquellos años los grupos de compatibilidad, de otras especies heterotálicas de *Phytophthora* han sido relacionados al A1 y A2 de *P. infestans* (Savage *et al.*, 1968).

Los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *P. cinnamomi* fueron reportados por primera vez en abril de 1962 (Zentmyer, 1962), cuando se trabajó con 24 aislamientos provenientes de distintos países como Argentina, Chile, Estados Unidos, Honduras, Costa Rica, Nueva Zelanda, Perú, Puerto Rico y México, los cuales se cruzaron entre sí; de los resultados de estas cruces se encontró que existen dos grupos de apareamiento sexual compatibles (Galindo y Zentmyer, 1964). Sin embargo, existen reportes previos en donde *P. cinnamomi* produce oosporas al aparearse con otras especies de *Phytophthora* (Ashby, 1929; Barrett, 1948; Cohen, 1950; Stamps, 1953), pero los grupos de compatibilidad no fueron identificados.

A raíz del descubrimiento de Galindo, se iniciaron trabajos para determinar las reacciones de apareamiento de un gran número de aislamientos como en Venezuela; en donde se utilizaron 176 aislamientos y se determinó la presencia *P. cinnamomi* (Patovar típico y atípico), correspondiendo el patovar típico al grupo de compatibilidad sexual A2

y el atípico al grupo A1, siendo el que se presenta con una mayor frecuencia el típico (Rondon, 1988).

Reportes del estado sexual

P. cinnamomi es un patógeno heterotálico, es decir presenta dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 (Galindo y Zentmyer, 1964). El grupo de compatibilidad sexual A2 es el más común en el mundo; mientras que el A1 presenta una distribución geográfica y rango de hospederos limitado (Zentmyer, 1976).

El estado sexual de *P. cinnamomi* ha sido observado raramente, el primer reporte de este estado fue realizado por Zentmyer (1952), el cual mostró que bajo ciertas condiciones nutricionales, el patógeno se comporta como homotálico. Diversos reportes de la producción de oosporas producto de cruces interespecíficos han sido realizados para *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri* y *Phytophthora palmivora* (Barrett, 1948).

El centro de origen de *P. cinnamomi* es desconocido, pero basándose en observaciones de un gran número de plantas en Asia, las cuales mostraban resistencia a este patógeno Crandall y Gravatt (1967), supusieron que *P. cinnamomi* es originario de Asia. Aunque, Zentmyer (1980; 1988), sugiere que el origen de *P. cinnamomi* es la región de Nueva Guinea-Malasia, posiblemente extendiéndose al Noreste Australiano. Sin embargo, recientes evidencias demuestran que *P. cinnamomi* fue introducido al Este de Asia (Zhou *et al.*, 1992). Estudios en Australia indican bajos niveles de diversidad genética, lo que es indicativo de una introducción del patógeno (Old, 1984; 1988). Los

altos niveles de diversidad genética encontrados en Nueva Guinea, indican que esta sea posiblemente el origen del patógeno (Old, 1988); empero, Taiwán y Sudáfrica han sido consideradas como posible centro de origen (Ko *et al.*, 1978; Von Broembsen y Kruger, 1985).

Los niveles de diversidad genética en hongos son usualmente mas altos en aislados obtenidos del centro de origen; por ejemplo, *P. infestans* en el cual la ocurrencia de la reproducción sexual y los altos niveles de diversidad fueron identificados en aislados del Centro de México, por lo que se presume que es el centro de origen de este patógeno (Tooley *et al.*, 1985).

Ambos grupos de compatibilidad sexual de *P. cinnamomi* han sido introducidos a Sudáfrica (Linde *et al.*, 1997), ocurriendo la reproducción sexual del patógeno; sin embargo, diversos análisis de isoenzimas demostraron que la ocurrencia de la reproducción sexual es muy baja en Australia (Old *et al.*, 1984, 1988) y en poblaciones de Sudáfrica (Linde *et al.*, 1997)

Efectos de la reproducción sexual de *Phytophthora cinnamomi*

La reproducción sexual es considerada una importante fuente de variación intraespecífica en el género *Phytophthora* (Galindo y Zentmyer, 1967). Así, la producción de oosporas a partir del grupo de compatibilidad sexual A2, podría estar relacionada con la supervivencia del patógeno . En el caso de *P. cinnamomi*, la ocurrencia del grupo A1 y la distribución del A2 podría estar relacionadas a propiedades

homotálicas del segundo (Zentmyer, 1979). La función de oosporas de tipo homotálico, es como propágulos persistentes en la planta enferma (Stack y Millar, 1985).

En otro contexto, la estimulación del patógeno a producir el estado sexual, posiblemente podría ser considerado un mecanismo de defensa del hospedero, reduciendo la producción de esporangios, los cuales presentan un enorme potencial para acelerar el desarrollo de la enfermedad y la formación de miles de zoosporas (Zentmyer, 1979).

El papel de las oosporas en tipos heterotálicas no está bien comprendido, pero fuertes evidencias indican que el apareamiento de los tipos de compatibilidad sexual A1 y A2 pueden ser una fuente de nuevas razas o biotipos (Romero y Erwin, 1969, Tooley *et al.*, 1986; Spielman *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996), especialmente, en los lugares en donde ambos tipos coexisten en la naturaleza (Smoot *et al.*, 1958; Galindo y Gallegly, 1960).

El descubrimiento de la recombinación sexual *in vitro* en *P. cinnamomi* sugiere que la oospora pudiera ser producida y tomar importancia en campo; por lo tanto, si se reproduce sexualmente en el campo, las oosporas podrían ser otra muy importante fuente de inóculo inicial para la enfermedad, de aquí la necesidad de determinar como contribuyen las oosporas en la enfermedad y que factores influyen en su producción, supervivencia y germinación (Linde *et al.*, 2001).

Materiales y métodos, así como resultados y discusión se indican en cada uno de los artículos incluidos, acorde al reglamento interno del Postgrado en Parasitología Agrícola.

**Compatibilidad Sexual de *Phytophthora cinnamomi* Rands.
en Michoacán México
(con 6 figuras)**

**Ochoa- Fuentes¹ YM, FD Hernández¹, J Landeros¹, V Olalde², JL Morales³
A Flores¹**

Resumen. Se determinó la presencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *Phytophthora cinnamomi* Rands, en veinticinco aislados obtenidos de cinco localidades del estado de Michoacán, México. Los aislados se confrontaron en medio jugo V8-agar clarificado, se determinó la producción de oosporas. Se identificó el grupo de compatibilidad sexual A1 mediante PCR, usando el iniciador OPS-13, el cuál amplifica una banda de 2.7 kb y se identificaron seis aislados como grupo de compatibilidad sexual A1, los cuales corresponden a los aislados SJN-L1, TAN-00, TAN-03, URU-L1, URU-02 y URU-03. Sin embargo de estos aislados solo el TAN-00 produjo oosporas al confrontarse con el resto de los aislamientos.

Palabras clave: Apareamiento., Grupos de Compatibilidad A1 y A2., PCR., Tristeza del aguacatero.

¹ Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. CP 25315, México

² Laboratorio de Bioquímica Ecológica. CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. km 9.6 del Libramiento Norte, Carretera Irapuato- León, Irapuato, Gto. CP 36500, Mexico

³ Facultad de Agrobiología Presidente Juárez Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín, Uruapan Mich. CP 60090, México.

Phytophthora cinnamomi Rands causante de la tristeza del aguacatero, es una de las enfermedades más devastadoras del frutal (24). El patógeno posee dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 (1,8) siendo el A2, el que presenta mayor grado de agresividad y a su vez el más común en cultivos agrícolas (23); el estado sexual es una fuente potencial de variabilidad intraespecífica en especies heterotálicas (3). De acuerdo a un análisis de isoenzimas realizado en poblaciones de *P. cinnamomi* ambos grupos de compatibilidad sexual están presentes, en Australia (15,16) y Sudáfrica (13) ocurriendo la reproducción sexual. En México, este patógeno se ha detectado en las zonas aguacateras de Michoacán, Puebla, Veracruz, Nayarit y Morelos (19). En Morelos y Puebla se han encontrado incidencias que fluctúan entre 45 y 90%. Hoy en día en huertas de aguacate de Michoacán, México es alarmante el número de árboles que muestran síntomas de *P. cinnamomi*, datos conservadores muestran que el cinco por ciento de la superficie cultivada presenta daños por esta enfermedad (20), la que tiende a incrementarse.

Actualmente la reproducción sexual, la diversidad genética y patogénica así como la formación de oosporas de *P. cinnamomi* no han sido determinadas en Michoacán, México. Por lo que, se requieren realizar estudios que clarifiquen dicha interrogante, para poder planear estrategias de control. Debido a lo anterior la

investigación se realizó con el objetivo de detectar la presencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *P. cinnamomi* en las principales áreas productoras de aguacate de Michoacán.

MATERIALES & MÉTODOS

Se obtuvieron veinticinco muestras de raíces jóvenes y suelo de árboles de aguacate con síntomas de *P. cinnamomi*, colectadas a una profundidad de 40 cm y una distancia vertical de 120 cm en los municipios Tancítaro, 5; Peribán, 5; Salvador Escalante, 5; San Juan Nuevo, 5 y Uruapan, 5 del estado de Michoacán. El patógeno se aisló de las muestras de suelo mediante el método del fruto del manzano, el cual consistió en hacer con sacabocados tres orificios de 3 cm de profundidad, para introducir en su interior suelo de las muestras. Los orificios se humedecieron con agua destilada estéril y se cubrió con un algodón humedecido sobre la superficie y fue cubierta con la tapa de la corteza del mismo fruto, colocando una banda adhesiva para sostenerla. El fruto inoculado se colocó en cámara húmeda en bolsas de plástico por 48 h a 24 °C, haciéndose las observaciones cada tercer día. Las muestras positivas formaron manchas marrones alrededor de los orificios, a partir de las cuales se hicieron los aislamientos y purificaciones por punta de hifa sobre V-8 agar, incubándose a 24 °C ± 2° C en oscuridad por siete días (5,17).

Identificación de *P. cinnamomi*. A los siete días se realizaron preparaciones tomando porciones de micelio con esporangioforos y *esporangios*; las cuales se observaron al microscopio y fueron identificados en base a criterios morfológicos

(8,11). Debido a la escasa producción de esporangios se multiplicó el material mediante inoculaciones en extracto de suelo no estéril, en donde se colocaron dos discos con micelio de *P. cinnamomi* con un diámetro de 0.5 cm en 2.5 gr de suelo no estéril en 250 ml de agua destilada estéril durante 3 días a una temperatura de 24 °C esto nos permitió tener un mayor número de esporangios (2,22,23).

Confrontación de aislados. Las cepas puras se confrontaron entre si. De los cultivos de cada cepa en crecimiento activo (8-10 días) se cortaron discos de micelio de 0.5 cm de diámetro y se colocaron en un extremo de la caja de petri con medio V8- agar y en el extremo contrario se colocó un disco de una segunda cepa, de esta manera se cruzaron todas y cada cepa consigo misma. Las confrontaciones fueron incubadas a 18°C durante 10 a 15 días en oscuridad. La observación de los apareamientos se realizó cada tercer día y se detectó mediante la presencia de oogonios, anteridios y oosporas.

Determinación de grupos de compatibilidad sexual utilizando el primer OPS-13 (6). Para extraer el ADN se raspo micelio de *P. cinnamomi* de una caja de petri con medio V-8 agar clarificado (20% V-8, 0.2% CaCO₃, 1.6 % de agar bacteriológico y 2.0 % de dextrosa anhidra). El ADN fue extraído por el método Doyle modificado por Vázquez (7); utilizando Dodecil sulfato de sodio (SDS) Promega Inc. 0.2 g de micelio fueron pesados para posteriormente macerarlos con una varilla esmerilada y resuspenderlos en 500 µL de regulador de extracción (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2%). Se agitó en un vortex durante medio minuto, manteniéndose en hielo por 15 min, agregando posteriormente 500 µL de cloroformo alcohol isoamilico 24:1 y agitando en un vortex para posteriormente centrifugarlo a 12,000 rpm durante 15 min, recuperando la fase acuosa en un tubo nuevo adicionando el

mismo volumen de isopropanol, se dejó reposar por 15 min en hielo para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min, desechando el sobrenadante para recuperar la pastilla la cual fue resuspendida en 50 μL de agua desionizada estéril, agregando 10 μL de RNAsa e incubando a 37° C por 1h, finalmente se determinó la concentración de ADN, diluyendo éste hasta obtener la concentración de ADN adecuada para la reacción de PCR en este caso se utilizaron 50 ng/ μL .

Condiciones de PCR. La amplificación del ADN se realizó con el iniciador GTC GTT CCTG, obtenido de MWG, Inc. (Biomol). Las condiciones de PCR óptimas fueron las siguientes, cada 24 μL mezcla para PCR contenía 2.5 μL de regulador de la Taq 10X, 1.2 μL de MgCl_2 , 2 μL de mezcla de DNTPs a 10 mM, 0.2 μL Taq polimerasa 5U/ μL , 1 μL del iniciador 10 pmol, 2 μL ADN a 50 ng y 15.1 μL de agua.

Las condiciones de amplificación incluyen un primer paso de 94° C por 5 min un ciclo, 45 ciclos de desnaturalización a 94° C por 1 min, alineamiento a 35 °C por 1 min y extensión a 72° C por 1 min 10 sec, esto fue durante 45 ciclos y un último paso a 72° C por 7 min (6).

Análisis de los Productos por PCR. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% (Promega Inc Biomol) en TAE regulador 1X (pH 8.3) a 60 V por 3 h. El gel se tiñó con 5 μL de bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz uv (302 nm). Se determinó el tamaño de cada fragmento cortado por la enzima de restricción. Esto se logró comparando los fragmentos de DNA cortados por la enzima con un fragmento de tamaño conocido el Lambda Hind III ladder.

RESULTADOS & DISCUSIÓN

Identificación de *P. cinnamomi*. Las preparaciones obtenidas del medio de cultivo fueron observadas al microscopio presentando la siguiente morfología, esporangios ovoides, obpiriformes y elipsoides no papilados, redondeados en la base como se muestra en las Figuras 1 y 3. Esporangios producidos por proliferación interna en esporangioforo simple, (Figura 2). Formación de clamidosporas terminales, las cuales son globosas con pared delgada, generalmente agrupadas en racimos (Figura 3) y oosporas redondeadas de color café claro como se aprecia en la Figura 6. Esta morfología concuerda con la descrita para *P. cinnamomi* Erwin *et al*, (8).

Determinación de los grupos de compatibilidad sexual. Se realizaron 325 confrontaciones y se presentaron dos tipos de respuestas: En la primera, ninguna cepa presentó oosporas al aparearse consigo mismo; así como en 301 confrontaciones entre cualquier otra cepa probada, lo que descarta la posibilidad de que presente comportamiento homotálico, como fue descrito en 1964 por Franquee *et al*, (9) quien menciona que *P. cinnamomi* puede comportarse como un patógeno homotálico. En el segundo tipo de respuesta se formaron oosporas en veinticuatro confrontaciones, indicando que si existen ambos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 en la región productora de aguacate de Michoacán. Estos resultados se contraponen a lo obtenido en 1964 por Galindo *et al*. (10) dichos autores reportan que el grupo A1 se encuentra solo en Hawai en plantas de Macadamia y Papayo. Es probable que el grupo A1 pudo haber llegado a México de la misma forma en que se introdujo el grupo A2 y se halla adaptado a las condiciones ambientales donde se desarrolla el aguacatero de una forma mas reservada dado que el grupo A1 no presenta patogénesis en plantas de aguacate.

Galindo et al, (10) por lo que su presencia en México pudo haber pasado desapercibido, por lo anterior existen referencias como la de Téliz (20), donde reporta que en México solo se encuentra un grupo de compatibilidad sexual y por consiguiente no existe evidencia de oosporas en el país. Los análisis de PCR mostraron que algunos aislados presentaron la banda de 2.7 kb, Chang et al, (6) que corresponde al grupo A1, siendo estos los aislados SJN-L1, TAN-00, TAN-03, URU-L1, URU-02 y URU-03; sin embargo al confrontar estos aislados con el TAN-00, se indujo la formación de oosporas. Lo anterior significa que las cepas pueden presentar un comportamiento tipo homotálico como el reportado en 1998 por Muñiz, (14) donde encontró dos aislamientos de *Phytophthora infestans*, los cuales produjeron oosporas al aparearse con cualquier aislamiento probado, pero no al apararse consigo mismo; es decir los aislamientos presentaron un tipo de respuesta A1 A2; lo que le permite formar oosporas al cruzarse con los aislamientos de los otros grupos. Este tipo de comportamiento fue descrito por Erwin et al, (8). El homotalismo (formación de oosporas sin actividad sexual entre A1 y A2) se puede presentar mediante estímulos exteriores en formas muy variadas; ya sea por el uso de bacterias del género *Trichoderma viride* Brassier (4); por daño mecánico en el micelio de las cepas A2 Reeves (18); por reacción química al estar expuesta al ácido oleico que se encuentra en la raíz del aguacatero, lo que sucede solo en el grupo A2 Zentmyer (21,23). La reproducción sexual en *Phytophthora cinnamomi* y varias especies de *Phytophthora* se encuentran relacionadas a una sustancia tipo hormonal Ko (12). En este sistema, la producción de oosporas ocurre en A1 como también en A2. De acuerdo a la información anterior, se puede concluir que en la región productora de Aguacate del estado de Michoacán, México, se encuentran presentes los

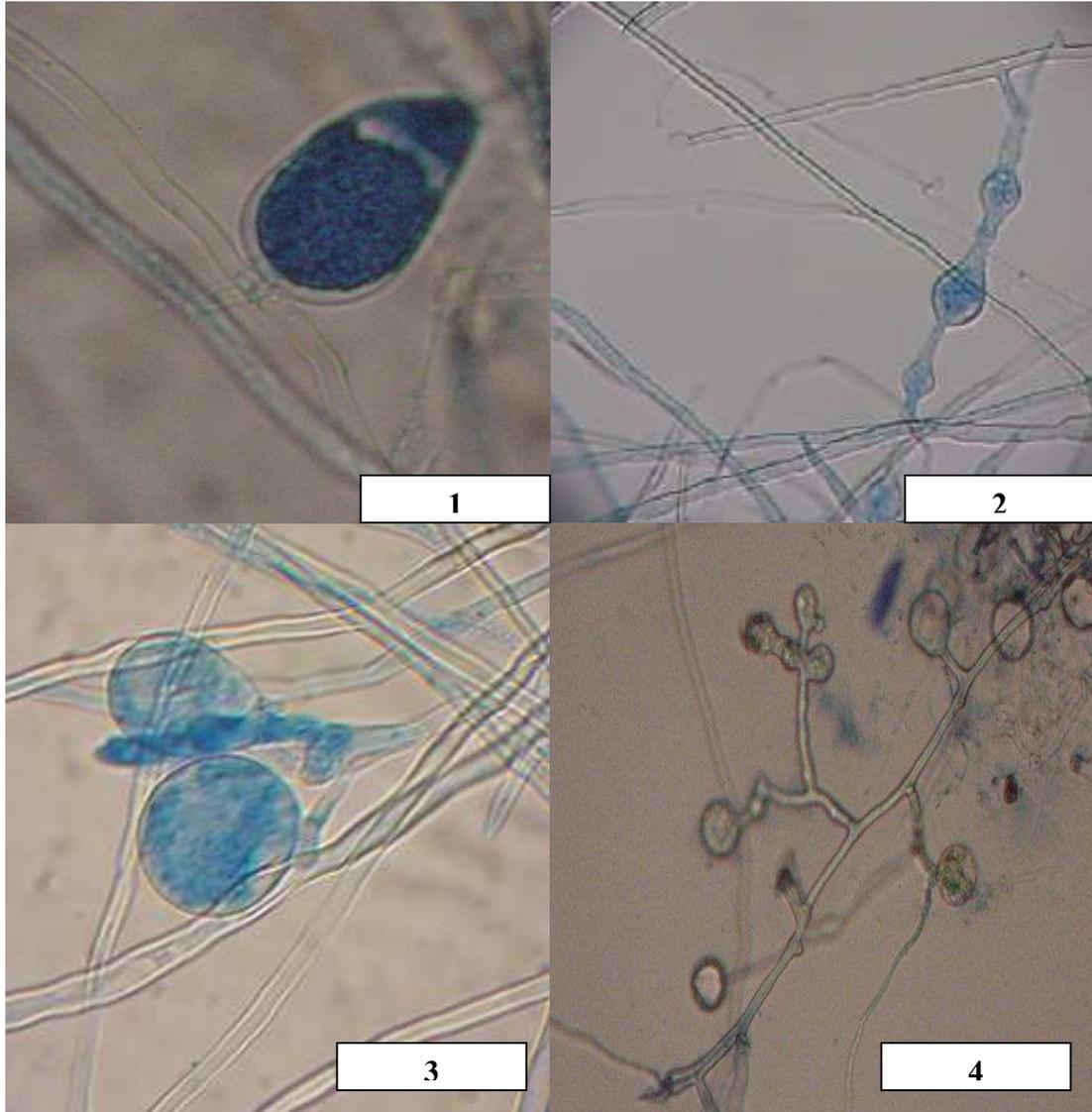
dos grupos de compatibilidad sexual de *P. cinnamomi*; y que los aislados de *P. cinnamomi* pueden presentar comportamiento tipo homotálico.

LITERATURA CITADA

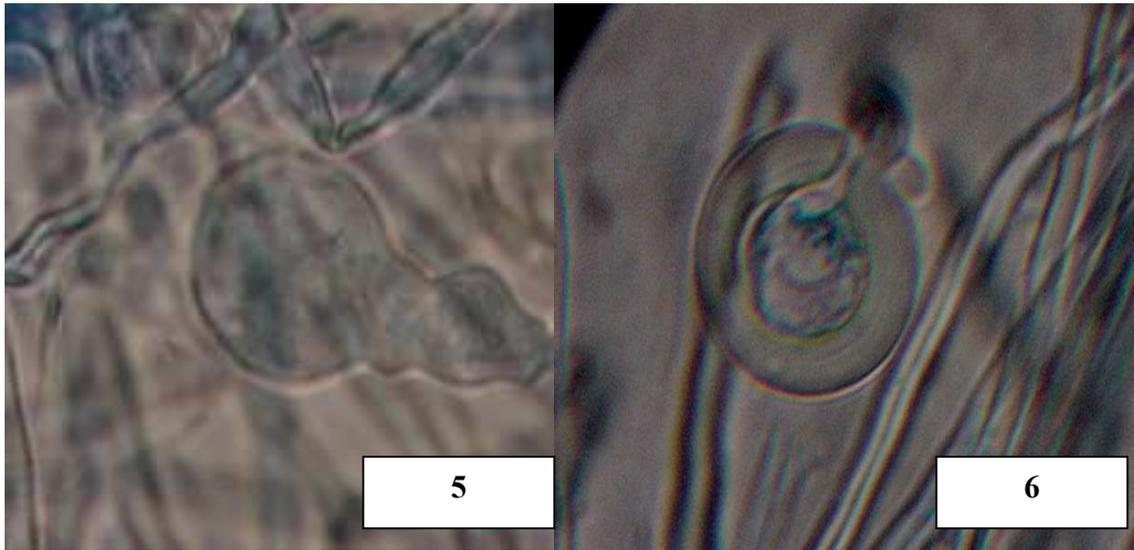
1. Alexopoulos. CJ., Mims, CW., and Blackwell, M. Introductory Mycology. 4th ed. 687-689, (1996) 717-723.
2. Ayers, WA. and Zentmyer, GA. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 61(1971)1188-1193.
3. Boccas, B., and Zentmyer, GA. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 66 (1976) 477-484.
4. Brassier, CM. Induction of sexual reproduction in single A2 isolates of *Phytophthora* species by *Trichoderma viride*. Nature (London) New Biol. (1971) 231-283.
5. Campbell, WA. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil . Plant Dis. Rep. 33: (1949)134-135.
6. Chang, TT., Yang, WW., Wang, WY. Use of random amplified polymorphic and markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 37: (1996)165-171.
7. Doyle JJ and Doyle JL Isolation of plant DNA from fresh tissue; *Focus* (1990) 12
13-15
8. Erwin, DC., and Ribeiro, OK. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. St. Paul, Minesota. USA. xi-xii, (1996) 269-276
9. Franquee, AH., Nelson., and Marx DH. Morphologic and physiological characteristics of the mating type of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology, 54: (1964) 823-825.
10. Galindo, AJ. and Zentmyer, GA. Mating types in *P. cinnamomi*. Phytopathology 54: (1964) 238-239.
11. Huberli, D., Tommerup, LC and Hardy, GE. The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. Mycol Research. 101: (1997) 1383-1388.
12. Ko, WH. Heterothallic *Phytophthora*: Evidence for hormonal regulation of sexual

- reproduction . J. Gen. Microbiol. 107:(1978)15-18.
13. Linde C, Drenth A, Kemp GH.J, Wingfield MJ, Von Broembsen SJ. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology* 87, (1997) 822-827.
 14. Muñiz VJA. Identificación de compatibilidad sexual y genes de virulencia de *Phytophthora infestans* (Mont) By y Evaluacion de resistencia en 18 materiales a los tizones tardío y temprano de papa en la region de Coahuila y Nuevo León. Tesis UAAAN Buenavista, Saltillo Coahuila, México (1998) 60
 15. Old KM. Moran GF, Bell JC. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany* 62, (1984) 2016-2022.
 16. Old KM. Dudzinski MJ, Bell JC. Isoenzyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Australian Journal of Botany* 36, (1988) 355-360.
 17. Rondón, A., Suárez, Z., Figueroa, M y Tellechea, V. Comportamiento de los Patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de Aguacate en Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 1:(1988) 14-16
 18. Reeves, JR., and Jackson, RM. Stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* by damage. *J. Gen. Microbiol.* 84: (1974)303-310.
 19. Téliz, D., A. Mora, C. Velásquez, R. García, G. Mora, P. Rodríguez., J. Etchevers., and S. Salazar. Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. *Proc. Of Second World Avocado Congress:* (1992) 79-87.
 20. Téliz, D. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. (2000) 158-167
 21. Zentmyer, GA., and Erwin, DC. Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* 60: (1970) 1120-1127.
 22. Zentmyer, GA., Leary, JV., Klure, LJ and Grantham, GL. Variability in Growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology* 66: (1976) 982-986
 23. Zentmyer, GA. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by a substance in avocado roots. *Phytopathology* 69: (1979) 1129-1131.

24. Zentmyer, GA. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph. 10. The American Phytopathological Society, St, Paul , MN. (1980) 96



Figs. 1-4.- Estructuras de *Phytophthora cinnamomi*. Fig 1. Esporangio ovoide, no papilado. Fig 2.- Esporangioforo simple, nuevos esporangio producidos internamente. Fig 3.- Clamidospora globosa con pared delgada y esporangio opiriforme, no papilado. Fig 4. Micelio toruloso.



Figs. 5-6. Estructuras sexuales de *Phytophthora cinnamomi*. Fig 5.- Oogonio y anteridio anfigeno. Fig 6.- Oospora.

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora cinnamomi* RANDS DE AGUACATE

Genetic Diversity of *Phytophthora cinnamomi* Isolates from Avocado

A Flores-Olivas, YM Ochoa-Fuentes , FD Hernández-Castillo, V Olalde-Portugal,
J Landeros-Flores.
(AFO)(YMOF)(FDHC)(JLF)(ECC) Laboratorio de Parasitología Molecular
Departamento de Parasitología. UAAAN.
Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
CP 25315
yisa8a@yahoo.com
afoli@uaaan.mx

(VOP) CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato
Laboratorio de Bioquímica Ecológica
Km 9.6 del Libramiento Norte, Carretera Irapuato- León
Irapuato, Guanajuato, México
CP 36500

Fecha de recepción:

Fecha de aceptación:

RESUMEN. Cuarenta y dos aislados de *Phytophthora cinnamomi* Rands, de cinco municipios del estado de Michoacán, México, fueron examinados por polimorfismos de ADN amplificados al azar, con el objetivo de determinar la variabilidad genética de *P. cinnamomi* de aguacate; dicha variabilidad se evaluó por reacción en cadena de la polimerasa con 21 oligonucleotidos de 10 bases cada uno, los cuales mostraron un total de 23 bandas. La distancia genética entre cada uno de los aislados fue calculada y analizada por el método del promedio no ponderado, de esta manera se obtuvo un dendrograma, el cual mostró las relaciones entre cada uno de los aislados. El análisis mostró que las agrupaciones geográficas son fuertes.

Palabras clave: *Persea americana*, RAPDs, tristeza del aguacatero

ABSTRACT. Forty two Mexican isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands, were examined for genetic diversity by the random amplified polymorphic DNA assay. The amount of genetic variation was evaluated by polymerase chain reaction amplification with a set of twenty one random 10-mer primers. All amplifications revealed scorable polymorphisms among the isolates, and a total of 23 band position was scored for the 21 primers tested. Genetic distances between each of the isolates were calculated and cluster analysis was used to generate a dendrogram showing relationships between them. These results suggest that the geographic groups are strong.

Key words: *Persea americana*, RAPDs, root rot on Avocado

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi Rands, causante de la tristeza del aguacatero, es una de las enfermedades más devastadoras del frutal (Zentmyer 1980). En México, en los estados de Morelos y Puebla se han encontrado incidencias que fluctúan entre 45 y 90 por ciento. En Michoacán, México es alarmante el número de árboles que muestran síntomas de *P. cinnamomi*, datos conservadores muestra que el cinco por ciento de la superficie cultivada presenta daños por esta enfermedad (Téliz 2000) y tiende a incrementarse.

Este patógeno posee dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 (Erwin *et al.* 1996; Alexopoulos 1996), el A2 presenta mayor grado de agresividad y es el más común en cultivos

agrícolas (Zentmyer 1980); el estado sexual es una fuente potencial de variabilidad intraespecífica en especies heterotálicas (Boccas *et al.* 1976).

De acuerdo a un análisis de isoenzimas realizado en poblaciones de *P. cinnamomi*, ambos grupos de compatibilidad sexual solo están presentes en Australia (Old *et al.* 1984; 1988) y Sudáfrica (Linde *et al.* 1997; 1999) reproduciéndose sexualmente.

En México este patógeno se ha detectado en las zonas aguacateras de Michoacán, Puebla, Veracruz, Nayarit y Morelos (Téliz *et al.* 1992).

La variabilidad genética de un microorganismo puede ser determinada por medios tradicionales, así como por técnicas modernas, dentro de los primeros se encuentran morfología colonial (Tommerup *et al.* 2000), comportamiento sexual (Galindo y Zenmyer 1964), germinación de esporangios (Ayers y Zentmyer 1971), morfología del anteridio (Huberli *et al.* 1997), resistencia a productos químicos (Ritch 1991), patogenicidad (Huberli *et al.* 2001; Romero y Erwin 1969), uso de plantas diferenciales (Streets 1969) etc. Siendo las técnicas modernas como marcadores moleculares, las que han permitido la detección más eficiente de variantes genéticas de distintos microorganismos (Michelmore y Hulbert 1987).

Los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs) han sido utilizados para detectar la variabilidad intraespecífica existente entre patógenos (Assigbetse *et al.* 1994; Crowhurst *et al.* 1991; Zimand *et al.* 1994). Para hongos fitopatógenos, el análisis RAPDs puede proveer marcas que sirvan para diferenciar; razas de *Fusarium. solani* f. sp. *cucurbitae* Snyder & Hansen (Crowhurst *et al.* 1991), *Fusarium. oysporum* f. sp. *pisi* (Schlecht.) Snyder & Hansen (Grajal-Martin *et al.* 1993); aislados agresivos y no agresivos de *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. (Goodwin & Annis 1991; Schäfer & Wöstemeyer 1992); aislados con diferentes orígenes geográficos de *Collectotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Guthrie *et al.* 1992) y aislados de *Discula umbrinella* Sacc. en diferentes hospederos (Haemmerli *et al.* 1992).

Actualmente la diversidad genética de *P. cinnamomi* no ha sido determinada en Michoacán, México; por ello se requieren realizar estudios que clarifiquen dicha interrogante; para de esta manera poder planear estrategias de control adecuadas, ya que la variabilidad podría dar como resultado el desarrollo de variantes más agresivas y resistentes a plaguicidas convencionales. Debido a lo anterior, el trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas entre 42 aislados de *P. cinnamomi* obtenidos de las principales áreas productoras de aguacate de Michoacán, por medio de polimorfismos de ADN amplificadas al azar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *P. cinnamomi* y extracción de ADN

Cuarenta y dos aislados (Tabla 1) de *P. cinnamomi* se analizaron por RAPDs. El método de Zentmyer (1970) se utilizó para aislar a *P. cinnamomi* de raíz y el método de (Campbells 1949; Rondon 1988) se usó para suelo.

Se raspó el micelio de *P. cinnamomi* de una caja de Petri con medio V-8 agar clarificado (20 % V-8, 0.2 % CaCO₃, 1.6 % de agar bacteriológico y 2.0 % de dextrosa anhidra). La extracción de ADN se realizó por el método Doyle modificado por Vázquez (1990); 0.2 g de micelio se pesaron y maceraron con una varilla esmerilada para resuspenderlos en 500 µL de regulador de extracción (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2 %), se agitó en un vortex durante 30 s, y se dejó reposar en hielo por 15 min. Se agregaron 500 µL cloroformo alcohol isoamílico 24:1 y agitó en un vortex para posteriormente centrifugarlo a 12,000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le adicionó el mismo volumen de isopropanol, se dejó reposar por 15 min en hielo para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm

durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla la cual fue resuspendida en 50 μ L de agua desionizada estéril. Se agregó 10 μ L de RNAsa y se incubó a 37°C por 1 h, finalmente se determinó la concentración de ADN y se diluyó este hasta obtener la concentración de ADN adecuada para la reacción de PCR en este caso se utilizaron 50 ng/ μ L.

Amplificación de ADN

Condiciones de PCR. La amplificación del ADN se realizó con cada uno de los iniciadores mostrados en la (Tabla 2), estos oligonucleotidos constan de 10 bases de longitud, obtenidos de MWG, Inc. (Biomol). Las condiciones de PCR optimas para la reacción de RAPDs fueron las siguientes. Cada 24 μ L de mezcla para PCR contenía 2.5 μ L de regulador de la Taq 10X, , 1.2 μ L de $MgCl_2$, 2 μ L de mezcla de DNTPs a 10 mM, 0.2 μ L Taq polimerasa 5U/ μ L , 1 μ L de iniciador 10 pmol, 2 μ L ADN a 50 ng y 15.1 μ L de agua.

Las condiciones de amplificación incluyen un ciclo inicial de 94°C por 5 min, 45 ciclos a 94 °C por 1 min , alineamiento a 35 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min 10 sec; así como un último ciclo a 72 °C por 7 min (Chang et al., 1996).

Análisis de los productos de PCR. Se corrió en un gel de agarosa al 2 % (Promega Inc Biomol) en TAE regulador 1X (pH 8.3) a 60 V por 3 h. El gel se tiñó con 5 μ L de bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz uv (302 nm).

Análisis de datos. Se obtuvieron las disimilaridades genéticas, utilizando el coeficiente de apareamiento múltiple (Sneat & Sokal, 1973) y el método de agrupamiento jerárquico UPGMA o método del promedio no ponderado, para obtener un dendograma.

RESULTADOS

De los 21 oligonucleotidos utilizados, cuatro presentaron amplificaciones con un total de 23 bandas que representan el 95.65 % de polimorfismos. Los iniciadores usados, el número total de bandas, así como bandas polimórficas obtenidas de los aislados se muestran la (Tabla 2). El patrón de bandeo obtenido con los iniciadores OPS-13, OPE-04, OPE06 y OPE-10 se puede observar en las (Figuras 1 y 2), la información obtenida del patrón de bandeo se utilizó para determinar la distancia genética entre los aislados y construir un dendograma (Figura 3).

Las amplificaciones obtenidas oscilaron entre 0.564 a 2.7 kb, en las bandas de los RAPDs a las que se les otorgaron dos valores: el valor de 1 para la banda presente y 0 para la ausente. El análisis de los 42 aislados con 23 bandas, se analizaron en el programa S-plus profesional para Windows; los datos obtenidos en los RAPDs se utilizaron para obtener la matriz de disimilaridades genéticas utilizando el coeficiente de apareamiento múltiple (Sneat & Sokal 1973), también conocido como coeficiente de Sckroch (Sckroch *et al.* 1992), seguido por la utilización del método de agrupamiento jerárquico UPGMA o método del promedio no ponderado, para construir el dendograma (Sneat & Sokal 1973). Esta agrupación mostró dos niveles de asociación, así, los aislados se clasificaron dentro de dos grupos principales y dos pequeños subgrupos.

Al comparar las poblaciones de *P. cinnamomi* de los cinco municipios del estado de Michoacán México, la agrupación de los aislados en relación a la distribución geográfica, se mantuvo. En el grupo A, se encuentra el 100 % de los aislados de Salvador Escalante, el 83 % de los aislados de Peribán, el 88 % de los aislados de Tancítaro, 50 % de los aislados de San Juan y

45 % de los aislados de Uruapan. En el grupo B, se ubica el 50 % de los aislados de San Juan Nuevo y el 55 % de los aislados de Uruapan (Figura 3).

DISCUSIÓN

En un estudio realizado por Chang (1996) encontró en 25 aislados de *P. cinnamomi*, 18 provenientes de raíz de *Cinnamomum osmophloeum* (canela) y tres de *Persea americana* (aguacate) de suelos forestales, encontró 80.2 % de polimorfismos, así como un coeficiente de similitud de los grupos de compatibilidad sexual A1, A2 y ambos, de 0.695, 0.63 y 0.63 respectivamente, estos resultados indican que las poblaciones A1 presentan menos variación que A2; sin embargo, la diferenciación genética no fue significativa.

Las agrupaciones mostradas en el dendograma, muestran que, la separación esta relacionada con la localización geográfica de la cual fueron obtenidos los aislados; por ejemplo, los sitios de muestreo pertenecientes al grupo B (Fig. 3) presentan condiciones climáticas semejantes como son; altura promedio de 1950 msnm, clima templado con lluvias en verano, precipitación de 900 mm y temperaturas de 7 a 38 °C, suelo andosol ocrico-húmico moderadamente drenado, de uso forestal y en menor proporción agrícola, donde domina el bosque de coníferas con pino oyamel y juníferos; así como bosque mixto de pino-encino (ASSEAM 1998). Con respecto a los dos subgrupos presentes en el dendograma y en relación con el origen geográfico de los aislados fueron designados como a1, a2, b1 y b2. Esto indica una fuente de variabilidad genética producto de la reproducción sexual y asexual del patógeno (Podger *et al.* 1972; Shea 1983; Zak & Campell 1958; Zentmyer 1980).

La reproducción sexual en especies de *Phytophthora*, ha sido una influencia significativa en los niveles de diversidad genotípica en poblaciones de estos patógenos; por ejemplo, la introducción de ambos grupos de compatibilidad de *Phytophthora infestans* dentro de Europa

incrementó la diversidad genotípica de este patógeno (Drenth *et al.* 1994). Referente a lo anterior, aislados de *P. cinnamomi* de Sudáfrica presentaron diferencias genéticas significativas (Linde *et al.* 1997, 1999).

Alrededor del mundo en poblaciones de *P. infestans*, la variación genética podría no ser totalmente atribuida a la reproducción sexual (Goodwin *et al.* 1994; Xu & Vilgalys 1999); la variabilidad genética generada por recombinación mitótica, puede explicar la variabilidad fenotípica; esto sugiere la expresión de clones de *P. cinnamomi* en el mundo (Oudemans & Coffey 1991). La considerable variación de poblaciones en Australia de *P. cinnamomi*, fue debido a la reproducción asexual y reproducción sexual (Dudzinski *et al.* 1993). El impacto de la variación genotípica y fenotípica de poblaciones de *P. cinnamomi* en el mundo, no es conocida con claridad; sin embargo, la reproducción asexual es un mecanismo predominante de variación en poblaciones del patógeno (Huberli *et al.* 1997; 2001); quienes demostraron una sustancial variación en fenotipos dentro de una línea clonal de *P. cinnamomi*, la que se observó en dos poblaciones localizadas a 70 km de distancia. Siendo el primer estudio en *P. cinnamomi* donde se usó gran número de aislados (73) en los cuales la distancia en genotipos y fenotipos varían en poblaciones cercanas.

La información obtenida en el trabajo de investigación muestra que existe variabilidad genética en *Phytophthora cinnamomi* de aguacate en la región productora de Michoacán México, la cual podría verse reflejada en variabilidad patogénica situación que debe de tomarse en cuenta para el desarrollo de estrategias de control.

LITERATURA CITADA

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) Introductory mycology. 4th ed. 687-689, 717-723.

- ASEEAM (Asociación de empacadores de aguacate de Michoacan (1998) El aguacate Mexicano. Producción y destino, Uruapan, Mich. 43 p
- Assigbetse KB, Fernandez D, Dubois MP, Geiger JP (1994) Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*. 84: 622-626.
- Ayers, W.A. and Zentmyer, G.A. 1971. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
- Boccas B, Zentmyer GA (1976) Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*. 66:477-484.
- Campbell WA (1949) A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil . *Plant Dis. Rep.* 33:134-135.
- Chang TT (1996) Decline of two *Cinnamomum* species associated with *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 2: 1-6.
- Crowhurst RN, Hawthorne BT, Rikkering EHA, Templeton MD (1991) Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 20: 391-396.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue; *Focus* 12 –13-15
- Drenth A, Tas ICQ, Grovers F (1994) DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing populations of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*. 100: 97-107.
- Dudzinski ML, Old KM, Gibbs RJ (1993) Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*. 17, 35-37.
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minesota. USA. 269-276.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Galindo, AJ. and Zentmyer, GA. 1964. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 54:238-239.
- Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE (1994) Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11591-11595.

- Goodwin PH, Annis SL (1991) Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2482-2486.
- Grajal-Martin, Simon CJ, Muehlbauer FJ (1993) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology.* 83: 612-614.
- Guthrie PAI, Magill CW, Frederiksen RA, Odvody GN (1992). Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Collectotrichum graminicola*. *Phytopathology.* 82: 832-835.
- Haemmerli UA, Brändle UE, Petrini O, McDermott KM (1992) Differentiation of isolates of *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*) from beech, chestnut, and oak using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 479-483.
- Huberli D, Tommerup LC, Hardy GE (1997) The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycol Research.* 101: 1383-1388.
- Huberli D, Tommerup LC, Dobrowolski MP, Calver C, Hardy JG (2001) Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycol. Res.* 105 (9): 1053-1064.
- Linde C, Drenth A, Kemp GHJ, Winfield MJ, von Broembsen SL (1997). Populations structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology.* 87, 822-827.
- Linde C, Drenth A, Wingfield MJ (1999) Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *Eur. Journ. Plant. Pathol.* 105 (7) 667-680.
- Michelmore RW, and Hulbert SH (1987) Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 25 p. 383.
- Old KM, Moran GF, Bell JC (1984) Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journ of Botany.* 62, 2016-2022.
- Old KM, Dudzinski MJ, Bell JC (1988) Isozyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Australian Journal of Botany.* 36, 355-360.
- Oudermans P, Coffey MD (1991) Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*
- Podger, F.D. 1972. *Phytophthora cinnamomi*, a cause of lethal disease in indigenous plant communities in Western Australia. *Phytopathology.* 62:972_981.

- Podger FD (1972) *Phytophthora cinnamomi*, a cause of lethal disease in indigenous plant communities in Western Australia. *Phytopathology*. 62:972-981.
- Ritch, D.L. 1991. *Phytophthora infestans* in Poland from 1987-1989. Nuclear DNA content, mating type and response to metalaxyl. *Phytopathology* 81: 1190. St. Paul, Mn., USA.
- Romero, S., y Erwin, D. C. 1969. Variation in pathogenicity among single oospore cultures of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 59: 1310-1317.
- Róndon A, Suárez Z , Figueroa M, Tellechea V (1988). Comportamiento de los Patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de aguacate en Venezuela. *Fitopatología Venezolana*. 1:14-16.
- Schäfer C, Wöstemeyer J (1992) Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *J. Phytopathol.* 136: 124-136.
- Shea SR, Shearer BL, Tippet JT, Deegan PM (1983) Distribution, reproduction and movement of *Phytophthora cinnamomi* on sites highly conducive to jarrah dieback in south western Australia. *Plant. Disease*. 67:970-973.
- Skroch P, Tivang J, Nienhuis J (1992) Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. Joint Plant Breeding Symposia, Minneapolis, Mn., Crop Science Society of America-American Society for Horticultural Science-American Genetic Association.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical Taxonomy* . San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- Streets RB (1969) The diagnosis of plant diseases. *Coop. Ext. Serv. Agric. Exp. Stn., Uni . Arizona Tucson* , 134 p.
- Téliz D, Mora A, Velásquez C, García R, Mora G, Rodríguez P, Etchevers J, Salazar S (1992) Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. *Proc. Of Second World Avocado Congress*: 79-87
- Téliz D (2000) El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. 158-167.
- Wells, H. D., Bell. D. K., and Jaworski, C.A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 62: 442_447.
- Tommerup, I.C., Dobrowolski, M.P., Hüberli, D., O'Brien, P.A., Hardy, G.E.St.J. & Shearer, B.L. (2000) Risks and threats due to genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* for disease management in natural vegetation ecosystems. In *First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems - Phytophthora Diseases of Forest Trees*: 55-63. Oregon State University, Oregon, USA.

- Xu J, Mitchell TG, Vilgalys R (1999) PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Mol. Ecol.* 8:59-73.
- Zak B, Campell WA (1958) Susceptibility of southern pines and other species to the littleleaf pathogen in liquid culture. *For. Sci.* 4: 151-161.
- Zentmyer GA, Erwin DC (1970) Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology.* 60: 1120-1127.
- Zentmyer GA (1980) *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monogr. No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul , Mn. 96 p.
- Zimand G, Valinsky L, Elad Y, Chet I, Manulis, S (1994). Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycol. Res.* 98: 531-534.

Tabla 1. Aislados de *Phytophthora cinnamomi* de Michoacán México usados en polimorfismos de ADN amplificados al azar.

Table 1. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Michoacan Mexico used in random amplified polymorphic DNA marker analysis.

Aislado	Municipio
C1	Periban
C2	Periban
C3	Periban
C4	Periban
C5	Periban
C29	Periban
C6	S. Escalante
C7	S. Escalante
C8	S. Escalante
C9	S. Escalante
C10	S. Escalante
C24	S. Escalante
C26	S. Escalante
C31	S. Escalante
C11	San Juan Nuevo
C12	San Juan Nuevo
C13	San Juan Nuevo
C25	San Juan Nuevo
C27	San Juan Nuevo
C28	San Juan Nuevo
C30	San Juan Nuevo
C35	San Juan Nuevo
C36	San Juan Nuevo
C40	San Juan Nuevo
C14	Tancítaro
C15	Tancítaro
C16	Tancítaro
C32	Tancítaro
C37	Tancítaro
C38	Tancítaro
C39	Tancítaro
C41	Tancítaro
C42	Tancítaro
C17	Uruapan
C18	Uruapan
C19	Uruapan
C20	Uruapan
C21	Uruapan
C22	Uruapan
C23	Uruapan
C33	Uruapan
C34	Uruapan

Tabla 2. Secuencia de Nucleótidos de MWG, Inc. (Biomol) primers usados en el experimento y número de productos de PCR polimorficos en *Phytophthora cinnamomi*.

Table 2. Nucleotide sequense of MWG, Inc (Biomol) primers used in the experiment and the number of scorable and polymorphic PCR products for *Phytophthora cinnamom*

Secuencia	Número de polimorfismos /Total
E-01 CCCAAGGTCC	0/0
E-02 GGTGCGGGAA	0/0
E-03 CCAGATGCAC	0/0
E-04 GTGACATGCC	8/9
E-05 TCAGGGAGGT	0/0
E-06 AAGACCCCTC	8/8
E-07 AGATGCAGCC	0/0
E-08 TCACCACGGT	0/0
E-09 CTTCACCCGA	0/0
E-10 CACCAGGTGA	1/1
E-11 GAGTCTCAGG	0/0
E-12 TTATCGCCCC	0/0
E-13 CCCGATTCGG	0/0
E-14 TGCGGCTGAG	0/0
E-15 ACGCACAACC	0/0
E-16 GGTGACTGTG	0/0
E-17 CTA CTG CCGT	0/0
E-18 GGACTGCAGA	0/0
E-19 ACGGCCTATG	0/0
S-13 GTCGTTCCTG	5/5

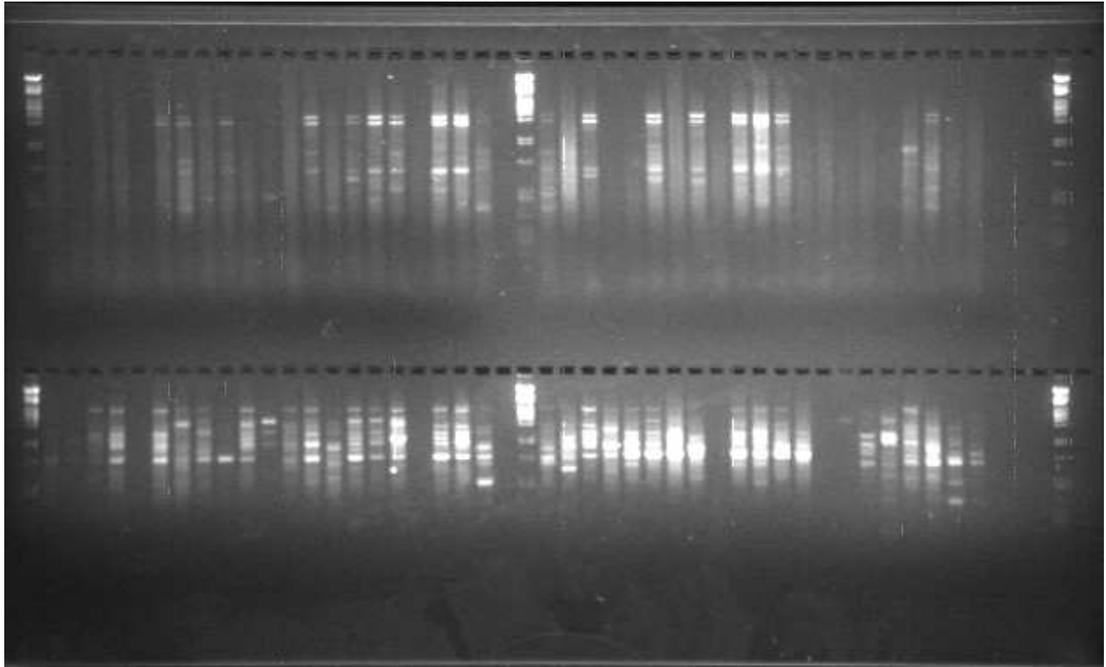


Figura 1. Patrón de bandeo obtenido por polimorfismos de ADN amplificados al azar con los iniciadores OPS13 y OPE04; con λ HindIII como marcador de peso molecular.

Figure 1. Banding pattern obtained by random amplified polymorphic DNA analysis with primers OPS13 and OPE04; λ Hind III = molecular weight marker.

AUTORES: A Flores-Olivas, YM Ochoa-Fuentes, FD Hernández-Castillo, V Olalde-Portugal, J Landeros-Flores.

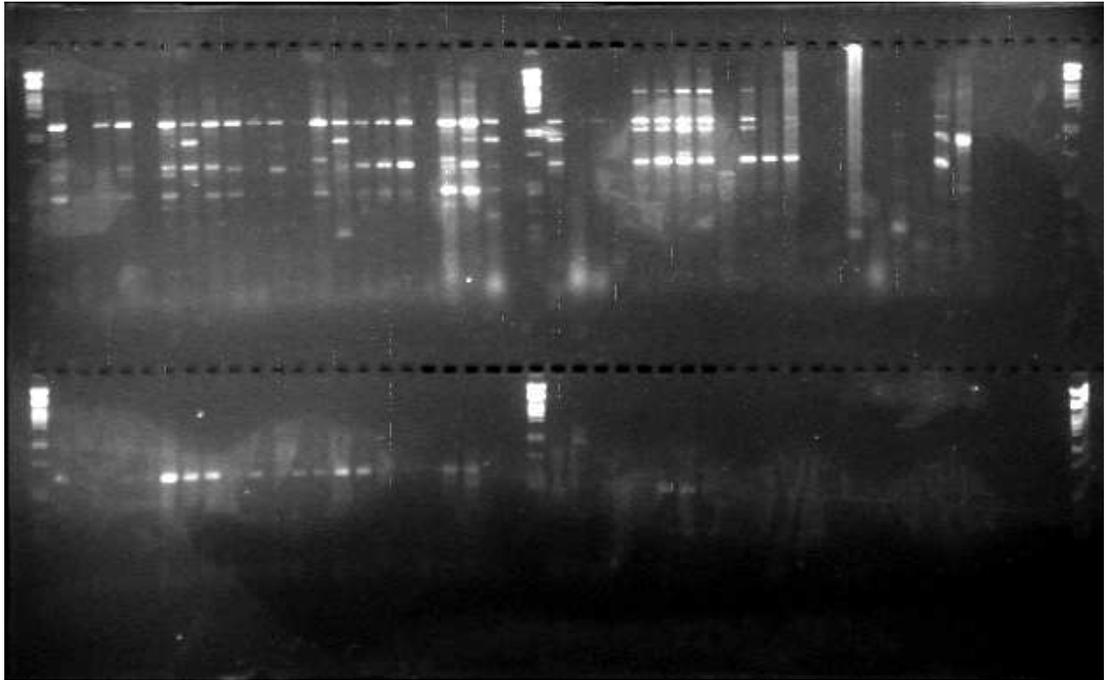


Figura 2. Patrón de bandeo obtenido por polimorfismos de ADN amplificados al azar con los iniciadores OPE06 y OPE10; con λ HindIII como marcador de peso molecular.

Figure 2. Banding pattern obtained by random amplified polymorphic DNA analysis with primers OPE06 and OPE10; λ Hind III = molecular weight marker.

AUTORES: A Flores-Olivas, YM Ochoa-Fuentes, FD Hernández-Castillo, V Olalde-Portugal, J Landeros-Flores.

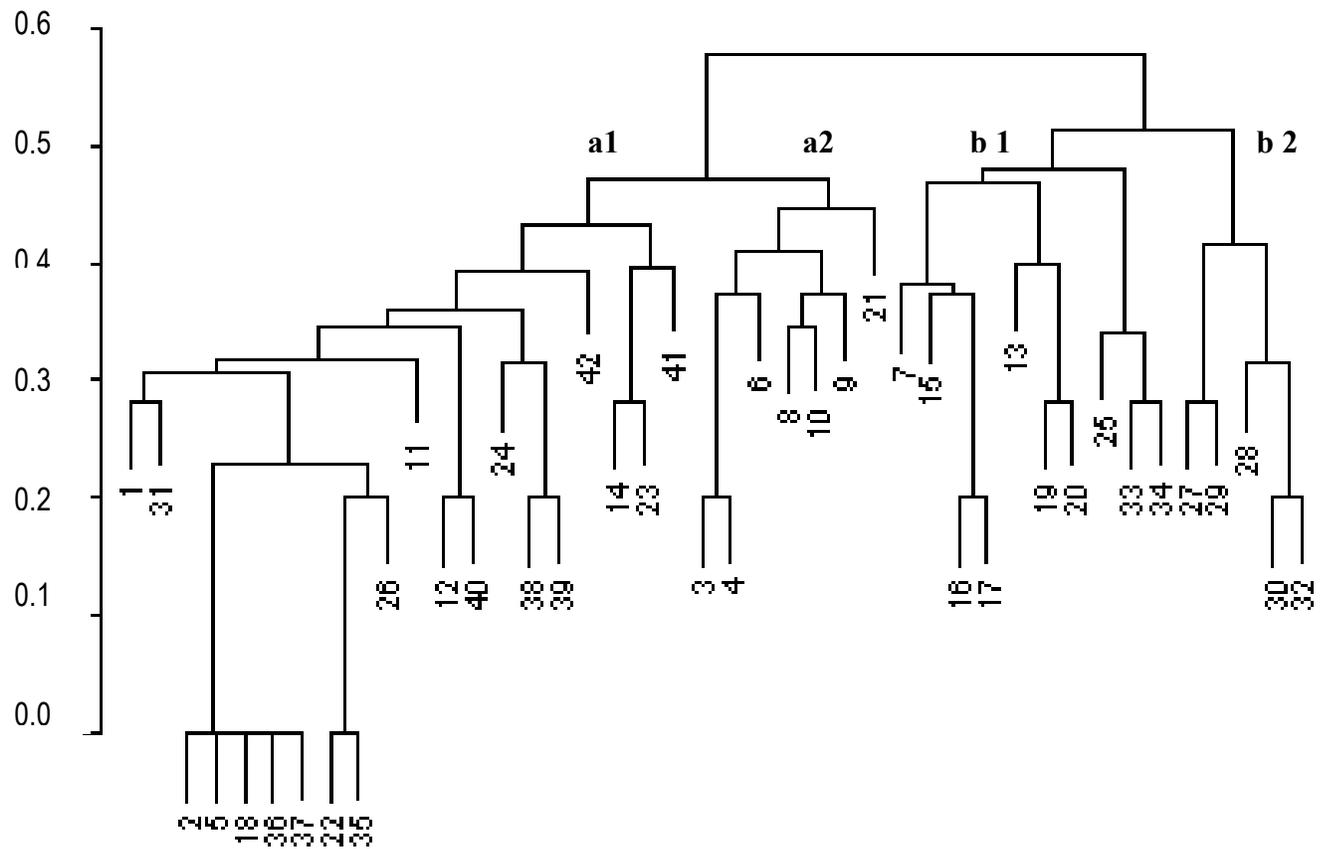


Figura 3. Dendrograma de polimorfismos de ADN amplificados al azar en cuarenta y dos aislados de *P. cinnamomi* del estado de Michoacán México. Se presentan dos grupos principales A y B; así como dos subgrupos a1 y b1.

Figure 3. Dendrogram produced by using random amplified polymorphic DNA analysis in forty two isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Michoacan Mexico. A and B denote the two main groups determined; a1, a2, b1, and b2 are the subgroups.

AUTORES: A Flores-Olivas, YM Ochoa-Fuentes, FD Hernández-Castillo, V Olalde-Portugal, J Landeros-Flores.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aislados de *Phytophthora cinnamomi* de Michoacán México usados en polimorfismos de ADN amplificados al azar.

Table 1. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Michoacan Mexico used in random amplified polymorphic DNA marker analysis.

Tabla 2. Secuencia de Nucleótidos de MWG, Inc. (Biomol) oligonucleótidos usados en el experimento y número de productos de PCR polimorficos en *Phytophthora cinnamomi*.

Table 2. Nucleotide sequence of MWG, Inc (Biomol) primers used in the experiment and the number of scorable and polymorphic PCR products for *Phytophthora cinnamomi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patrón de bandeo obtenido por polimorfismos de ADN amplificados al azar con los iniciadores OPS13 y OPE04; con λ HindIII como marcador de peso molecular.

Figure 1. Banding pattern obtained by random amplified polymorphic DNA analysis with primers OPS13 and OPE04; λ Hind III = molecular weight marker.

Figura 2. Patrón de bandeo obtenido por polimorfismos de ADN amplificados al azar con los iniciadores OPE06 y OPE10; con λ HindIII como marcador de peso molecular.

Figure 2. Banding pattern obtained by random amplified polymorphic DNA analysis with primers OPE06 and OPE10; λ Hind III = molecular weight marker.

Figura 3. Dendograma de polimorfismos de ADN amplificados al azar en cuarenta y dos aislados de *P. cinnamomi* del estado de Michoacán México. Se presentan dos grupos principales A y B; así como dos subgrupos a1 y b1.

Figure 3. Dendogram produced by using random amplified polymorphic DNA analysis in forty two isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Michoacan Mexico. A and B denote the two main groups determined; a1, a2, b1, and b2 are the subgroups.

Genetic Variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacan, Mexico

Y. Ochoa- Fuentes^{1*}, O. Martínez-de la Vega², V. Olalde-Portugal², J. Landeros-Flores¹, F. Hernández-Castillo¹, A. Flores-Olivas¹

¹Parasitology Department of Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro., Buenavista, Saltillo, Coah. CP 25315. Tel (844) 11-02-26

²Cuantitative Genetics and Ecological Biochemistry Laboratories. CINVESTAV-IPN, Irapuato, km 9.6 del Libramiento Norte, Carretera Irapuato- León, Irapuato, Gto. CP 36500. *Mail Contact (Fax: + 152 844 411 0226 E-mail:yisa8a@yahoo.com)

Abstract. Forty-two isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands, from 5 municipalities of Michoacan, Mexico were genetically analyzed using amplified fragment length polymorphisms (AFLP) to determine the genetic variability and the existing relationships among avocado *P. cinnamomi* isolates. The amplifications showed 296 bands. A genetic dissimilarity matrix was obtained in this trial by means of the multiple coupling coefficient and the hierarchical grouping method, also called non-weighted average method. The resulting dendogram showed two levels of association. The isolates were classified within two main groups associated with the geographical location from which they were obtained. The analysis and determination of the confidence levels demonstrated that these geographical groups are extremely strong.

Key words: AFLP, *Persea americana*, Avocado tristeza

INTRODUCTION

Phytophthora cinnamomi Rands produces tristeza in avocado trees, one of the most devastating diseases of avocado fruit tree (Zentmyer, 1980). This pathogen presents two sexual compatibility groups: A1 and A2 (Erwin et al., 1996; Alexopoulos, 1996). Sexual condition is a potential source of intra-specific variability in heterothallic species (Boccas et al., 1976). An alarming number of trees are currently suffering from *P. cinnamomi*, in Michoacan, Mexico. Conservative data establishes that five per cent of this fruit crop has been already damaged by the disease (Téliz, 2000), and this percentage is expected to increase.

Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) depend on the enzymes' recognition of the restriction sites in the DNA; the relationships among the number of initiating oligonucleotides' selective nucleotides and the genome's complexity (Lin and Kuo, 1995). Polymorphisms had already been used in the assessment of genetic diversity in barley (*Hordeum* sp.) (Pakniyat et al., 1997); tea (*Camellia* sp.) (Paul et al., 1997) and *Miscanthus* sp. (Greef et al., 1997). Besides their use in plant breeding, genome mapping and in populations' biology (Breyne et al., 1997), their strength stems from the simultaneously observed loci and their consistency.

At present, the genetic diversity of *P. cinnamomi* in Michoacan, Mexico has not yet been determined. Molecular trials such as AFLP are needed to clarify that question and to design control strategies.

The purpose of this essay was to determine the genetic variability and the existing relationships among the forty-two isolates of *P. cinnamomi* obtained from the main avocado producing areas in Michoacan, using AFLP.

METHODS AND MATERIALS

Forty two root and soil samples from avocado tree presenting symptoms of *P. cinnamomi* Rands were obtained from the municipalities of: Tancitaro, Periban, Salvador Escalante, San Juan Nuevo, and Uruapan in the state of Michoacan, Mexico. V-8-agar cultural medium was used to isolate and purify the pathogen from the root samples. The V-8-agar medium was prepared by mixing 2 g of CaCO₃ with 200 ml of V-8 juice, centrifuged at 3,500 rpm during 20 min 200 mL of the supernatant were diluted with 800 mL of sterile distilled water, 16 g of agar (Zentmyer et al., 1976) and 20 g of anhydrous dextrose were added to the mix, before leaving it at 24 °C ± 2 in the dark for 7 days.

The apple fruit method was used to isolate the pathogen from the soil samples. Three 3 cm deep holes were punched in an apple to put the soil samples inside. A cotton ball with sterile distilled water covered the hole to keep it wet. The apple peel was placed on top using an adhesive tape. After inoculation, the fruit was placed in plastic bags inside a wet chamber during 48 hours at 24 °C. The samples were checked every two days. The positive samples developed chestnut stains around the holes and they were used in the isolation and purification processes made on V-8-agar (Campbell, 1949; Róndon et al., 1988).

***P. cinnamomi* Identification**

The preparations obtained from the cultural medium were studied under the microscope and they were identified using morphological criteria (Erwin, 1996; Huberli, 1997). Once the determination was made, the material was multiplied using soil extract inoculations that enabled us to obtain a larger number of sporangia. (Ayers, and Zentmyer, 1971).

DNA extraction

DNA extraction was made by scraping the mycelia of *P. cinnamomi* developed in the clarified V-8 agar culture medium (20 % V-8, 0.2 % CaCO₃, 1.6 % of bacteriological agar and 2.0 % of anhydrous dextrose). DNA was extracted using Doyle's method (1990), as modified by Vazquez with sodium dodecyl sulfate (SDS) Promega Inc. 0.2 g of the mycelia were macerated with a ground rod before being re-suspended in 500 µL of buffer taken from the extraction (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM and SDS 2%). The suspension went into the vortex for 30 seg before being left on ice during 15 min. 500 µL of isoamyl chloroform alcohol 24:1 were added, stirred in the vortex and centrifuged at 12,000 rpm during 15 min. The mix rested on ice for 15 minutes before being centrifuged at 12,000 rpm during 10 minutes. The supernatant was discarded to recover the pellet. The pellet was re-suspended in 50 µL of sterile de-ionized water, adding 10 µL of RNase at 37 °C for 1 h. Finally, the right DNA concentration for the PCR reaction was determined, using 100 ng/µL.

AFLP Essay

The protocol used in the essay is similar to the protocol reported by Vos et al (1995), except for the use of markers with 700 and 800 nm fluor-meters in Eco initiators.

Digestion- Bonding of DNA.

Digestion was achieved with DNA samples at a concentration of 100 ng/ μ L. After checking their quality in agarose gels at 1 %, 1 μ L of diluted DNA from each sample was placed on a PCR plate following a previously determined arrangement. 8 μ L of sterile distilled water and 3.5 μ L of the mix (1 μ L of DNA at 100 ng/ μ L, 0.5 μ L of Eco RI at 10 U/ μ L, 0.5 μ L of Truq 1 at 10 U/ μ L, 2.5 μ L of Buffer RL) were added to every reaction. To achieve digestion, the mix was incubated at 37 °C for 2 h and 15 min; and at 70 °C to inactivate the enzyme, using a thermocycler GeneAmp[®] PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). The mix was stored at 4 °C.

Afterwards, 12.5 μ L of the bonding mix were added to every reaction, (1.0 μ L of Adapter Eco RI/ Eco RI (5 pmol), 1.0 μ L of Adapter Mse I/Mse I (50 pmol), 1.0 μ L of ATP (10 mM) pH 7, 9.0 μ L of Buffer RL (5X) and 0.5 μ L of T4 DNA ligase) and they were incubated at 20 °C for 2 h, inside the thermocycler. When the digestion (total bonding) process was completed, a dilution of 1:60 (2 μ L DNA + 118 water) was prepared and stored at -20 °C.

First Amplification

Initiators 5-GACTGCGTACCAATTC/A-1 (Eco RI) and 5-GATGAGTCCTGAGTAA/C-1 (MseI) were used in the first amplification, 2.5 μ L of digested-banded DNA (diluted 1:60) were placed in the PCR plate, along with 23 μ L of the mix, to obtain the amplification reaction (1.5 μ L de E + A (50 ng/ μ L), 1.5 μ L of M + C (50 ng/ μ L), 2.5 μ L of Buffer 10X (Mg), 0.5 μ L of Taq DNA polymerase (5U/ μ L), 2.5 μ L of DNTPs (10 mM) and 14.5 μ L of sterile water.

A thermocycler was used in the amplification process, according to the following schedule: 5-min cycle at 95 °C; 0.5 min at 94 °C; 1 min at 56 °C and 1 min at 72 °C, 20 5 –min cycles at 95 °C; 0.5 min at 94 °C; 1 min at 56 °C; 1 min at 72 °C and at 4 °C. A 1:60 dilution (2 μ l DNA + 118 μ l of water) of this pre-amplification reaction was prepared and stored at 4 °C and at –20 °C after the denaturalizing gel run was confirmed as positive.

Second Amplification.

The selective amplifications of this essay used 4 combinations of initiators (IRDye Fluorecent AFLP[®])(E-ACA700/M-CTC, E-ACC700/M-CAT, E-ACT800/M-CAT and E-ACG800/M-CTT . A blend for every combination was prepared (2.0 μ L of DNA template first amplification (Dil 1:60), 2.0 μ L of M + NNN (50 ng/ μ L), 0.5 μ L E + NNN 700 (50 ng/ μ L), 0.5 μ L of E + NNN 800 (50 ng/ μ L), 1.2 μ L of Buffer 10X, 0.1 μ L Taq DNA polymerase (5U/ μ L) and 4.8 μ L of sterile water).

The amplification reaction took place inside the thermocycler according to the following schedule: 5.minute hot start at 94 °C; 12 cycles of 0.5 min at 94 °C; 0.5 min at 65 °C and 1.0 min a 72 °C, lowering the alignment temperature by 0.7 °C in each cycle; 23

cycles of 0.5 min at 94 °C; 0.5 min at 56°C; 1 min at 72 °C and 4°C. The selective amplification products were submitted to a poly-acryl amide to denature them at 6.5 %, using the AFLP automatic sequencer (LI-COR SAGA MX software release 2.1).

20 mL of buffer KB^{plus} at 6.5 % (Acryl amide at 40 % , Urea 8 M and TBE) with 150 µl of an ammonium per-sulfate solution (APS) at 10 % and 15 µl TEMED (N,N,N,N,-Tetra-methyl ethyl diamine), that was poured immediately between the crystal plates with a syringe to avoid bubble formation. A shark-like comb was inserted, before clamping the pressure plates. Polymerization lasted 1 h.

The gel was treated for 20 min inside the Li-cor automatic sequencer before loading the samples, using buffer TBE 0.8 X. After that time, 0.4 µL of denatured DNA (5 min at 94 °C) were loaded already mixed with a blue dye buffer and a load of 6 X. Molecular weight markers of 50-700 bp and 50-800 bp were used. The Electrophoresis process lasted 2 h at the equipment's specified operating conditions.

The gel images were analyzed using software LI-COR SAGA MX release 2.1 for gel reading. The molecular weight bands of each marker were obtained to use them as reference when reading the polymorphic bands in each lane.

Data analysis

Windows S-plus professional software was used in the data analysis. A genetic dissimilarity matrix was obtained using the multiple coupling coefficient (Sneat and Sokal, 1973), also known as the Sckroch coefficient (Sckroch et al., 1992), followed by the hierarchical grouping method , UPGMA or non-weighted average method to produce a dendogram (Sneat and Sokal, 1973; Everit, 1993). Felsenstein's confidence

coefficients (Felsenstein, 1985) were obtained and used in the dendrogram nodes. The isolates' dissimilarity matrix was also obtained.

RESULTS AND DISCUSSION

Forty-two *P. cinnamomi* isolates were analyzed with AFLP, using four combinations of initiators. The analysis revealed 296 bands in total, ranging from 55 to 639 bp. Figures 2-5 show the profile of the amplifications obtained with the four combinations. The bands were classified either as monomorphic or as polymorphic; E-ACA700/M-CTC, E-ACC700/M-CAT, E-ACT800/M-CAT and E-ACG800/M-CTT produced 60.8 %, 72 %, 66 % and 34 % of the polymorphic bands, out of a total of 130, 67, 46 and 53 amplifications.

Four out of forty-two *P. cinnamomi* isolates in total were eliminated, since their sample analysis resulted in more than 20 % of lost data; yielding sixty bands with lost data. According to this criterion, subjects C5, C16, C22 and C30 were eliminated, 38 subjects with 296 bands were analyzed using Windows S-plus professional software. The data obtained from AFLP were used to produce a genetic dissimilarity matrix, using the multiple coupling coefficient (Sneath and Sokal, 1973), also called Sneath's coefficient (Sneath et al., 1992), followed by the hierarchical grouping method, UPGMA or non-weighted average method, to produce a dendrogram (Sneath and Sokal, 1973). The dendrogram showed two levels of association. Isolates were classified in two main groups and two small sub-groups associated with the geographical locations from which they were obtained. The analysis and determination of the confidence levels showed that these geographical groupings are extremely strong. In order to obtain Felsenstein's

confidence coefficients (Felsenstein, 1985), for the dendrogram nodes, a total of $B=1000$ re-samples were used. The reported dendrogram shows the percentage of times that a node is repeated in the $B=1000$ re-samples.

When comparing the population of *P. cinnamomi* in the five municipalities of Michoacan, Mexico, we observed the prevalence of geographical distribution in the relationship of isolates. Isolates from Uruapan, Tancitaro, Periban, San Juan Nuevo and Salvador Escalante remained clearly separated (Fig. 1). Based on the dendrogram analysis and the geographical origin of the isolates, two sub-groups were determined: a1 and b1.

Group A contains 100% of the isolates from Salvador Escalante, 84 % of the isolates from Periban; 56 % of the isolates from Tancitaro; 80 % of the isolates from San Juan and 67 % of the isolates from Uruapan. Group B contains 20 % of the isolates from San Juan Nuevo; 33 % of the isolates from Uruapan and 44 % of the isolates from Tancitaro (Fig. 1). 10 of the isolates from the sampling sites in group A come from similar climate conditions: an average altitude of 1950 above the sea level, moderate climate with summer rainfall; average rainfall of 900 mm and temperatures ranking from 7 to 38 °C; andosol humic-ochric slightly drained soil, used mainly in forestry and in agriculture to a lesser extent, with a predominance of coniferous woods with fir-spruce trees (oyamel) and junipers; as well as a mixed oak-pine trees wood (ASSEAM, 1998). The two dendrogram groups indicate a source of genetic variability resulting from sexual and asexual reproduction of the pathogen; since *P. cinnamomi* is an important root pathogen for a large number of hosts mainly found in forestry regions all over the world (Podger et al., 1972; Thorn et al., 1954; Shea, 1983; Zak y Campell, 1958; Zentmyer, 1980).

Sexual reproduction in *Phytophthora* species has had a significant influence in the population's genotypic diversity of these pathogens. For instance, the introduction of both compatibility groups of *Phytophthora infestans* within Europe, increased the genotypic diversity of this pathogen (Drenth et al., 1994). In that regard, *P. cinnamomi* isolates from South Africa presented significant genetic differences (Linde et al., 1997, 1999).

In populations of *P. infestans* around the world, genetic variation might not be totally attributed to sexual reproduction (Goodwin et al., 1994; Xu y Vilgalys, 1999). Genetic variability derived from mitotic recombination may account for phenotypic variability which suggests the expression *P. cinnamomi* clones in the world (Oudemans y Coffey, 1991). The hypothesis regarding the outstanding variation in Australian populations of *P. cinnamomi*, due to sexual and asexual reproduction has already been demonstrated by Dudzinski et al. 1993. The impact of genotypic and phenotypic variation of *P. cinnamomi* populations in the world is not yet clearly known; however, asexual reproduction is a prevailing variation mechanism in the pathogen populations. Huberli et al., (1997, 2001); showed a substantial phenotypic variation in a clonal line of *P. cinnamomi*, in populations that were 70 kms apart. This was the first study conducted on *P. cinnamomi* with a large number of isolates (73), in which genotypes and phenotypes varied greatly in populations that were close to each other.

The information obtained in this research work shows genetic variability of *P. cinnamomi* in avocado from the growing region of Michoacan, Mexico; an aspect that should be taken into account for future disease management works.

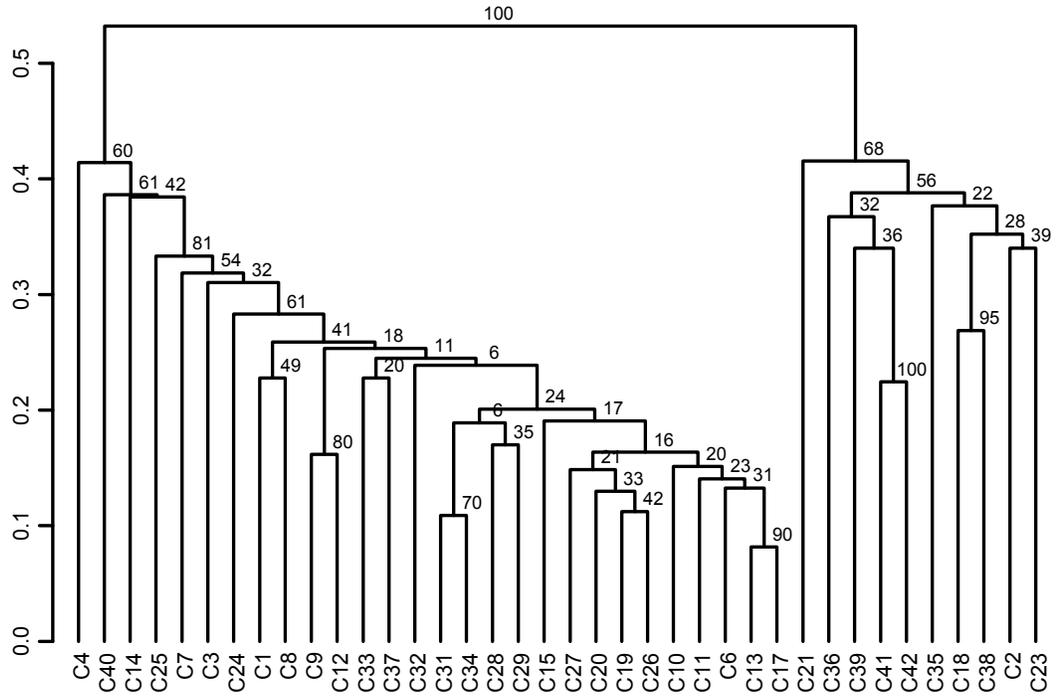


Figure 1. Amplified fragment length polymorphisms' dendrogram of *P. cinnamomi* from Michoacan, Mexico. Two main groups are shown: A and B.

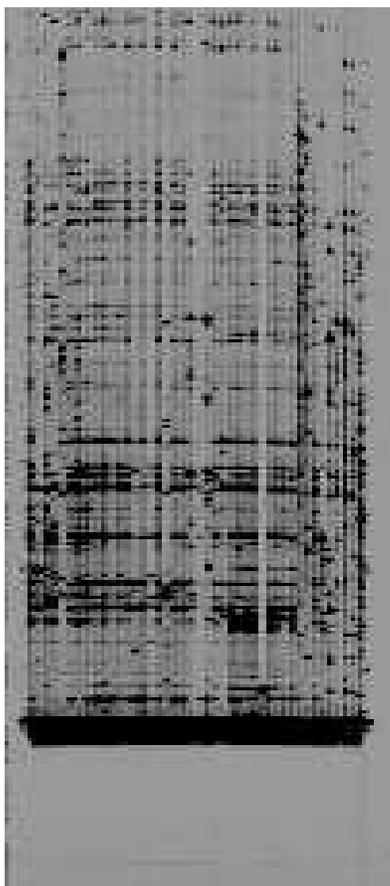


Figure 2. Band pattern obtained by amplified fragment length polymorphisms using a combination of initiator E-ACA700/M-CTC and a 50-700 bp marker.

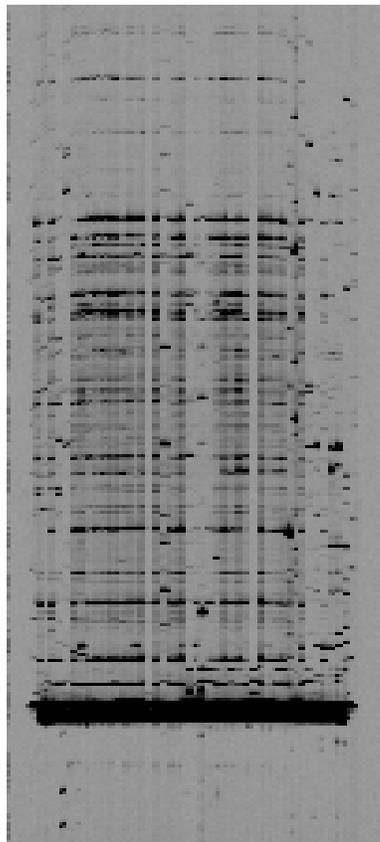


Figure 3. Band pattern obtained by amplified fragment length polymorphisms using a combination of initiator E-ACC700/M-CAT and a 50-700 bp marker.

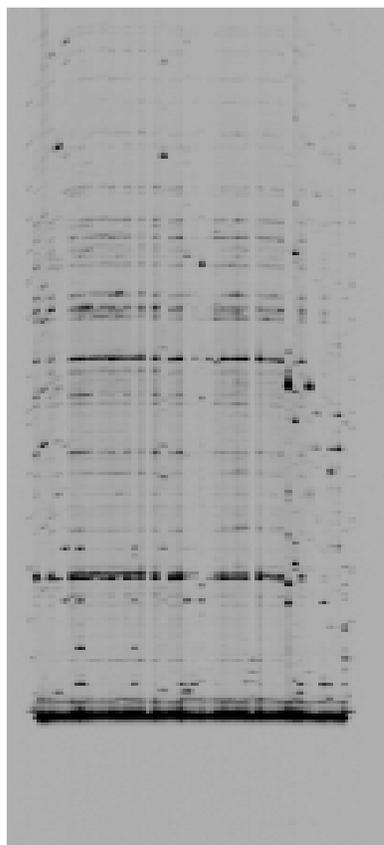


Figure 4. Band pattern obtained by amplified fragment length polymorphisms using a combination of initiator E-ACT800/M-CAT and a 50-800 bp marker.

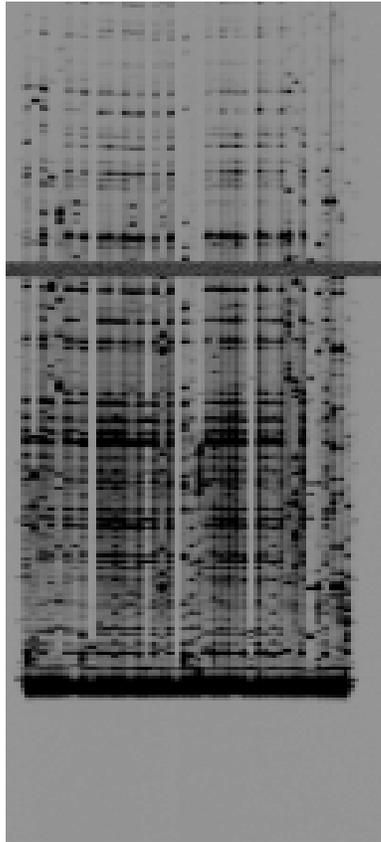


Figure 5. Band pattern obtained by amplified fragment length polymorphisms using a combination of initiator E-ACG800/M-CTT and a 50-800 bp marker.

REFERENCES CITED

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. 4th ed. 687-689, 717-723 pp.
- ASEEAM, 1998. El aguacate Mexicano: Producción y destino, Uruapan, Mich. 43 p
- Ayers, W. A., and Zentmyer, G. A. 1971. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
- Boccas, B., and Zentmyer, G.A. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 66:477-484.
- Breyne, P., Boerjan, W., Gerats, T., Van Montagu M and Van Gysel A 1997 Applications of AFLPTM in plant breeding, molecular biology and genetics; *Belg. J. Bot.* 129 107–117.
- Campbell, W.A. 1949. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil . *Plant Dis. Rep.* 33:134-135.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue; *Focus* 12 :13–15
- Drenth, A., Tas I.C.Q., and Grovers F. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing populations of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology.* 100: 97-107.
- Dudzinski, M. L., Old, K. M., and Gibbs, R. J. 1993. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany.* 17, 35-37.
- Erwin, D.C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide.* APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 269-276 pp.
- Everit, B.S. 1993. *Cluster analysis.* Ed. Arnold. London England.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- Goodwin, S . B., Cohen, B.A., and Fry, W.E.1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11591-11595.

Greef, J.M., Schondelmaier, J., Deuter M. 1997. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Aspects of Applied Biology*. 49: 231–235.

Huberli, D., Tommerup, L. C., Dobrowolski, M. P., Calver, C., and Hardy, J. G. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycol. Res.* 105 (9): 1053-1064.

Huberli, D., Tommerup, L.C and Hardy, G.E. 1997. The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycol Research*. 101: 1383-1388.

Lin JJ, Kuo J .1995. AFLP, a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17: 66-70.

Linde C, Drenth A, Kemp G. H. J., Winfield M. J. von Broembsen S. L. 1997. Populations structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology*. 87: 822-827.

Linde, C., Drenth, A., Wingfield, M. J. 1999. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *Eur. Journ. Plant. Pathol.* 105 (7): 667-680.

Oudermans, P. and Coffey, M. D. 1991. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*

Pakniyat, H., Powell W, Baird E. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* c. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. *Genome*. 40: 332-341.

Paul, S. Wachira F.N. Powell. W. Waugh R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) revealed by AFLP markers, *Theoretical and applied Genetics*, 94: 255-263.

Podger, F.D. 1972. *Phytophthora cinnamomi*, a cause of lethal disease in indigenous plant communities in Western Australia. *Phytopathology*. 62:972-981.

Róndon, A., Suárez, Z., Figueroa, M y Tellechea, V. 1988. Comportamiento de los Patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de Aguacate en Venezuela. *Fitopatología Venezolana*. 1:14-16

Shea, S.R., Shearer, B.L., Tippett, J.T. and Deegan, P.M. 1983. Distribution, reproduction and movement of *Phytophthora cinnamomi* on sites highly conducive to jarrah dieback in south western Australia. *Plant. Disease.* 67:970-973.

Skroch, P., J. Tivang and J. Nienhuis (1992). Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. Joint Plant Breeding Symposia, Minneapolis, Mn., Crop Science Society of America- American Society for Horticultural Science-American Genetic Association.

Sneath, P.H. A and R.R. Sokal.1973. Numerical Taxonomy . San Francisco, W.H. Freeman and Company.

Téliz, D. 2000.El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. 158-167 pp.

Thorn, W. A. , and Zentmyer G. A.1954. Hosts of *Phytophthora cinnamomi*.*Plant Dis. Rep.* 38:47-52

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.

Xu, J., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R. 1999. PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Mol. Ecol.* 8:59-73.

Zak., B., and Campell. W.A. 1958. Susceptibility of southern pines and other species to the littleleaf pathogen in liquid culture. *For. Sci.* 4: 151-161.

Zentmyer, G.A., Leary, J.V., Klure, L.J and Grantham, G.L. 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology.* 66: 982-986

Zentmyer, G.A., 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph. 10. The American Phytopathological Society. St. Paul , MN. 96 p.

Variabilidad Patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana*

Mill. de Michoacán, México

Alberto Flores-Olivas, Yisa María Ochoa-Fuentes, Francisco Daniel Hernández-Castillo, Eugenio Guerrero-Rodríguez, Jerónimo Landeros-Flores, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila México. CP 25315. Tel (844) 411-02-26; **Victor Olalde-Portugal**, CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, Laboratorio de Bioquímica Ecológica, km 9.6 del Libramiento Norte, Carretera Irapuato- León, Irapuato, Guanajuato Mexico. CP 36500. Correspondencia: yisa8a@yahoo.com.mx; aflooli@uaaan.mx

RESUMEN

Se seleccionaron ocho variantes genéticas de *Phytophthora cinnamomi*, obteniendo el inóculo a partir de cepas en crecimiento activo en medio de cultivo V-8 agar clarificado. Inoculando nueve plantas de aguacate, con cada una de las variantes genéticas y las plantas testigo fueron tratadas con agua destilada estéril. Se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad, esta última en base a una escala modificada. Los datos fueron analizados por medio del análisis multivariado utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System). Las pruebas de medias fueron realizadas por Tukey al 0.05. La incidencia de *P. cinnamomi* en las plantas de aguacate, presentó diferencia

significativa en la cepa C4 con respecto al testigo. Referente a severidad, de acuerdo al análisis se obtuvo que las cepas C6 , C7 y C8 provenientes de Uruapan y Peribán murieron al final del experimento; mientras que las cepas C3, C4 y C5 presentaron solamente daños severos y las cepas C1 y C2 de Salvador Escalante ambas presentaron un daño moderado; por lo que, este estudio demostró variabilidad patogénica que presentan cepas de *P. cinnamomi* obtenidas entre poblaciones a 60 km de distancia.

Palabras clave: Aguacate, tristeza del aguacatero, incidencia., severidad

INTRODUCCIÓN

Actualmente, México es el principal productor y consumidor de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el mundo, con una producción de 1,040,390 ton en una superficie de 102,467 ha (FAOSTAT, 2005). Siendo los estados con mayor producción: Michoacán, Nayarit, Morelos y el Estado de México, los cuales en 2003 contribuyeron con 82.8 % de la producción nacional. Siendo el primero de los anteriores el principal estado productor, con una superficie de 86,145 ha, lo que representa el 79 % de la producción total del país (SAGARPA-SIAT, 2004). En este estado los principales municipios productores son; Uruapan, Tancítaro, Peribán, San Juan Nuevo y Salvador Escalante; los que representan el 64 % de la superficie total plantada en el estado de Michoacán, es decir 55, 322 ha con una producción de 510,281 ton. Entre los problemas del frutal destacan por su importancia la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero provocada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, la cual es considerada como el principal problema de este cultivo a nivel mundial (Zentmyer y Ohr, 1978). Este fitopatógeno presenta gran capacidad destructiva y un amplio número de hospederos,

atacando más de mil especies de plantas (Zentmyer, 1980). A nivel mundial provoca pérdidas económicas en la mayoría de los países productores de aguacate. En California, se ha estimado que puede afectar entre 60 y el 75 % de las huertas causando una pérdida anual de aproximadamente 44 millones de dólares. Este patógeno ataca a todas las variedades de aguacate dañando las raíces, y ocasiona la muerte del árbol. (Coffey, 1992). En México se ha detectado la presencia de la tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras; destacando por la severidad de los daños, la región de Atlixco, Puebla, donde ha causado la muerte de miles de árboles, en la región productora de Michoacán, se considera que alrededor de 4,000 ha están afectadas por la enfermedad, y tiende a incrementarse (Téliz, 2000). En México, diversos factores han propiciado que la pudrición de raíz del aguacate ocasionada por *P. cinnamomi* alcance niveles epidémicos; por una parte, las características propias de la biología del alga que le confieren un gran capacidad infectiva y la actividad de explotación del cultivo que no siempre utiliza las técnicas de manejo apropiadas para la disminución del riesgo de contaminación (Ochoa, 2000). La enfermedad aparece cuando el patógeno entra en actividad al presentarse un drenaje deficiente, o bien, en suelos relativamente bien drenados en los que se aplican riegos excesivos; la pudrición afecta tanto a las plantas de vivero como a los árboles establecidos de diferente edad. (Brom , 1970). Actualmente, la diversidad patogénica de *P. cinnamomi* en Michoacán, no ha sido determinada, por lo que se requieren realizar estudios que determinen la patogenicidad de variantes genéticas, obtenidas de la región y de esta manera planear estrategias de control. El objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad patogénica de ocho variantes genéticas de *P. cinnamomi* aisladas de las principales áreas productoras de aguacate de Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados. Ocho variantes genéticas de *P. cinnamomi* determinadas por AFLP, fueron obtenidas en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad, provenientes de plantas de aguacate de los municipios de Peribán, Tancítaro, San Juan Nuevo , Uruapan y Salvador Escalante, municipios del estado de Michoacán. Los aislados fueron purificadas por punta de hifa en medio de cultivo V-8 agar adicionado con dextrosa.

Producción de inóculo. La preparación de inóculo se realizó replicando las ocho variantes genéticas en cajas de Petri con medio de cultivo V8 agar clarificado, con 10 repeticiones por cada uno de los aislados, se incubaron a 18 °C en oscuridad por siete días, obteniendo una abundante cantidad de micelio, una vez que las cajas se llenaron con el micelio del patógeno, se tomaron cinco explantes de 1 cm de diámetro de los medios de cultivo con los aislados y se colocaron en tubos de ensaye de 20 mL adicionando 10 mL de agua destilada estéril, enseguida los tubos se incubaron en oscuridad a 18° C por cinco días. Para determinar la concentración de zoosporas se agitaron los tubos en un vortex por 30 seg, para posteriormente hacer el conteo en el hemacitometro, este procedimiento se realizó para cada una de las variantes genéticas.

Inoculación e incubación. La inoculación se realizó el 14 de febrero de 2005, para la cual se utilizaron 81 plantas de aguacate de seis meses de edad de la variedad Hass, provenientes de un vivero certificado. Las plantas fueron inoculadas en la base del tallo, con 200 mL de una suspensión de zoosporas a una concentración de 1×10^6 zoosporas / mL obtenidas de las variantes genéticas de *P. cinnamomi* ; las plantas testigo fueron

tratadas con agua destilada estéril, después de la inoculación las plantas fueron colocados a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Variables a evaluar. Se determinó la incidencia de plantas enfermas considerando el porcentaje de las nueve plantas observadas por cada aislado. La severidad de la enfermedad se evaluó en base a la escala propuesta por Zentmyer (1984), donde; 0= planta sana; 1= daño leve (planta achaparrada con inicio de clorosis 1/3 del área foliar); 2= daño medio (planta achaparrada, con 2/3 del área foliar clorótica); 3= daño severo (planta achaparrada, con 100 % del área foliar clorótica); 4= daño muy severo (planta muerta). Se determinó el porcentaje de pudrición de raicillas, número de hojas, altura, diámetro de planta y número de lesiones. La presencia de *P. cinnamomi* en las plantas enfermas se verificó mediante aislamientos realizados cada seis semanas de las raicillas de las plantas con síntomas de la enfermedad, extrayendo trozos de raíces de la zona del avance del patógeno, estableciendo el porcentaje de raíz infectada por *P. cinnamomi*. En el proceso de aislamiento, las raíces de la planta se lavaron con agua corriente, se tomaron segmentos de 1 cm de longitud y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % por 30 seg. Las raíces se enjuagaron con agua destilada estéril por dos ocasiones y el exceso de agua se eliminó con papel absorbente. Los trozos desinfectados se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo V-8 agar clarificado; la identificación de el patógeno se llevó a cabo por criterios morfológicos (Erwin y Ribeiro, 1996; Huberli, 1997).

Análisis de datos. Los datos fueron analizados por medio del análisis multivariado donde se compararon factores de desarrollo contra variante genéticas utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System). Las pruebas de medias fueron realizadas por Tukey al 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas que presentaron las plantas enfermas fueron; clorosis progresiva, necrosis de los márgenes de las hojas para terminar en una necrosis generalizada, las raíces de las plantas enfermas se encontraban necrosadas con fácil desprendimiento de la corteza. Los aislamientos de raíces de plantas con síntomas de la enfermedad, mostraron la presencia de *P. cinnamomi* de forma consistente. En general la incidencia de *P. cinnamomi* en las plantas de aguacate, presentó diferencia significativa en el aislado 4 con respecto al testigo. El aislado 4 de Tancítaro fue la que mayor incidencia presentó a los 42 días de inoculación; sin embargo, a los 126 días se observó que todas las plantas en estudio en estudio alcanzaron 100 % de incidencia, (Cuadro 1); la severidad en el resto de las plantas inoculadas por los diferentes aislados, mostraron los valores más altos en las de Uruapan y Peribán con un promedio de 3.17, 2.44 y 2.93 respectivamente en la escala de Zentmyer (1984), permaneciendo los aislados 1 y 2 provenientes de Salvador Escalante como la localidad con menor daño evaluado con 1.42 y 1.43 en la escala utilizada (Cuadro 2). Referente a severidad, de acuerdo al análisis estadístico se obtuvo que las plantas inoculadas con los aislados C6 , C7 y C8 provenientes de Uruapan y Peribán murieron al final del experimento, 126 días después de la inoculación; mientras que las plantas inoculadas con los aislados C3, C4 y C5 presentaron solamente daños severos y las inoculadas con los aislados C1 y C2 de Salvador Escalante presentaron daño moderado (Cuadro 2). Las plantas testigo no presentaron síntomas y *P. cinnamomi* no fue aislada de estas, lo que implica que, la variación en patogénesis es amplia dentro de los grupos de compatibilidad sexual de *P. cinnamomi*, lo que concuerda con lo que señala diversos autores (Dudzinski et al., 1993;

Tommerup et al., 1997; Tommerup 1998; Huberli et al., 2000). La variabilidad en la agresividad de *P. cinnamomi* es amplia Huberli (2001), indica que existen tres tipos de respuesta: la primera de ellas presenta aislados con alta capacidad para matar plantas a los 54 días después de la inoculación; la segunda plantas que murieron a los 106-177 días, los cuales fueron considerados intermedios en su patogenicidad y la tercera agrupa aislados que no inducen muerte a la planta y fueron considerados no patogénicos. Nuestro estudio demostró la variación de *P. cinnamomi*, esta variación ocurrió en poblaciones a 60 km de distancia, la considerable variación en patogenicidad ha sido reportada en Australia (Dudzinski, 1993) Francia (Robin , 1998) y Sudáfrica (Linde et al., 1999) en colecciones nacionales de aislados; aunque Dudzinki et al. (1993) demostró la variabilidad en aislados locales, quien encontró una diferencia de 2.3 veces en la capacidad de provocar la muerte a las plantas de 18 aislados A2 provenientes de Australia comparado con aislados locales que dieron una diferencia de 5 veces, lo que concuerda con los resultados del presente estudio.

Para el parámetro pudrición de raíces (Cuadro 3), las plantas de aguacate cv Hass evaluadas, muestran diferencia de medias indicando claramente el efecto significativo de la inoculación de las plantas con el aislado C4 con 54.5 % respecto al testigo (1.25 %). Para el parámetro número de lesiones (Cuadro 3), las plantas de aguacate cv Hass evaluadas, muestran diferencia de medias indicando claramente el efecto significativo de la inoculación de las plantas con el aislado C4 con 8.08% respecto al testigo (0.66%). Para el parámetro número de hojas, la separación de medias $P=0.05$ muestra diferencias significativas en los aislados C3, C5, C6, C7, C8, los que varían de 28.19 a 30.13 donde se incluye al testigo en comparación con el C4 que presenta el menor número de hojas,

con respecto al resto de los aislados, el número de hojas es un parámetro importante ya que estas son la fábrica de los fotosintatos de la planta, y su disminución conlleva una menor disponibilidad de nutrimentos para su crecimiento. En altura de planta, la separación de medias muestra diferencia significativa entre los aislados C4 y C5; con respecto al testigo (Cuadro 3). En diámetro del tallo de las plantas, la separación de medias Tukey al 0.05 muestra igualdad con los aislados C3 y testigo y diferencias con los aislados C1, C4, C5, C6 y C8. Al respecto el crecimiento de la parte aérea de la planta depende en gran medida del crecimiento radicular, por lo que al existir un daño a las raíces causado por *P. cinnamomi*, expresado en pudrición radicular disminuye la superficie de captación de agua y nutrimentos, por lo que disminuye el crecimiento aéreo, lo que conlleva a un reducido crecimiento característico de la enfermedad (Wager, 1942), en este sentido Ploetz y Shaffer (1992) encontraron que el intercambio de gases disminuye en plantas con pudriciones de raíces, lo que explica la reducción del crecimiento, ya que al disminuir el intercambio de gases disminuye la fotosíntesis y el metabolismo se hace lento.

LITERATURA CITADA

Coffey, M.D. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. In Plant. 22: 423-444 pp.

Brom, R.E. 1970. Pudrición de la raíz del aguacate. El Aguacate. 283-284 pp.

Dudzinski, M.L., Old, K. M and Gibbs, R.J. 1993. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. Australian Journal of Botany. 17:35-37.

Erwin, D.C and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minesota. USA. 269-276 pp.

Galindo, A.J. and Zentmyer, G.A. 1964. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 54:238-239.

Huberli, D., Tommerup, L.C., and Hardy, G.E. 1997. The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. Mycol Research. 101: 1383-1388.

Huberli, D., Tommerup, L. C., Dobrowolski, M. P., Calver, C., and Hardy, J. G. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. Mycol. Res. 105 (9): 1053-1064.

Huberli, D., Tommerup, L. C and Hardy, J. G. 2000. How variable are morphological and pathological phenotypes among *Phytophthora cinnamomi* isolates from two localized populations in Western Australia (to be submitted to Mycological Research).

Huberli, D., Tommerup, L. C., Hardy, J. G and Colquhoun, I. J. 1998. Temperature changes resistance of *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. Seventh International Conference of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland. P. 2.5.4.

Linde, C., Drenth, A., and Wingfield, M. J. 1999. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. Eur. Journ. Plant. Pathol. 105 (7): 667-680.

Menge, J.A. and Ploetz. R. 2002. Diseases of avocado. In Diseases of Tropical and Subtropical Fruit Crops. R. Ploetz (ed.) CABI Publishing, Oxford. 50 pp. (In Press)

Menge, J.A. and Marais L.J. 2002. Strategies to control *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Subtropical Fruit News 10: (In Press).

Ochoa, S.A. 2000. Mecanismos de diseminación de *Phytophthora cinnamomi*. resumen de la ponencia presentada por el autor en el IV congreso mundial del aguacate. Uruapan Michoacán México.

Ploetz, R.C., and Schaffer, B.1992. Effect of flooding and *Phytophthora* root rot on net gas exchange of avocado in Dade County Florida. Proceedings of Second World Avocado Congress, Orange, California, U.S.A. 111-117 pp.

Robin, C. and Desprez- Loustau, M.L. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Plant Pathology 104: 465-475.

Róndon, A., Suárez, Z., Figueroa, M y Tellechea, V. 1988. Comportamiento de los Patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de aguacate en Venezuela. Fitopatología Venezolana. 1:14-16

Shearer, B.L., Michaelsen, B.J. and Somerford, P.J. 1988. Effects of isolate and time of inoculation on invasión of secondary phloem of *Eucalyptus* spp. and *Banksia grandis* by *Phytophthora* spp. Plant Disease. 72:121-126.

Teliz, O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado en Michoacán. Editorial Mundi Prens. México. 240 p.

Tommerup, I. C. 1998. Diseases wich disrupt natural ecosystems. Seventh International Conference of Plant Pathology. Edinburgh, Sccotland p. 4.4.1S.

Tommerup, I. C., Hardy, J. G., Huberli, D. and Colquhoun, I. J. 1997. Selecting plants resistant to *Phytophthora cinnamomi*. Eleventh Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference. 89 p.

Wager, V.A.1942. *Phytophthora cinnamomi* and wet soil in relation to the dying-back of avocado trees . Hilgardia 14(9):519-532.

Zentmyer, G.A. 1984. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. 69: 89-94.

Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph # 10, Amer. Phytopath. Soc. 96p.

Zentmyer, G.A. and Ohr, H.D. 1978. Avocado root rot. Div. Agric. Serv., Univ. of Calif., Leaflet 2440.

Cuadro 1. Incidencia de ocho variantes genéticas de *Phytophthora. cinnamomi* en aguacate cv Hass a diferentes fechas de Inoculación.

Cepa	Incidencia				Promedio	
	42 ddi	84 ddi	126 ddi			
¹ Cepa 1	22.22	66.66	100	62.96	AB ^z	
¹ Cepa 2	22.22	66.66	100	62.96	AB	
² Cepa 3	33.33	66.66	100	66.66	AB	
³ Cepa 4	77.77	100	100	92.59	A	
³ Cepa 5	22.22	100	100	74.07	AB	
⁴ Cepa 6	44.44	83.00	100	74.00	AB	
⁵ Cepa 7	66.66	100	100	88.80	AB	
⁴ Cepa 8	33.33	100	100	77.70	AB	
Testigo	0	0	0	0	B	

1.- Salvador Escalante; 2.- San Juan Nuevo; 3.- Tancitaro; 4.-Uruapan; 5.- Periban

^z.- Medias con la misma letra no son diferentes significativamente, Tukey p=0.05.

ddi- días después de la inoculación

Cuadro 2. Severidad de ocho variantes genéticas de *Phytophthora. cinnamomi* en aguacate cv Hass a diferentes fechas de inoculación .

Cepa	Severidad (Zentmyer, 1984)*			
	42 ddi	84 ddi	126 ddi	Promedio
¹ Cepa 1	1.00	1.25	2.00	1.42 AB ^z
¹ Cepa 2	1.00	1.00	2.30	1.43 AB
² Cepa 3	1.00	1.25	3.00	1.75 AB
³ Cepa 4	1.00	2.00	3.30	2.10 AB
³ Cepa 5	2.00	2.40	3.00	2.46 AB
⁴ Cepa 6	2.28	3.25	4.00	3.17 A
⁵ Cepa 7	1.16	2.50	3.66	2.44 AB
⁴ Cepa 8	2.30	2.50	4.00	2.93 A
Testigo	0	0	0	0 B

*Escala de Zentmyer para determinar severidad

1.- Salvador Escalante; 2.- San Juan Nuevo; 3.- Tancítaro; 4.-Uruapan; 5.- Periban

^z.- Medias con la misma letra no son diferentes significativamente, Tukey p=0.05.

ddi- días después de la inoculación

Cuadro 3. Promedio de muestreos del diámetro, número de hojas, altura de planta, número de lesiones y por ciento de pudrición de raíz por *Phytophthora cinnamomi* en plantas de aguacate cv Hass.

Cepas	Pudrición ^x (%)	Número de hojas ^y	Altura de planta ^y (cm)	Diámetro de tallo ^y (cm)	Número de lesiones Radiculares ^x
C1	19.33 AB	27.50 AB	33.75 AB	0.70 DE	4.25 AB
C2	25.41 AB	27.69 AB	32.25 ABC	0.78 BCD	4.25 AB
C3	34.42 AB	29.81 A	33.81 AB	0.83 AB	5.08 AB
C4	54.50 A	23.44 B	31.25 A	0.73 CDE	8.08 A
C5	29.33 AB	28.19 A	31.88 BC	0.72 CDE	4.66 AB
C6	31.00 AB	28.75 A	32.88 ABC	0.70 DE	4.25 AB
C7	31.25 AB	30.13 A	33.44 ABC	0.79 BC	4.83 AB
C8	40.66 AB	28.63 A	32.63 ABC	0.69 C	5.66 AB
Testigo	1.25 B	30.06 A	34.437 B	0.89 A	0.66 B

* Prueba de medias de Tukey a 0.05

^z- Medias con la misma letra no son diferentes significativamente

^x- Tres muestreos

^y- Cuatro muestreos

CONCLUSIONES GENERALES

- En la región productora de aguacate de Michoacán, México se encuentran presentes los dos grupos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora cinnamomi*.
- El grupo de compatibilidad sexual A1 se encuentra en los municipios de Tancítaro, San Juan y Uruapan.
- Este es el primer reporte del grupo de compatibilidad sexual A1 de *P. cinnamomi* en México.
- Existe variabilidad genética de *P. cinnamomi* en aguacate de la región productora de Michoacán, la cual se asocia con la localización geográfica, altitud y tipo de suelo.
- Los municipios que presentaron mayor variabilidad fueron Uruapan y Tancítaro, ya que estos presentan un mayor número de microclimas.
- La variación en patogénesis fue amplia dentro de los grupos de compatibilidad sexual.

- Los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 fueron patogénicos ya que ambos causaron la muerte a las plantas de aguacate.
- Este estudio demostró la variabilidad genética y patogénica que presentan cepas de *P. cinnamomi* obtenidas de poblaciones a 60 km de distancia.

LITERATURA REVISADA

- Agrios, N.G. 1988. Plant pathology . Third edition. Academic Press Inc. California. 19-36 y 317-324 pp.
- Alexopoulos. C. J., C.W. Mims., M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. 4th ed. 687-689, 717-723 pp.
- ASEEAM, 1998. El aguacate Mexicano: Producción y destino, Uruapan, Michoacán. 43 p
- Ashby, S. F. 1929. Further note on the production of sexual organs in paired cultures of species and strains of *Phytophthora*. Trans. Br. Mycol. Soc. 14:254-260.
- Assigbetse, K. B., D. Fernandez, M. P. Dubois, and J. P. Geiger. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Phytopathology. 84: 622-626.
- Ayers, W.A. and Zentmyer, G.A. 1971. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 61:1188-1193.
- Barrett, J.T. 1948. Induced oospore production in the genus *Phytophthora*. (Abstr.) Phytopathology 38:2.
- Bartnicki-Garcia, S. and Wang, M. C. 1983. Biochemical aspects and morphogenesis in *Phytophthora* Jin: Erwin, D.; Bartnicki-Garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press. 121-137 pp.
- Beson, D. M. 1982. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 72 (5): 560-563.
- Boccas, B., and Zentmyer, GA. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 66: 477-484.
- Brassier, C.M. 1971. Induction of sexual reproduction in single A2 isolates of *Phytophthora* species by *Trichoderma viride*. Nature (London) New Biol. 10:231-283.

- Brasier, C.M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: Genetic system, sexuality and the germination of variation. *Annu. Rev. Phytopathology*. 30: 153-171.
- Breyne P., Boerjan W., Gerats T., Van Montagu, M., and Van Gysel A 1997 Applications of AFLP™ in plant breeding, molecular biology and genetics; *Belg. J. Bot.* 129 107–117.
- Brom, R.E. 1970. Pudrición de la raíz del aguacate. *El Aguacate*. 283-284 pp.
- Campbell, W.A. 1949. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil . *Plant Dis. Rep.* 33: 134-135.
- Cantino, E.C. and G.F. Turian. 1959. Physiology and development of lower fungi (Phycomycetes). *Annu. Rev. Microbiol.* 13:97-124.
- Chang, T.T., Yang, W.W., Wang, W.Y.1996. Use of random amplified polymorphic and markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 37: 165-171.
- Cohen, M. 1950. Direct observation of formation of sexual bodies by combination of hyphae of two *Phytophthora* isolates. *Phytopathology* 40:5-6
- Coffey, M. D. 1991. Cause and diagnosis avocado root rot. *California Grower* 15(3): 17-23
- Coffey, M.D. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. In *Plant*. 22: 423-444 pp.
- Crowhurst, R. N., Hawthorne, B. T., Rikkering, E. H. A., and Templeton, M. D. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 20: 391-396.
- Deahl, K. 1996. Life history of the fungus. In: North American potato late blight workshop. Tucson, Arizona. USA. 30-33 pp.
- Doyle, J.J and Doyle, J.L 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue; *Focus* 12: 13–15
- Drenth, A., Tas ICQ., and Grovers F. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing populations of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*. 100: 97-107.
- Dudzinski, M.L., Old, K. M and Gibbs, R.J. 1993. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*. 17:35-37.

- Durbin, R. D. 1959. Factors affecting the vertical distribution of *Rhizoctonia* with special reference to CO₂ concentration. *American Journal of Botany* 46(1): 22-25
- Erwin, D.C., and O. K. Ribeiro, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minnesota. 269-276 pp.
- Everit, B.S. 1993. Cluster analysis. Ed. Arnold, London, England. 356 p
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- Franquee, A.H., Nelson., and Marx D.H. 1964. Morphologic and physiological characteristics of the mating type of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 54: 823-825.
- Galindo, A. J. and Zentmyer, G. A. 1964. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*. 54:238-239.
- Galindo, A. J. and Zentmyer, G. A. 1967. Genetical and cytological studies of *Phytophthora* strains pathogenic to pepper plants. *Phytopathology*. 57:1300-1304.
- Galindo A.J. and M.E. Gallegly. 1960. The Nature of Sexuality in *Phytophthora infestans* *Phytopathology* 50: 123-128.
- Gallegly, M.E. and J.J. Eichenmuller. 1959. The spontaneous appearance of the potato race 4 character in cultures of *Phytophthora infestans*. *Am. Potato Journ.* 36:45-51.
- Gallegly, M.E. and Galindo. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in México. *Phytopathology*. 48: 274-277.
- Gisi, U., Zentmyer, G. A and Klure, L. J. 1980. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora palmivora* in soils at different matric potentials. *Phytopathology*. 70 (4): 301-306.
- Goodwin, P. H. and S. L. Annis. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2482-2486.

- Goodwin, S.B., Cohen, B.A., and Fry, W.E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish Potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11591-11595.
- Grajal-Martin, M. J., C. J. Simon, and F. J. Muehlbauer. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology.* 83: 612-614.
- Greef J.M, Schondelmaier J, Deuter M. 1997. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Aspects of Applied Biology* 49: 231–235.
- Guthrie, P. A. I., C. W. Magill, R. A. Frederiksen, and G. N. Odvody. 1992. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Collectotrichum graminicola*. *Phytopathology.* 82: 832-835.
- Haemmerli, U. A., U. E. Brändle, O. Petrini, and K. M. McDermott. 1992. Differentiation of isolates of *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*) from beech, chestnut, and oak using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 479-483.
- Haasis, F. A. and Nelson, R. R. 1963. Studies on the biological relationship of species of *Phytophthora* as measured by oospore formation in intra and interspecific crosses. *Plant Disease Reporter.* 47(8): 705-709.
- Ho, H. H. and Zentmyer, G. A. 1977. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 69:701-713.
- Holh, H.R. 1991. Nutrition. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. *Advances in Plant Pathology.* Eds. D .S. Ingram y P.H. William. Academic Press. 53-84 pp.
- Howatt, J.L. and P.N. Grainer. 1955. Some new findings concerning *Phytophthora infestans* (Mont) de By. *American Potato Journal.* 32: 180-188.
- Huberli, D., Tommerup, L.C., and Hardy, G.E. 1997. The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycol Research.* 101: 1383-1388.
- Huberli, D., Tommerup, L. C., Hardy, J. G and Colquhoun, I. J. 1998. Temperature changes resistance of *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. *Seventh International Conference of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland.* P. 2.5.4.

- Huberli, D., Tommerup, L. C and Hardy, J. G. 2000. How variable are morphological and pathological phenotypes among *Phytophthora cinnamomi* isolates from two localized populations in Western Australia (to be submitted to Mycological Research).
- Huberli, D., Tommerup, L. C., Dobrowolski, M. P., Calver, C., and Hardy, J. G. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. Mycol. Res. 105 (9): 1053-1064.
- Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: Evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. J.Gen.Microbiol.107: 15-18.
- Ko, W. H., Chang, H. S., and Su. H. J. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71:496-499.
- Kuan, T. L. and Erwin, D. C. 1980. Predisposition effect of water saturation of soil on *Phytophthora* root rot of alfalfa. Phytopathology 70 (10): 981-986.
- Leach, S.S and A.E. Rich. 1969. The possible role of parasexuality and cytoplasmic variation in race differentiation in *Phytophthora infestans*. Phytopathol. 59: 1360-1365. St. Paul, Mn., USA.
- Lin JJ, Kuo J .1995. AFLP, a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus 17: 66-70.
- Linde C, Drenth A, Kemp G.H.J, Wingfield M.J, Von Broembsen S.J. 1997. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology* 87,822-827.
- Linde, C., Drenth, A., Wingfield, M. J. 1999. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. Eur. Journ. Plant. Pathol. 105 (7): 667-680.
- Linde, C., Soo, S.H., Drenth, A. 2001. Sexual recombination in *Phytophthora cinnamomi* in vitro and aggressiveness of single oospore progeny to Eucalyptus. Plant. Pathol.50: 97-102.
- Malcolmson, J.F. 1970. Vegetative hybridity in *Phytophthora infestans*. Nature (London) 225: 971-972.
- McDonald, B.A. 1989. The population biology of host-pathogen interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 27:77-94.

- Menge, J.A. and Ploetz. R. 2002. Diseases of avocado. In Diseases of Tropical and Subtropical Fruit Crops. R. Ploetz (ed.) CABI Publishing, Oxford. 50 pp
- Menge, J.A. and Marais L.J. 2002. Strategies to control *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Subtropical Fruit News 10.
- Mills, W. R. and L. C. Peterson. 1952. The development of races of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary on potato hybrids. (Abstr.) Phytopathol 42:26. St Paul, Mn., USA.
- Mircetich, S. M. and Zentmyer, G. A. 1967. Existence of *Phytophthora cinnamomi* as chlamydospores and oospores in roots and soil. California Avocado Society Yearbook 51 :117-124.
- Mitchell, D. J. and Zentmyer, G. A. 1971. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* spp. Phytopathology 61 (7): 807-812
- Mosa, A.A., K. Kobayashi and A. Ogoshi. 1993. Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. Plant Pathology. 42:26-34.
- Muñiz V.J.A. 1998. Identificación de compatibilidad sexual y genes de virulencia de *Phytophthora infestans* (Mont) By y Evaluación de resistencia en 18 materiales a los tizones tardío y temprano de papa en la región de Coahuila y Nuevo León. Tesis UAAAN Buenavista, Saltillo Coahuila, México 60p.
- Ochoa, S.A. 2000. Mecanismos de disseminación de *Phytophthora cinnamomi*. resumen de la ponencia presentada por el autor en el IV congreso mundial del aguacate. Uruapan Michoacán México.
- Old K.M. Moran G.F, Bell J.C. 1984. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. Canadian Journal of Botany. 62: 2016-2022.
- Old K.M. Dudzinski M.J, Bell J.C.1988. Isoenzyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. Australian Journal of Botany. 36:355-360.

- Oudermans, P. and Coffey, M. D. 1991. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*
- Pakniyat, H. Powell W, Baird E. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* c. Koch) with reference to SALT tolerance and associated ecogeography. *Genome*. 40: 332-341.
- Paul, S. Wachira F.N. Powell. W. Waugh R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) revealed by AFLP markers, *Theoretical and applied Genetics*. 94: 255-263.
- Ploetz, R.C., and Schaffer, B.1992. Effect of flooding and *Phytophthora* root rot on net gas exchange of avocado in Dade County Florida. *Proceedings of Second World Avocado Congress, Orange, California, U.S.A.* 111-117 pp.
- Podger, F.D. 1972. *Phytophthora cinnamomi*, a cause of lethal disease in indigenous plant communities in Western Australia. *Phytopathology*. 62:972-981.
- Reeves, J.R., and Jackson, R.M. 1974. Stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* by damage. *J. Gen. Microbiol.* 84: 303-310.
- Reeves, R. J. and Jackson, R. M. 1972. Induction of *Phytophthora cinnamomi* oospores in soil by *Trichoderma viride*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 59:156-159.
- Ritch, D.L. 1991. *Phytophthora infestans* in Poland from 1987-1989. Nuclear DNA content, mating type and response to metalaxyl. *Phytopathology* 81: 1190.
- Robertson, N.F. 1991. The challenge of *Phytophthora infestans*. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Eds. D.S. Ingram and P.H. Williams. *Advances in Plant Pathology*, Vol. 7. Academic Press. 1-30 pp.
- Robin, C. and Desprez- Loustau, M.L. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 465-475.
- Romero, S., y Erwin, D. C. 1969. Variation in pathogenicity among single oospore cultures of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 59: 1310-1317.
- Royle, D. J. and Hickman, C. J. 1964. Observations on *Phytophthoracinnamomi*. *Canadian Journal of Botany*. 42: 311-318.
- Róndon, A., Suárez, Z., Figueroa, M y Tellechea, V. 1988. Comportamiento de los Patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de aguacate en Venezuela.

- Savage, E. J., Clayton, C. W., Hunter, J.A. Brenneman., Laviola C, y Gallegly. M.E. 1968. Homothallism, heterothallism, and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology*. 58: 1004-1021.
- Schäfer, C. and J. Wöstemeyer. 1992. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *J. Phytopathol.* 136: 124-136.
- Shaw, D. S. 1991. Genetics. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Eds. D.S. Ingram and P.H. Williams. *Advances in Plant Pathology Vol. 7* Academic Press 131-170 pp.
- Shea, S. R. 1975. Environmental factors of the northern jarrah forest in relation to pathogenicity and survival of *Phytophthora cinnamomi*. Perth, For. Dep. 83 p. (Bull, 85)
- Shearer, B.L., Michaelsen, B.J. and Somerford, P.J. 1988. Effects of isolate and time of inoculation on invasion of secondary phloem of *Eucalyptus* spp. and *Banksia grandis* by *Phytophthora* spp. *Plant Disease*. 72:121-126.
- Shea, S.R., Shearer, B.L., Tippett, J.T. and Deegan, P.M. 1983. Distribution, reproduction and movement of *Phytophthora cinnamomi* on sites highly conducive to jarrah dieback in south western Australia. *Plant. Disease*. 67:970-973.
- Skroch, P., J. Tivang and J. Nienhuis .1992. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. Joint Plant Breeding Symposia, Minneapolis, Mn., Crop Science Society of America- American Society for Horticultural Science-American Genetic Association.
- Smoot, J.J., F.J. Gough, H.A. Lamey, J.J. Eichenmuller, and M.E. Gallegly. 1958 Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathol.* 48: 165-171.
- Sneath, P.H. A and R.R. Sokal.1973. *Numerical Taxonomy* . San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- Spielman, L.J., W.K. Gu and W.E. Fry. 1990. Genetic relationships among *Phytophthora infestans* populations from Europe, North America and Japan. (Abstract) *Phytopathology* 80:1006.
- Stack, J. P., and Millar, R.L. 1985. Relative survival potential of propagules of *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*. *Phytopathology*. 75: 1398-1404.

- Stamps, D.J.1953. Oospore production in paired cultures of *Phytophthora* species. Trans. Br. Mycol. Soc. 36:255-259.
- Téliz, D., R. García.1982. Manejo Integrado de la tristeza del aguacatero X Congreso Nacional de Fitopatología. SMF. Resumen 55.
- Téliz, D., A. Mora, C. Velásquez, R. García, G. Mora, P. Rodríguez., J. Etchevers., and S. Salazar.1992. Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. Proc. Of Second World Avocado Congress: 79-87.
- Teliz, O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado en Michoacán. Editorial Mundi Prensa. México. 240 p.
- Thorn, W. A. , and Zentmyer G. A.1954. Hosts of *Phytophthora cinnamomi*. Plant Dis. Rep. 38:47-52
- Tommerup, I.C., Dobrowolski, M.P., Hüberli, D., O'Brien, P.A., Hardy, G.E.St.J. & Shearer, B.L. (2000) Risks and threats due to genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* for disease management in natural vegetation ecosystems. In First International Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems - *Phytophthora Diseases of Forest Trees*: 55-63. Oregon State University, Oregon, USA.
- Tommerup, I. C. 1998. Diseases wich disrupt natural ecosystems. Seventh International Conference of Plant Pathology , Edinburgh, Scototland P. 4.4.1S.
- Tommerup, I. C., Hardy, J. G., Huberli, D. and Colquhoun, I. J. 1997. Selecting plants resistant to *Phytophthora cinnamomi*. Eleventh Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference. 89p.
- Tooley, P. W., W.E. Fry, and Villarreal-Gonzalez, M.J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. J. Heredity 76: 431-435.
- Tooley, P. W., Sweigard, J. A., and Fry, W. E. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. Phytopathology 76: 1209-1212.
- Van der Plank, J.E. 1963. Plant Diseases: Epidemics and Control. Academic Press. New York, USA.
- Von Broembsen, S.L., and Kruger, F. J.1985. *Phytophthora cinnamomi* associated with mortality of native vegetation in South Africa. Plant. Dis. 69:715-717.

- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Wager, V.A.1942. *Phytophthora cinnamomi* and wet soil in relation to the dying-back of avocado trees . *Hilgardia* 14(9):519-532.
- Wells, H. D., Bell. D. K., and Jaworski, C.A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 62: 442-447.
- Xu, J., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R. 1999. PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Mol. Ecol* .8:59-73.
- Zak., B., and Campell. W.A. 1958. Susceptibility of southern pines and other species to the littleleaf pathogen in liquid culture. *For. Sci.* 4: 151-161.
- Zaki, A. I., Zentmyer.G. A ., Sims, J. J. and Keen, N. T. 1983. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora dnnamomi* by oteicacid and lipids from avocado roots. *Phytopathology* 73(2): 199-203.
- Zentmyer, G. A. 1952. A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 42:24
- Zentmyer, G.A. 1962. Conference on *Phytophthora cinnamomi*.Proceedings of Conference, San Francisco , Calif., April 1962; multilithed, 12 p.
- Zentmyer, G.A., and Erwin, D.C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* 60:1120-1127.
- Zenmyer, G.A.1976. Distribution of the A1 mating type of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*: 66:701-703.
- Zentmyer, G.A., Leary, J.V., Klure, L.J and Grantham, G.L. 1976. Variability in Growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology* 66: 982-986
- Zentmyer, G.A. and Ohr, H.D. 1978. Avocado root rot. Div. Agric. Serv., Univ. of Calif., Div. Agric.Sci., Berkeley.Leaf 2440. 15 p.
- Zentmyer, G.A. 1979. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by a substance in avocado roots. *Phytopathology* 69: 1129-1131.
- Zentmyer.G.A., Klure, L. J. and Pond, E. C. 1979. The influence of temperature andnutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora dnnamomi*.*Mycologia*71:55-67

- Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph # 10, Amer. Phytopath. Soc., St Paul. 96p.
- Zentmyer, G.A. . 1983. The world of *Phytophthora* in: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, 1-7 pp.
- Zentmyer, G.A. 1984. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. 69: 89-94.
- Zentmyer, G.A. 1988. Origen y distribution of four species of *Phytophthora* . Trans.Br. Mycol. Soc. 91:367-378.
- Zentmyer, G.A., Menge, J., and Ohr, H. 1994. *Phytophthora* root rot. in: Compendium of tropical fruit disease. Minnesota, APS Press 77-79 pp
- Zhou, X.G., Zhu, Z.Y., Lu, C. P., Wang, S.J., and Ko, W.H. 1992. *Phytophthora cinnamomi* in Shanghai and its possible origin. Mycopathologia 120:29-32.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet, and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycol. Res. 98: 531-534.