

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Obtención de Oosporas de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en la Región Aguacatera de Michoacán.

Por:

Luis Eligio Moreno Zuccolotto

T E S I S

**Presentada como requisito parcial para
obtener el título de:**

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

**Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.
Febrero, 2004.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Obtención de Oosporas de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en la Región Aguacatera de
Michoacán.

TESIS

Presentada por:

LUIS ELIGIO MORENO ZUCCOLOTTO

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito
parcial para optar el grado de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:
Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor :
M. C. Yisa M. Ochoa Fuentes

Asesor :
M. C. Abiel Sánchez Arizpe

Asesor:
M. C. Maria Elizabeth Galindo Cepeda

M. C. Arnoldo Oyervides García
Coord. División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila.
Febrero, 2004.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por permitirme formarme como profesionista en sus aulas, campos y laboratorios.

Al Dr. Alberto Flores Olivas, por haber confiado en mi, al aceptar que formara parte de esta investigación .

Muy especial para la M. C. Yisa M. Ochoa Fuentes, por su incondicional ayuda, y dirección entregada para este trabajo de tesis.

A todos los maestros los cuales tuve la gran de recibir sus conocimientos técnicos e invaluable experiencias, las cuales me ayudaron a formar un criterio propio.

Al M. C. Elyn Bacopulos y a su familia que siempre me ofrecieron su sincera amistad y ayuda desinteresada.

A Luz Maria Pliego por que siempre tuvo una palabra de aliento o una acción de ayuda.

A Cesar y Castillo Soto, por ser los culpables de que yo conociera esta y por ofrecerme su casa en el momento en que yo la necesite.

A todos mis compañeros de licenciatura con los que compartí grandes momentos y de los que conservo una gran amistad.

En general, a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedicatoria Póstuma a mi padre (Luis Moreno Valencia) por que aunque no esta presente se que siempre a estado con migo. Y por haber sembrado en mi la semilla de los valores humanos las cuales fueron germinando en el transcurso de mi vida; además de haberme inculcado el amor y respeto hacia el campo.

Y a mis abuelas queridas: Graciela Ramírez Reyes y Casimira Reyes Villalobos (Q. E. P. D.) que nunca las olvidare.

A mi madre (Celia Zuccolotto Ramírez) por haberme dado la dicha de ser su hijo y con ello la enorme oportunidad de amar y luchar con tenacidad por lo que siempre e querido y creído, y por darme la libertad de escoger mi propia ruta, la cual e convertido en un camino lleno de tropiezos y triunfos que me han hecho crecer como ser humano y como hombre.

A mis hermanos, José Antonio, Braulio, Saulo y Rosita, con los que e compartido los mejores momentos de mi vida y que me han ayudado en todo momento en que lo e necesitado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página:
Agradecimientos	iii
Dedicatorias	iv
Resumen	ix
Introducción	1
Objetivo	3
Hipótesis	3
Revisión de Literatura	4
Generalidades	4
Distribución	4
Taxonomía	5
Morfología	5
Síntomas	8
Biología	8
Reproducción Asexual	9
Reproducción Sexual	10
Fisiología y Bioquímica	11
Ecología y Epidemiología	12
Variabilidad	16
Reportes de Variabilidad	16
Técnicas de Aislamiento y Detección	19

Materiales y Métodos	22
Obtención de las Muestras	22
Aislamiento y Purificación del Patógeno	24
Determinación de la Presencia de los Grupos de Compatibilidad Sexual	25
Resultados	26
Aislamiento y Purificación del Patógeno	26
Determinación de la Presencia de los Grupos de Compatibilidad Sexual	26
Discusión	28
Conclusión	30
Literatura Citada	31
Anexos	35

ÍNDICES DE CUADROS

Pagina:

Cuadro # 1. Se indica la relación de aislados obtenidos de raíces y suelo en huertos de aguacate de Michoacán, México..... 23

Cuadro # 2. Confrontación de Cepas de Diferentes Regiones del Estado de Michoacán..... 27

ÍNDICE DE FIGURAS

Pagina:

Figura 1.0 Ciclo de Vida de *Phytophthora cinnamomi* 10

Figura 2.0 Mapa demostrativo de los municipios en que se tomaron las muestras de raíz y suelo. 24

RESUMEN

Obtención de Oosporas de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en la Región Aguacatera de Michoacán.

POR:

LUIS ELIGIO MORENO ZUCCOLOTTO

LICENCIATURA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, ENERO DE 2004

Dr. Alberto Flores Olivas

Palabras Clave: *Phytophthora cinnamomi*, oosporas anteridio, anfigeno, variabilidad genética, homotalico, heterotalico.

El presente trabajo de investigación se realizó por la necesidad que existe en la región productora de aguacate de controlar la enfermedad provocada por *Phytophthora cinnamomi* (Tristeza del Aguacatero) que causa pérdidas económicas importantes a los productores, por lo que se estableció el objetivo de estudiar este patógeno y la epidemiología del mismo, así como sus variantes genéticas y la patogénesis de cada una de ellas. El presente trabajo demostró que existen los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 causantes de la gran variabilidad que este patógeno pueda tener. El proceso de investigación consistió en aislar el patógeno de muestras de raíz y suelo traídos del estado de Michoacán de los municipios de San Juan, Tancitaro, Periban, Uruapan y Escalante de los que se trajeron 12 muestras compuestas de 10 submuestras cada una, los métodos de aislamiento utilizados fueron: el de cortes de raíz, dilución de suelo y la inoculación con suelo en una manzana (manzana

campbell); de estos métodos utilizados el menos eficiente fue el de dilución de suelo ya que este no permitía un aislamiento efectivo del patógeno.

Una vez aislado el patógeno y obtenido las 12 cepas correspondientes a las muestras traídas de Michoacán se procedió a confrontar las cepas contra ellas mismas y contra el resto; los resultados de estas confrontaciones fueron las siguientes: los aislados que se confrontaron asimismos no produjeron oosporas, por lo que se comprobó que *P. cinnamomi* no es un patógeno homotalico, en contraste a este resultado 35 de las confrontaciones si formaron oosporas por lo que se descubre la existencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de los cuales no se pudo establecer la identidad de estos grupos en las cepas debido a la falta de una cepa de referencia. y el ultimo resultado fue que en 25 de los aislados de diferentes cepas no se produjeron oosporas lo que demuestra que forma parte del mismo grupo de compatibilidad sexual.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi (Rands) es un Agente fitopatógeno con gran capacidad destructiva y con un amplio rango de hospederos, invadiendo más de mil especies de plantas (Zentmyer 1980) de interés ornamental, como es el caso de las azaleas, brezo, camelia, rododendro, *Myrtus*; Forestal como ciprés, y pino; y alimenticio como macadamia, piña, papa y aguacate; considerándose a éste último como el principal hospedero de este organismo (Erwin y col. 1983).

P. cinnamomi en aguacate (*Persea americana* Mill) ocasiona la pudrición de raíz, enfermedad conocida en México por el nombre de “Tristeza del Aguacatero”, y que constituye el más grave problema fitosanitario para el cultivo en todas las regiones productoras de México y del mundo. Estudios realizados indican que anualmente provoca pérdidas económicas en la mayoría de los países productores de aguacate. En California se ha estimado que puede afectar entre 60 y 75% de las huertas causando pérdidas anuales de aproximadamente \$44 millones de dólares para 1989. Diversos factores han propiciado que la pudrición de raíz del aguacate en México alcance niveles epidémicos. Por una parte, las características propias de la biología del alga que le confieren un gran capacidad infectiva y por otra, la propia actividad de explotación del cultivo que no siempre utiliza las técnicas de manejo más apropiadas para la disminución del riesgo de contaminación. (Ochoa 2000).

Esta enfermedad aparece en las huertas de aguacate cuando existe humedad excesiva en el suelo y la presencia del patógeno que la produce. *Phytophthora cinnamomi* entra en

actividad cuando existe un drenaje deficiente, afectando tanto a las plantas en vivero como a los árboles de huertas comerciales (Brom 1970).

Cuando un árbol presenta síntomas evidentes de la enfermedad, el productor generalmente no realiza medidas de control y lo mantiene para obtener la cosecha. Es alarmante el número de árboles que hoy día se encuentran en el campo y que muestran síntomas de *P. cinnamomi* un dato conservador muestra que el 5% de la superficie sembrada en el estado de Michoacán se encuentra afectada por este patógeno y esta cifra va en aumento. (Ochoa. 2000).

Desgraciadamente no se conoce mucha información respecto a la epidemiología de éste patógeno en México, como su variabilidad genética, presencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2, etc. ello evidencia la necesidad de realizar investigación de las variantes genéticas que existen de *Phytophthora cinnamomi* en la región aguacatera de Michoacán de los grupos de compatibilidad sexual y oosporas, estas estructuras son producto de la reproducción sexual de *P. cinnamomi* y podrían ser una fuente importante de variabilidad. (Galindo y Zentmyer. 1964).

Por los argumentos anteriormente citados, se planteo el desarrollo del presente trabajo cuya finalidad fue la de generar información respecto a la epidemiología de *P. cinnamomi* en la región productora de aguacate del estado de Michoacán, México.

OBJETIVO:

➤ Identificar la presencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de aislados *P. cinnamomi*, de Michoacán, mediante la formación de oosporas.

HIPÓTESIS:

➤ Se sospecha la presencia de los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *P. cinnamomi* en huertos de aguacate en Michoacán.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades

Este patógeno, desde que fue descrito por Rands, en canchales de raíces de árboles de *Cinnamomum burmanii* en Sumatra, ha sido reportado en 67 países como la causa de muchas enfermedades. Hoy día se reconoce como uno de los patógenos de plantas más cosmopolita y destructivo, y la especie de *Phytophthora* de mayor rango de hospederos y la de más distribución en el mundo (Erwin y col. 1983).

En 1920 se observó por primera vez en Puerto Rico atacando aguacate; en 1940 se informa de su existencia en Sudáfrica; en 1951 se encontró en Honduras y en México, y se considero que es nativo de este ultimo país, mucha controversia a causado el origen de este patógeno ya que se ha considerado como nativo de Sudamérica, sudeste asiático, sudeste australiano; Zentmyer (1976), supone que fue llevado a Australia y de ahí paso a Centroamérica, Hawai, México, Guatemala y paso a E. U. A. en las primeras introducciones de 1871. (Gallegos 1983).

Distribución

La distribución en diferentes hospederos y países, tales como: Aguacate en América; pino, ciprés, y papa, observada por primera vez en Irlanda; once años después, fue

descubierta en Escocia y luego en Inglaterra; Actualmente, se le puede encontrar también en Bulgaria, Estados Unidos, Islas Holandesas Orientales y Perú. También se han obtenido reportes de su presencia en hospederos como *Thuja*; coníferas en Argentina; durazno, encino, macadamia, papaya en Hawai, eucalipto en Australia; azalea y *Rhododendron*, siendo, por lo tanto, muy conocido en diferentes partes del mundo; por ejemplo, en Australia, Nueva Zelanda, África, Estados Unidos, México, Guatemala, Costa Rica, Brasil, Argentina, etcétera. (Erwin *y col*, 1983).

Alexoupoulus *y col* (1996), ubica a *P. cinnamomi* (Rands) dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Chromista

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. cinnamomi*.

Morfología

Presenta micelio cenocítico, con vesículas globosas a piriformes de diferentes tamaños, por lo que las hifas tienen un diámetro variable de 3.5 a 21.0 μm ; término medio de 8.0 μm (anexos 1 y 2), colonia micelial con aspecto de camelia, debido al crecimiento deprimido y algodónoso del micelio, que tiene lugar a intervalos regulares; esporangióforos simples o ramificados en simpodio, a veces por proliferación esporangial, cortos o largos; no

existen reportes de producción de esporangios en medios sólidos, solo en extracto de suelo se forman en abundancia, ovoides y oval alargados, sin papila, de 23 a 63 μm X 15 a 38 μm ; término medio de 57 X 30 μm . y en medio de cultivo hasta 100 X 40 μm . (anexo 3 y 4), clamidiosporas numerosas, esféricas, ovales, piriformes, frecuentemente en racimo (Anexos 5 y 6); Los gametangios (anteridio y oogonio) se forman solamente en cultivos duales entre aislamientos de aguacatero (A2) y aislamientos de papaya procedentes de Hawai (A1); oogonios esféricos, terminales, de 40 μm . de diámetro (máximo, 58 μm), amarillo pálido al envejecer (anexo 7); anteridios subclaviformes, largos de 21 a 23 X 17 μm ; las oosporas casi llenan al oogonio. Según Waterhouse (1963), *P. cinnamomi* también forma oosporas con *P. cryptogea*.

(Erwin y col 1983).

Las zoosporas tienen flagelos, que les permiten nadar distancias muy cortas (25-35mm) en agua o películas de agua en poros del suelo. También pueden ser transportados grandes distancias por escurrimientos de agua. Las zoosporas son de vida corta, pero se producen en números grandes y es probablemente la causa de la mayoría de las nuevas infecciones. Se mueven a través del suelo hasta llegar a las extremidades de las raíces de la planta, donde se alojan, se enquistan y germina para producir los tubos germinativos que penetran las raíces. El micelio después crece dentro de las raíces de plantas susceptibles y puede crecer de la planta a la planta vía puntos de contacto de la raíz. (Department Of Conservation And Land Management, Government Of Western Australia. 2000).

Las clamidiosporas son mucho más grandes que las zoosporas y duraderas (dentro de las plantas muertas y del suelo). Se producen dentro de raíces de la planta en respuesta a

condiciones de secado, y pueden permanecer en el suelo por mas de 13 años y germinar cuando se presentan condiciones de alta humedad para causar una nueva infección. Las clamidiosporas germinadas pueden producir esporangios y más clamidiosporas, o micelio que infecte directamente raíces. Después de la infección, el micelio crece a través del tejido fino de la raíz provocando la interrupción de las funciones de la célula y del tejido fino. El patógeno se extiende en las raíces principales de especies susceptibles y puede rodear la base del tronco. La muerte de la planta ocurre porque el transporte del agua de las raíces es bloqueado. Varios factores ambientales controlan el índice de crecimiento del micelio dentro de la raíz. Por ejemplo, hay poco crecimiento cuando el contenido en agua del tejido fino de planta está debajo del 80%. En especie muy susceptible, tal como banksia, la muerte puede ocurrir en semanas, mientras que en especie moderado susceptible tal como el árbol de jarrah puede no morir hasta un año o más después de la infección. Las especies moderadamente susceptibles y resistentes tienen la capacidad de emparedar la infección para prevenir la extensión adicional del micelio, con grados que varían de éxito. (Department Of Conservation And Land Management, Government Of Western Australia. 2000).

Clamidiosporas de *Phytophthora cinnamomi* fueron colectadas de Azalea y Fraser naturalmente infectada y suelo del abeto Fraser usando el procedimiento de suelo cribado en un medio selectivo. Después de la germinación en el medio agar, las medidas del espesor del diámetro de las paredes de las clamidiosporas fueron hechas y los resultados fueron los siguientes el diámetro de las clamidiosporas aisladas de azalea promediado 53 μm en un rango de 29 a 76 μm . Aislados de abetos promediaron 59 μm con un rango de 40 a 70 μm . reportado un valor medio de 42 μm y un máximo de 60 μm para *P. cinnamomi*. El espesor de la pared de clamidiosporas de aislados de azalea promedió 1.9 μm ; El abeto aísla promediado

1.6 μm . Este se comparan con un valúo de 0.5 a 0.6 μm de clamidiosporas producidas en cultivos. Las paredes más gruesas de clamidiosporas producidas naturalmente pueden ser importantes en la supervivencia de *P. cinnamomi* en suelo bajo condiciones adversas. Los clamidiosporas con paredes gruesas de otras especies de *Phytophthora Spp.* Han sido asociados con la supervivencia en suelo. (Shew y Benson . 1980).

Las oosporas (anexos 8 y 9) presentan una morfología redondeadas, ialinas a cafés claros, generalmente pleroticas con un rango promedio en diámetro entre 19 y 54 micras, el anteridio anfígeno de 19 por 17 micras, oogonio redondeado ialino con un diámetro de 21 a 58 micras (Erwin y Ribeiro 1996).

Síntomas.

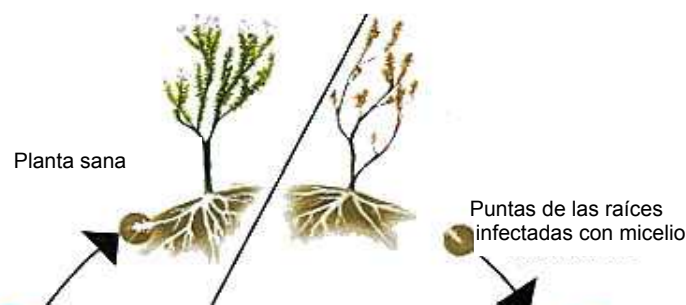
En el suelo ataca las raíces necrosandolas en forma progresiva, esto sucede en plantas de todas las edades y se llega al punto de eliminación de todas las raíces alimenticias. En el interior de las raíces primarias y secundarias se observan manchas rojizas-castañas y se vuelven quebradizas la destrucción lenta del sistema radicular lleva finalmente ala muerte del árbol (anexo 10); los síntomas externos son: decaimiento progresivo del árbol, pérdida de color de las hojas, producción de hojas mas pequeñas, frutos menos desarrollados, ramas que se desecan y se desfolian en la copa, disminución de la fructificación (aunque a veces ocurre en forma intensa, como un desequilibrio entre los nutrientes absorbidos por la raíz que disminuyen y los hidratos de carbono sintetizados en la copa), los frutos entonces son pequeños y de mala calidad, pérdida total de las raíces, lo que provoca la muerte del árbol. (Rodríguez 1982, Gallegos 1983, Brom 1970).

Biología

Phytophthora cinnamomi es reconocido como un alga porque se desarrolla en ambientes húmedos. Necesita suelos húmedos para el mejor desarrollo de sus esporas de propagación: los esporangios, que producen y liberan zoosporas móviles o nadadoras, oosporas y clamidiosporas, que son resistentes a las condiciones desfavorables del suelo y dificultan el control de la enfermedad. El patógeno requiere de agua para formar y liberar estas esporas, y para que éstas germinen e infecten las raíces. Los esporangios se forman en el suelo cuando la temperatura es ligeramente cálida, principalmente entre los 25° C y 30.5° C. Esto indica que las mayores infecciones de raíz tienen lugar en los meses más cálidos del año. El efecto de la irrigación en la dispersión de las zoosporas de *P. cinnamomi* está ampliamente documentado. En suelos infectados la enfermedad aparece más rápida y causa mayores daños a los árboles en huertos donde se incrementa la intensidad y frecuencia del riego. (Department of Conservation and Land Management, Government of Western Australia. 2000)

Reproducción Asexual

P. cinnamomi al infectar las raíces continúa su crecimiento micelial formando esporangios y clamidiosporas, si las condiciones son adecuadas los esporangios liberan zoosporas que a su vez vuelven a infectar tejido sano mientras que las clamidiosporas germinan en un nuevo esporangio ó liberando micelio que continúa su crecimiento en tejido nuevo.



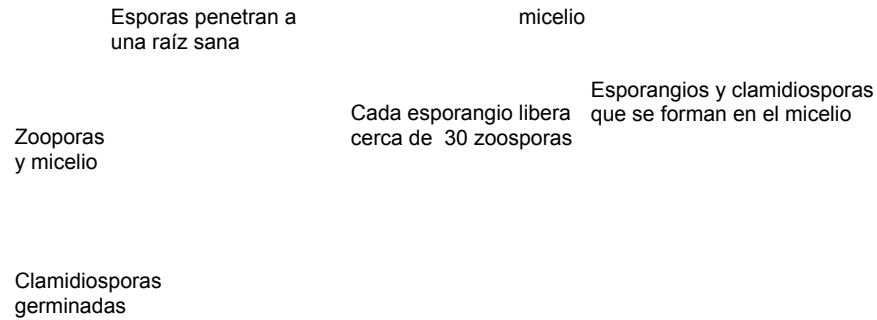


Figura. 1.0. Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*

(Department Of Conservation And Land Management, Government Of Western Australia, 2000)

Reproducción Sexual

La etapa sexual de *P. cinnamomi* puede ser producida por cruza interespecíficas e intraespecíficas, normalmente de especies heterotalicas, en otras palabras, el tipo de apareamiento A1 y A2, y la iniciación de la sexualidad por la presencia de varios estímulos. Las raíces del aguacate contienen una sustancia química que inicia la producción de un gran número de oosporas por el A2 de *P. cinnamomi* y de *P. drechsleri* y *P. capsici*. Esta sustancia no afecta al tipo A1 de *P. cinnamomi* (Zentmyer y col, 1979) La raíz de aguacate contiene ácido oleico, y este inicia la producción de oospora en el A2 pero no en tipo A1 de *P. cinnamomi* (Zaki y col, 1982). el ácido oleico parece ser el factor activo. Investigación adicional referente a este fenómeno menciona el estímulo de la producción de oosporas por *Trichoderma viride* en A2 de *P. cinnamomi* y otras especies de *Phytophthora* reportado por

Brasier (1971) y por Reeves y Jackson (1972), la base de este estímulo no se sabe, pero hay algunas indicaciones de un toxico químico volátil producida por productos de *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. Otras investigaciones demostraron que las oosporas se puede inducir mecánicamente por lesiones en el micelio en A2. Recientemente, Ko (1978) informó la iniciación de la reproducción sexual en *P. cinnamomi* y varias especies de *Phytophthora* por una substancia tipo hormona producida por el grupo de compatibilidad contrario al pasarlo por membranas de policarbonato. En este sistema, la producción de oosporas ocurre en A1 así como también A2; el fenómeno por lo tanto es básicamente diferente de los otros sistemas descritos arriba. Así, el A2 de *P. cinnamomi* puede tener la función también como una alga homotalica cuando el estímulo apropiado se proporciona. Esto puede ser una respuesta nutritiva, sustancia química específica (como en el extracto de raíz de aguacate y el estímulo de *Trichoderma*), o una respuesta a una "hormona" en algunos casos. (Ko 1988).

La estimulación de la Reproducción Sexual indujo la formación de oogonios y oosporas en cuatro aislados del tipo de compatibilidad A2 de *Phytophthora cinnamomi*. El ácido oleico natural, "triolein" y en menor cantidad ácido palmitoleico y linoleico estimularon la formación de oogonios y oosporas en estos aislados. Ni los lípidos naturales de raíces de aguacate ni los compuestos auténticos estimularon reproducción sexual en el tipo copulativo A1. La estimulación de la reproducción sexual en A2 con ácido oleico o triolein ocurrió cuando el aislado creció en caldo V-8 para 48-72 hr. lavado momentáneamente en agua destilada estéril y acomodado entre dos hojas de estopilla impregnada con substancias de

prueba 0.5 - 10 mg. El Oogonio y oosporas no se formaron cuando estas condiciones fueron variadas. (Zaki y col, 1983).

Fisiología y Bioquímica

Aislados de *Phytophthora cinnamomi*, crecidos en medio líquido (pH 6.2) conteniendo glucosa, asparagine, peptona, extracto de levadura, y sales minerales, fueron obtenidos en intervalos después de la inoculación. Enzimas intracelulares fueron detectadas en el citoplasma expresadas de el micelio en una prensa Eaton, extraída con 0.076 M, Triscitate-EDTA en pH 9.0 y fraccionado electroforeticamente en 8.4% tabla acrylamide en pH 9.0. Los geles fueron marcados para detectar actividad de la enzima. cada enzima examinada fue separada en varios componentes y cada aislado produjo un patrón característico; e. g. Bajo condiciones optimas seis bandas de esteraza, dos alcalinos de fosfatasa, nueve bandas málic de hidrogenaza, y cinco bandas lactíc de hidrogenaza fueron detectado en extractos de uno de los aislados. El máximo número de componentes de enzimas fue detectado en micelio de crecimiento activo de cultivo. El micelio de cultivos que tenían, alcanzado su máximo peso fresco generalmente produjo patrones más débiles con algunas bandas perdidas. La omisión de extracto de levadura del médium redujo tasa de crecimiento pero sensiblemente no alteró los patrones de la enzima. La adición de salvado de trigo para el médium, condujo a niveles detectables de esteraza pectina extracelular y polygalacturonasa. (Hall y Zentmyer 1967).

Ecología y Epidemiología

Estudio realizado sobre el origen de *Phytophthora cinnamomi*, que evidencian que no es nativo de América. Los muestreos fueron hechos de raíces de 373 árboles nativos *Persea* y árboles de aguacate cultivados en 18 países incluyendo México, Las pruebas de la

raíz fueron coleccionadas de 11 especies y variedades de *Persea*, dando resultados negativos ya que *Phytophthora cinnamomi* no fue aislada de estos árboles en sitios nativos, vírgenes, o de terrenos vírgenes, pero fue fácilmente recuperada en raíces de árboles de huertas comerciales que presentaban síntomas de la enfermedad y eran afectados con putrefacción de la raíz. Estos datos indican que es improbable que *P. cinnamomi* sea un patógeno nativo de América. (Zentmyer 1977).

El efecto de factores ambientales como la temperatura que afectan el crecimiento y patogénesis de *Phytophthora cinnamomi* y en el crecimiento de su hospedero de aguacate. En esta investigación la curva de crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* en la respuesta a la temperatura fue similar al del hospedero de aguacate excepto en 33° C, donde el hospedero creció sano pero el agente patógeno fue inhibido en su crecimiento y en la producción de esporangios. El desarrollo de putrefacción de la raíz por *Phytophthora* y reducción consecuente en el crecimiento de plántulas de aguacate fue en temperaturas máximas de 21° y 27° C bajo condiciones controladas en suelo naturalmente infestado. En 15° y 33° C, el alga no fue patogénica, no afectó crecimiento del aguacate. La infección de plántulas de aguacate estaba relacionada con la temperatura a una profundidad de 10 cm en una arboleda de aguacate en California, presentando una infección máxima en el verano y los meses cuando las temperaturas del terreno alcanzaron un máximo nivel de 24.5° a 25.5° C. En julio, agosto, y septiembre. (Zentmyer y Guillemet 1981).

La inactivación por frío del micelio de *P. cinnamomi* ocurrió en 2.6 a 16 días en -6.7, -3.8 y -1.4° C. Respectivamente en un suelo arenoso. Las clamidiosporas de *P. cinnamomi* fue inactivado después de 2.17 a 29 días en -6.4, -3.4 y -0.5° C,

respectivamente. La aclimatización de el cultivo de agar de suelo infestado por 5-7 días en 4° C no aumentó tolerancia de *P. cinnamomi* a temperaturas bajo cero. El Inoculo de *P. cinnamomi* en segmentos de raíz de *Abies fraseri*, en cereales de avena colonizados, o en suelos infestados naturalmente fue desactivado durante: (1976-1977 y 1977-1978) cuando la temperatura del suelo en una profundidad: 10 cm no dejó caer lo 0° C o debajo de eso, pero no durante el invierno de 1975-1976 cuando las temperaturas del terreno se quedó por encima de 0° C. (Benson. 1982).

Oosporas y clamidiosporas de *P. cinnamomi* fueron encontradas en raíces de aguacate después de 15 días en suelo, un aislado de aguacate desarrolló muchas oosporas y clamidiosporas en micelio previamente colonizado por pedazos de fibra de vidrio. Esto confirma un anterior descubrimiento de Zentmyer que *P. cinnamomi* es homotalico y hermafrodita. La función de las clamidiosporas y oosporas, es la supervivencia de la fungosidad en el suelo estudiado. El alga fue recobrada en el medio pimaricin-vancomycin, el 25 % colonizado de las piezas de fibra de vidrio oculto por 12 meses en suelo al 60 % de humedad. El micelio del alga fue completamente lysed en 1 mes; El origen de las colonias que se desarrollaron en la fibra de vidrio fue rastreado para clamidiosporas. Cuando el suelo permitió la perdida del 3 % de humedad, la fungosidad detuvo su desarrollo en un período de 3 meses. Las oosporas y clamidiosporas fueron fácilmente observados en la fibra de vidrio del suelo seco, pero fallaron para germinar en el medio o para infectar *Persea indica*. Estas estructuras resistentes juegan un papel importante en la sobrevivencia del alga en suelo solo cuando el contenido de humedad esta en exceso de 3%. (Mircetich y Zentmyer. 1966).

El saprofitismo y persistencia en suelo de *Phytophthora cinnamomi*, fueron evaluados en varios experimentos que indican la persistencia en suelo, el crecimiento limitado del micelio a través del suelo, y la apreciable actividad saprofita de *P. cinnamomi*. La fungosidad fue recobrada de un pequeño porcentaje de raíces muertas de aguacate almacenados en suelos arenosos por 6 años en 20-23 % humedad, 20° C, no mas de un mes, periodo cuando el suelo pierde humedad del 3-6 %. Las plántulas de aguacate y las plántulas de *P. indica* fueron plantadas en suelos almacenados para diversos períodos; La recuperación de la fungosidad fue similar a los obtenidos de los cultivos de raíces en la que *P. cinnamomi* persistió por 10 años en suelos infestados naturalmente, reutilizado para plántulas del macadamia y de aguacate, pero solo 1 año cuando este suelo fue vuelto a plantar para plántulas de fruta cítrica (la naranja dulce y agria). La fungosidad invadió paja trigaza y raíces muertas de aguacate en suelos estériles y poco estériles y fue recobrada al final de un período de almacenamiento de 80 días. La invasión y persistencia fueron superiores en suelos de alto contenido de humedad a (16 % cerca de la saturación) que al 8 % de humedad del suelo. 3 cm micelio cultivado de una fuente nutritiva en 10 días en suelo estéril y fue recuperado después de 40 días. La fungosidad fue recobrada 3 cm de la fuente nutritiva en suelo poco estéril después de 5 días, pero no después de 10 días o períodos más largos de almacenamiento. (Zentmyer y Mircetich. 1965).

La producción de esporangios por *Phytophthora cinnamomi* en suelos a diferentes potenciales matricos. La producción de esporangios por *P. cinnamomi* en una marga arenosa y un suelo de arcilla a un potencial matrico entre cero y quince bares. Hubo una fuerte correlación entre el número de esporangio producidos y el potencial matrico, pero no estuvo relacionado entre la producción del esporangio y el contenido de agua del suelo. Para cada especie. El numero de esporangios formados en iguales potenciales matricos fueron similares

para ambos tipos de suelo, cuando el inoculo micelial estuvo sepultado bajo 5 mm de suelo natural. *P. cinnamomi* produjo esporangios en - 160 el milibar (mb). Con límites superiores e inferiores de potenciales matricos de aproximadamente -10 mb. y -2,500 mb. respectivamente. El máximo numero de esporangios fue producido por *P. cinnamomi* en la superficie del suelo bajo las condiciones empantanadas (+ 1 mb) y saturadas (0 mb). Condiciones. Diariamente el secador y el remojador de la marga del suelo arenoso no indujo significativamente más esporangios producido por *P. cinnamomi* en los constantes potenciales matricos. (Gisi. *Y col* 1979).

El efecto de la solución de suelo y dos bacterias del genero *Pseudomonas* de suelo, en la producción de esporangios de *Phitophthora cinnamomi*. Los discos de agar-micelial y el crecimiento del micelio de *Phytophthora cinnamomi* produjeron algunos esporangios, dentro de 24 hr, cuando fueron incubados en 24 C en una solución estéril de sales minerales o en extractos de suelo esterilizados. Los extractos de suelo no estériles y las soluciones que contenían dos aislados de *Pseudomonas* de suelo indujo al desarrollo gradual y en mayor cantidad de esporangios en un período más largo que en las soluciones estériles. Lo aislados bacteriano sinergisticamente estimulo la formación de esporangios. La glucosa en 10 para 1.000 ppm o ácido glutámico en 100 ppm inhibió la producción de esporangios bajo las condiciones de axenic, y retardo el principio de producción de esporangios en soluciones poco estériles. (Ayers y Zentmyer 1971).

Variabilidad

Zentmyer (1976) menciona que *P. cinnamomi* es muy variable; investigaciones hechas desde hace 30 o 35 años, sobre este patógeno, tenemos fundamentos de la variabilidad

considerable intra específica en la morfología de la colonia (anexo 11), patogenicidad, la respuesta a antibióticos y fungicidas, la respuesta a la temperatura, la morfología y la abundancia de oosporas y esporangios, las respuestas a sustancias nutritivas (tal como fuentes de carbón, nitrógeno y esteroides), la abundancia de clamidiosporas, la producción del pigmento en medios de tyrosine, y en otras respuestas fisiológicas; Un ejemplo de diferencias en la patogenicidad, los aislados de la camelia son patogénicos, tanto en la camelia como en el aguacate, mientras que aislados del patógeno causante de la enfermedad del aguacate son patogénicos en el aguacate pero no en camelia, (Zentmyer y Guillemet, 1981).

Reportes de Variabilidad (A1 y A2)

El estudio de la morfología, de las estructuras sexuales, asexuales y las comparaciones fisiológicas, constatando tasas de crecimiento, de producción esporangial, y desarrollo de colonia en medio sólido fueron hechos con aislados de tipos de compatibilidad sexual, de *Phytophthora cinnamomi* Rands. Ciertos caracteres exhibieron una amplia variabilidad previamente reportada, aunque el rango total está recluido dentro y entre los aislados usados. Estos fueron obtenidos de regiones diversas y fuentes bases. Está concluido que los aislados de los tipos de compatibilidad sexual que se estudiaron y caracterizaron constituyen componentes de una especie biológica soltera. Los tipos de compatibilidad existen en la naturaleza con una frecuencia hasta aquí no reportada. (Franquee y col. 1964.)

La etapa sexual ha sido observada raramente en *Phytophthora cinnamomi* Rands, aunque su producción por cultivo de zoosporas en presencia de extracto de raíz de aguacate a sido demostrado. Recientemente la primera evidencia fue encontrada de la existencia de dos

grupos de compatibilidad o tipos copulativos en las especies, análogo para la situación con *P. infestans*. anteridio, anfigeno, oogonio, y oosporas fueron producidos con un aislado de *P. cinnamomi* de llagas de la semilla de macadamia (*Macadamia integrifolia*) en la isla de Hawai (designado como A1) fue pareado con los típicos aislados de *P. cinnamomi* (designado como A2) de pino, brezo, cinchona, *Rhododendron*, azalea y aguacate (los aislados de aguacate de California, Chile, Honduras, México, Perú, y Puerto Rico). Los aislados de A1 fueron también pareados con otros aislados de *P. cinnamomi* de llagas del macadamia en la isla de Oahu, Hawai. Las copias de las hifas oogonial y anteridial mostraron que ambos aislados participan en el proceso sexual. El aislado A1 hawaiano es morfológicamente similar a otros aislados *P. cinnamomi*, con alguna variación en el tamaño esporangial. Tiene un insignificante más alta temperatura máxima (33 ° C en vez de 30 ° C). El aislado hawaiano no fue patógeno en raíces aguacate. (Galindo y Zentmyer 1964).

Aislados de *Phytophthora cinnamomi* colectados desde 1977 a 1986 y 1991 a 1993 en dos regiones en el sur de África fue analizado usando isozymes. Un total de 135 aislados fueron analizados por 14 enzimas representado 20 loci geométricos, del cual cuatro fueron polimorficos. Esto condujo a la identificación de nueve diferentes genotipos de isozyme multilocus. Ambos tipos copulativos de *P. cinnamomi* ocurrieron comúnmente en la región de Cape, considerando, predominantemente, el tipo copulativo A2 ocurrido en la región Mpumalanga del Sur de África. El aislado de tipo de apareamiento A2 podría resolverse en siete genotipos del isozyme multilocus, podría compararse sólo dos genotipos del isozyme multilugar multilocus para el aislado del tipo copulativo A1. Pocos niveles de gene (0.115) y genotípica (2.4%) diversidad y pocos números de alelos por locus (1.43) fueron observado en sur la población Africana de *P. cinnamomi*. La distancia genética entre Capempulaga de la población de *P. cinnamomi* fue relativamente bajo ($D(m) = 0.165$), y ningún patrón

específico en la distribución regional de genotipos del multilocus isozyme podría ser observado. La distancia genética entre las poblaciones "viejas" (aislado entre 1977 y 1986) y "nuevas" (aislado entre 1991 y 1993) de *P. cinnamomi* de Cape fue bajo ($D(m) = 0.164$), indicando a una población estable con el paso del tiempo. Tres de los nueve genotipos de multilocus del isozyme fueron específicos para la "vieja" población, y el genotipo del único isozyme de multilocus fue específico para la población "nueva". Las diferencias significativas en las frecuencias de alelos, una distancia genética alta ($m = 0.581$) entre el Cape A1 y A2 de los tipos copulativos, desviaciones significativas de equilibrio del Hardy Weinberg, un nivel global bajo de heterosigosidad, y un índice alto de fijación (0.71) todo señala que la reproducción sexual ocurre raramente en la población sudafricana *P. cinnamomi*. (Linde, y col 1997).

Técnicas de Aislamiento y Detección

Se probaron 15 muestras de suelos, en los que se incluían suelos de aguacate, cítricos, y legumbre; El suelo fue colocado en una hoja del celofán cubierto con una capa la harina de maíz selectiva de pimaricin-penicillin-polymyxin (todo 100 ppm) en medio de agar que restringió el crecimiento de la microflora de suelo, y permitió el de *P. cinnamomi*. Después de una incubación de 3 días en 25° C. El médium fue inoculado en el centro con *P. cinnamomi*. El crecimiento lineal después de 3 días fue reducido de 71-100 % (promedio 95 el %) se comparó con los platos de control sin suelo. A diferencia de lo reportado del fenómeno de inhibición de germinación de esporas en suelo, el crecimiento lineal de *P. cinnamomi* fue reducido también por esterilización en autoclave (en rango de 0-69%; el promedio de, 39 %). La inhibición de crecimiento de forma natural de los suelos esterilizados era mucho menos

cuando la incubación del terreno fue de 1° C que en 25 ° C. El grado de inhibición, sin embargo, aumentó con el incremento en período mas largo de incubación del suelo.(Tsao y Bricker 1963).

Phytophthora cinnamomi fue aislado del suelo por el método de dilución utilizando el medio Kerr's modificado. Otro hongo fue inhibido lo suficiente al permitir usar 0.5 a 1 gr. de suelo por caja petri. Para mejor recuperación de *P. cinnamomi* de suelo, el pH del medio fue ajustado inicialmente de 4.5 – 5 en cajas donde se incubaron en completa oscuridad por 72 horas en 20 a 25° C bajo estas condiciones solo *Phytophthora spp.*, *Pythium spp.*, generan un crecimiento reducido en el medio, también otro tipo de hongo y bacteria se desarrollaron en la superficie del medio el cual pudo ser lavado de lejos con agua corriente para facilitar el conteo de colonias o extraer colonia de *P. cinamomi*. El conteo de propángulos de *Phytophthora* no fue reducido por el proceso de lavado. Cuando hay cantidades iguales de suelo usando el medio Kerr's modificado fue mas sensitivo que la técnica de la manzana campbell en detección de *P. cinamomi* donde fue detectado mas fácilmente usando la técnica de la manzana *P. cinnamomi* la población de este patógeno fue en el rango de 1 a 30 propángulos por gramo de suelo. (Hendrix y Kuhlman 1965)

La existencia de *Phytophthora cinnamomi* como clamidiosporas en suelo de *Abies Fraseri* (Pursh); el suelo naturalmente infectado fue espolvoreado en la superficie del medio agar selectivo para *Phytophthora Spp* . y fungosidades estrechamente relacionadas después de que 16-20 hr *P. cinnamomi* creció en el medio después se identifico por su micelio distintivo. Para verificar su identificación, las colonias fueron transferidas en medio Eckert y Tsao. El suelo desmenuzado fue montado en lactofenol o agua y examinado microscópicamente.

Coloreado con ácido fuchsin o mirando con iluminación de fase contrastante a la que se ayudó a diferenciar el micelio y clamidiosporas, especialmente cuando estos fueron enterrados en materia orgánica.. Estas colonias de *P. cinnamomi* originados de clamidiosporas. Las clamidiosporas generalmente se observaron una pared más gruesa que en los de cultivo. (Hendrix y Kuhlman 1965).

Una prueba cuantitativa del suelo se hizo mediante la espolvoreación del suelo en un medio selectivo de agar (PCH) fueron desarrollados para la enumeración de densidades de población de *P. cinnamomi* en suelo natural y artificialmente infestado. El selectivo (PCH) (Pimaricin . Chloramphenicol, y Hymexazol) mejora la recuperación de *P. cinnamomi* del suelo en contraste con otros tipos de medios. Un Procedimiento McCains Wetsieving para analizar la prueba de suelo hasta de 50g fue modificado para analizar hasta 200g de suelo con el fin de usar una elutriador semiautomático. Colonias de *P. cinnamomi* fueron microscópicamente identificables en PCH después de 48-72 hr de incubación a 20° C a oscuras, en los análisis el ochenta y siete por ciento de las colonias originaron clamidiosporas libres en el suelo, el siete por ciento de las piezas colonizaron materia orgánica, y seis por ciento de fuentes sin identificar. (Shew y Benson. 1982).

Un inmunoensayo específico para la detección de *Phytophthora cinnamomi* fue desarrollado para el uso en suelos. los quistes se pegaron en una membrana de nailon que proporciono una prueba rápida, sensitiva adecuada para el uso en campo. No hubo reacción cruzada con otro *Phytophthora* y especies de *Pythium* en ambiente controlado en análisis de suelo u otra materia orgánica adherida a la membrana. La prueba fue tan sensitiva como la prueba cebo con *Eucalypius Sieberi* y, cuando corren conjuntamente con la prueba cebo, fue

cuantitativa para un suelo infestado en agua en suspensión de 2.5×10^2 para 5×10^3 zoosporas por el mililitro. La prueba fue usada exitosamente para detectar a *P. cinnamomi* en una gran variedad de pruebas de suelo bajo un rango diverso de especies bases. Hay varias ventajas para usar la varilla indicadora con la que la prueba se comparó con procedimientos tradicionales: La familiaridad con taxonomía *Phytophthora* no es precisada; La prueba puede llevarse acabo por personal no calificado; Y el suelo, en vez de tejidos finos infectados de la planta puede ser analizado. El dominio experimentado en la prueba mostró que puede ser utilizado como una herramienta diagnóstica confiable para reemplazar o magnificar métodos de aislamiento y de detección. El uso de este tipo de prueba de la varilla indicadora debería usarse para la detección de *P. cinnamomi* en suelo de bosques y comunidades de la planta y en los cultivos hortícola y ornamentales que afecta este agente patógeno. (Cahill y Hardham, 1994.)

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se desarrollo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), y en colaboración con la región productora de Aguacate en el estado de Michoacán, México, en el período de enero - diciembre del 2003.

Las metodologías utilizadas en este trabajo consistieron en el aislado del patógeno de las muestras de raíces y suelo por técnicas como, la de cortes de raíces, la de dilución de suelo

y el método de la manzana campbell y la obtención de oosporas por el método de confrontación de los aislados.

Obtención de las Muestras

Se realizaron los muestreos en el mes de Enero de 2003 en los Municipios de Tancitaro, Salvador Escalante, Periban, San Juan y Uruapan en aquellas huertas donde los árboles presentaron síntomas de la enfermedad, estos muestreos fueron de suelo y raíz (cuadro # 1) de la siguiente manera: se obtuvieron 10 submuestras por huerta formando 1 muestra compuesta de los primeros 40 cm de profundidad del suelo, descartando los primeros 10 ya que estos presentaban materia orgánica, posteriormente se trasladaron al laboratorio de parasitología molecular de la UAAAN para ser analizados.

Cuadro # 1. Se indica la relación de aislados obtenidos de raíces y suelo en huertos de aguacate de Michoacán, México.

CLAVE	REGIÓN	ORIGEN DEL AISLADO
SE-1	Escalante	Raíz
SE-2	Escalante	Raíz
TAN-3	Tancitaro	Suelo

TAN-4	Tancitaro	Raíz
TAN- 5	Tancitaro	Raíz (L1)
TAN-6	Tancitaro	Raíz
URU-7	Uruapan	Raíz (L1)
URU-8	Uruapan	Raíz
PER-9	Periban	Suelo
PER-10	Periban	Raíz
SJ- 11	San Juan	Suelo (L1)
SJ-12	San Juan	Raíz

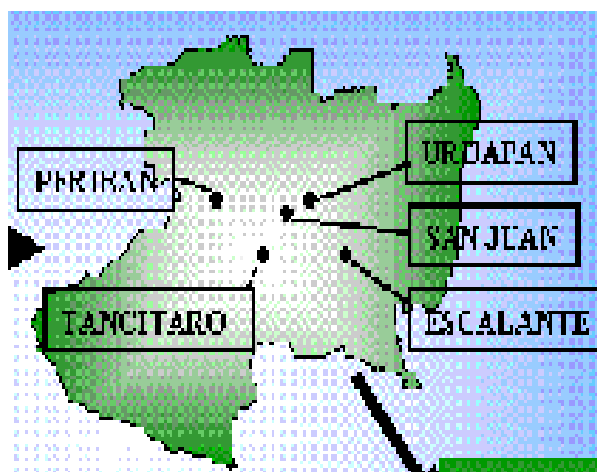


Figura 2. Mapa demostrativo de los municipios en que se tomaron las muestras de raíz y suelo.

Aislamiento y Purificación del Patógeno

Una vez obtenidas las muestras, fueron procesadas en la UAAAN en el laboratorio de Fitopatología Molecular, el aislamiento del patógeno se llevó a cabo en medio PDA (papa dextrosa agar) y V8 - agar.

Para el procesamiento de las muestras de raíz con síntomas de la Tristeza del Aguacatero, se cortaron pequeños trozos de raíz de 1 cm. con un bisturí, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min. Se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron sobre toallas de papel absorbente también estériles, con pinzas estériles se colocaron 4 trozos sobre la superficie del medio de cultivo PDA y se incubaron a 18° C en oscuridad hasta el desarrollo del micelio.

Para el análisis de las muestras de suelo se utilizó la técnica de la manzana campbell, Esta consiste en abrir con sacabocados tres a cuatro orificios de 3 cm de profundidad e introducir en su interior suelo del árbol bajo estudio, luego el orificio se humedece con agua destilada estéril y, colocando banda adhesiva para sostenerla y un algodón húmedo sobre la superficie. El fruto así inoculado se coloca en cámara húmeda por 48 h, haciéndose las observaciones cada tercer día. Si las muestras resultaran positivas se forman alrededor de los orificios, manchas marrones a partir de las cuales se hacen los aislamientos sobre (PDA).

Otra técnica utilizada es la de dilución de suelo en agua estéril en tubos de ensaye esta técnica consistió en agregar un gramo de la muestra de suelo en 9 mililitros de agua destilada estéril para formular la solución madre, de esta solución madre se extrae un mililitro la cual se agrega a un segundo tubo previamente llenado con 9 mililitro de agua destilada estéril, de esta segunda solución se extrae un mililitro y se agrega en otro tubo de ensaye con nueve mililitros de agua destilada estéril, de esta manera se puede seguir el procedimiento de dilución de suelo. En esta practica solo se disolvió 5 veces para posteriormente tomar una muestra de cada disolución aproximadamente 0.1 mililitro y se sembró en cajas petri con medios de cultivo: PDA, y V8 agar.

Posteriormente se realizaron montajes con azul lactofenol del micelio desarrollado en el medio y se observaron en el microscopio compuesto las estructuras características de *P.*

cinnamomi como son: micelio cenocítico con vesículas globosas a piriformes de diferentes tamaños, la colonia micelial con aspecto de camelia, esporangióforos simples o ramificados en simpodio, a veces por proliferación esporangial, cortos o largos ovoides y oval alargados, sin papila, clamidiosporas numerosas, esféricas, y ovaes; datos otorgados por Erwin, (1983); este procedimiento se realizo con cada una de las muestras de las regiones anteriormente mencionadas. Las cepas que se identifiquen como *P. cinnamomi*, se transferirán a un medio de cultivo V-8 agar .

Determinación de la Presencia de los Grupos de Compatibilidad Sexual

Se confrontaron los aislados de todos contra todos de las regiones Escalante, Tancitaro, Uruapan, Periban y San Juan, para determinar si están presentes los dos grupos de compatibilidad sexual; comprobándolo, por medio de la observación de la formación de oosporas. Estas confrontaciones se realizaron en medio de cultivo jugo V-8 agar las que se incubarán a 18° C de 10-15 días en oscuridad.

La identificación de oosporas se realizo en microscopio compuesto por medio de montajes con azul de lactofenol. Aquellas confrontaciones en las que la producción de oosporas estuvo presente, o bien la presencia de anteridios anfígenos se tomo como positivo y a los que no presentaron ninguno de estos dos indicadores se tomo como negativo.

RESULTADOS

Aislamiento y Purificación del Patógeno

Se obtuvieron 12 aislados de las muestras traídas de campo, presentando 3 tipos de crecimiento como lo fueron rosáceo-algodonoso el cual es el crecimiento típico de *Phytophthora cinnamomi*; rosáceo-estrellado (SE-2) y algodonoso (URU-8, SJ-11, SJ-12). que no son reportados comúnmente para *Phytophthora cinnamomi*, (anexo 12) El tiempo promedio de crecimiento de todos los aislados fue de siete días.

En los métodos utilizados para análisis de suelo, como el de diluciones resulto muy poco efectivo ya que ocasiona problema al momento de aislar al patógeno del medio debido a la contaminación con *Fusarium*. Otro de los métodos utilizados fue la técnica de la manzana campbell que tuvo resultados muy satisfactorios ya que fue muy eficiente en la extracción del patógeno que se desarrollo en el medio de cultivo PDA prácticamente sin ningún tipo de contaminación, lo que confirma lo mencionado por (Hendrix, y col 1965) donde menciona que la recuperación de *P. cinnamomi* es más fácil utilizando el método de la manzana campbell.

Determinación de la Presencia de los Grupos de Compatibilidad Sexual

De 72 confrontaciones realizadas se presentaron tres tipos de respuestas: En la primera, ningún aislado presentó oosporas al aparearse consigo mismo; en la segunda respuesta, se obtuvo lo esperado en este trabajo, es decir se formaron oosporas en 35 confrontaciones, y la tercer respuesta, no se obtuvieron oosporas en 25 confrontaciones, Como se puede observar en el (cuadro # 2)

Cuadro # 2. Confrontación de Cepas de Diferentes Regiones del Estado de Michoacán.

(UAAAN, 2000)

	TAN-3	TAN-4	TAN- 5	URU-7	URU-8	SJ- 11	SJ-12	SE-1	SE-2	TAN-6	PER-9	PER-10
--	-------	-------	--------	-------	-------	--------	-------	------	------	-------	-------	--------

SE-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SE-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TAN-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PER-9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PER-10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TAN-3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TAN-4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TAN-5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
URU-7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
URU-8	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SJ-11	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SJ-12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

SE - 1, SE - 2 / Escalante; TAN - 3, TAN - 4, TAN - 5, TAN - 6 / Tancitaro; URU - 7, URU - 8 / Uruapan; PER - 9, PER - 10 / Periban; SJ 11, SJ-12; (+) Positivo, (-) Negativo.

DISCUSIÓN

Se presentaron 3 tipos de respuesta entre los diferentes aislados: i) en la primera respuesta fue: que al aparearse los aislados contra si mismos no hubo formación de oosporas por lo que se descarta la posibilidad de que sea un patógeno homotálico, como fue descrito por Fraquee y col., (1964) donde indica que *P. cinnamomi* es homotálico.

Mas sin embargo, Erwin (1993), menciona que *P. cinnamomi* puede actuar de las dos formas como homotálico y heterotálico; el homotalismo (formacion de oosporas sin actividad sexual entre A1 y A2) lo puede presentar mediante estímulos exteriores en formas muy variadas, ya sea por el uso de bacterias del genero *Trichoderma viride* reportado por Brasier (1971) y por Reeves y Jackson (1972), y también puede haber homotalismo por daño mecánico en el micelio (Reeves y Jackson 1974), situación que no se presento en esta investigación, y por reacción química al estar expuesta al acido oleico que se encuentra en la raíz del aguacatero esto solo sucede en el grupo A2 ya que este tipo de respuesta no sucede en el grupo A1 que también fue sometido alas mismas pruebas y no presentaron formación de oosporas (Zentmyer 1979).

ii) En la segunda respuesta se obtuvieron oosporas, lo que nos da a conocer que si existen los dos grupos de compatibilidad sexual A1 Y A2. en la región aguacatera de Michoacán lo que contradice a Galindo y Zentmyer (1964) que mencionan que el grupo A1 se encontraba solo en Hawai en plantas de Macadamia y Papayo pero en esta investigación se ha demostrado la presencia de ambos grupos A1 Y A2 por lo que el grupo A1 pudo haber llegado a México de la misma forma en que se introdujo el grupo A2 y se halla adaptado alas condiciones ambientales donde se desarrolla el aguacatero de una forma mas reservada ya que como menciona Galindo y Zentmyer (1964) el grupo A1 no presenta patogénesis en plantas de aguacate, por lo que pudo haber pasado desapercibido, debido a esto existen referencias como

la mencionada por Téliz (2000), donde indica que en México solo se encuentra un grupo de compatibilidad sexual y por consiguiente no existe evidencia de oosporas en el país; por lo que los resultados encontrados en esta investigación lo contradice y nos muestra que puede existir variabilidad genética o variantes genéticas que pueden causar mas patogenicidad en el aguacate; este tipo de información no existe en México, lo cual este proyecto es precursor de los estudios futuros que se puedan realizar referentes alas variantes genéticas que puedan existir en México, para posteriormente realizar medidas de control mas efectivas contra este patógeno .

iii) En la tercer respuesta no presento la formación de oosporas lo que avala la respuesta anterior, y nos indica que al confrontar las diferentes cepas nos demuestra que no existió el estímulo para la diferenciación de gametos y producción de oogonio y anteridio por lo tanto dichas cepas pertenecen al mismo tipo de compatibilidad sexual, como lo menciona Ko (1988), que nos dice que la formación del anteridio y el oogonio responden a un estímulo causado por una sustancia hormonal de *P. cinnamomi* que segrega al momento de estar frente o en confrontación con el tipo de compatibilidad sexual contrario.

CONCLUSIÓN

Debido a la obtención de oosporas y a la observación de anteridios anfígenos, se puede concluir que si se encuentran los dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de *Phytophthora cinnamomi* en el estado de Michoacán.

LITERATURA CITADA

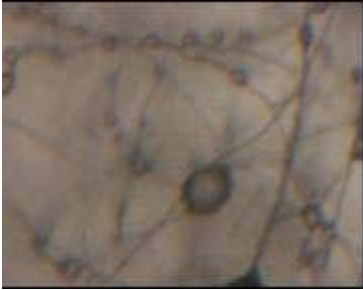
- Agrios, N. G 1988. Plant Pathology. Third edition. Academic press inc. California. 19-36 y 317-324 Pp.
- Alexopoulos, C. J., Mims C. W., Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. 687-689, 717-723.
- Ayers, W. A. and Zentmyer G. A. 1971. Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 61: 1188 – 1193.
- Rands, R. D. 1922. Streepkanke van kanell veroorzaakt door *Phytophthora cinnamomi*. N. Sp. Meded. Inst. Plantenziekt. N° 54.: 53 Pp
- Benson D. M. 1982. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 72: 560 - 563.
- Boccas, B., and Zentmyer, G. A. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 66:477-484
- Brasier, C. M. 1971. Induction of sexual reproduction in single A2 isolates of *Phytophthora* species by *Trichoderma viride*. Nature (London) New Biol. 231-283.
- Brom, R. E. 1970. Pudrición de la raíz del aguacate. El aguacate. Primera edición. Ed. Gaceta .Pag. 283-284
- Cahill, D. M. and Hardham A. J, 1994. A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soil. Phytopathology 84: 1284 – 1292.
- Department of Conservation and Land Management. Government of Western Australia. 2000. http://www.calm.wa.gov.au/projects/dieback_lifecycle.html.

- Erwin D. C. Bartnicki Garcia S. and Tsao P. H., 1983 Variability. *Phytophthora*. The World de *Phytophthora*. Editors. Primer edición. Pág. 5; 6; 122.
- Erwin, D. C. and Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Aps press. St. Paul, Minnesota. USA. xi-xii, 269-276 Pp.
- Franquee A. Haasis, Nelson, and Marx D. H., 1964. Morphologic and physiological characteristics of the mating type of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology, vol., 54: 823-825
- Galindo, A. J. and Zentmyer, G. A. 1964. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 54: 238 - 239
- Gallegos, E. R. 1983. Historia y origen. algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacán. Pág. 230-231; 234-235
- Gisi, U., Zentmyer G A. and Kure, L. J. 1979. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* P. *palmivora* in soils at different matric potentials. Phytopathology 70:301-306.
- Goodwin, S. B., Spielman, L. J., Matuszak, J. M, Bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. Phytopathology 82:955 – 961.
- Hall, R. and Zentmyer G. A. 1967. Intracellular and extracellular enzymes from *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology. 57: 813.
- Hendrix, jr. F. F. and George Kuhlman E. 1965 Direct recovery of *Phytophthora cinnamomi* from field soil. Phytopathology. 55: 499; 500; 1183-1185
- Hendrix, jr. F. F. and George Kuhlman E. 1965. The existence of *Phytophthora cinnamomi* as chlamydospores in *Abies fraseri* soil. Phytopathology. 55: 499; 500.
- Linde, C., Drenth A., Kemp, G. H. J, Wigfield, M. J. 1997. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. Phytopathology. 87: 822 - 827

- Mircetich, S. M. and Zentmyer, G. A. 1966. Production of oospores and chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* and roots and soil. *Phytopathology*. 56: 1076.
- 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. <http://www.aproam.com/aguate13.htm>
- Reeves, R. J. and Jackson, R. M. 1974. Stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* by damage. *J. Gen. Microbiology*. 84: 303-310.
- Reeves, R. J. Jackson, R. M. 1972. Induction of *Phytophthora cinnamomi* oospores in soil by *Trichoderma viride*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 59:156-159.
- Rodríguez, F. S. 1982. Podredumbre de la raíz, tristeza o marchitamiento. *Phytophthora cinnamomi*. El aguacate. Primera edición. Ed. Azteca. Pág: 142 - 144.
- Shew, H. D. and Benson, D. M. 1980. Thick walled chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* produced in natural soil. *Phytopathology*, 70: 571-573.
- Shew. H. D. and Benson, D. M. 1982. Qualitative and quantitative soil assays for *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 72: 1029 - 1032.
- Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones mundi-prensa. 158-167 Pp.
- Tsao Peter H. and Bricker J. L. 1963. Growth inhibición of *Phytophthora cinnamomi* by soil diffusates on agar medium. *Phytopathology*. 53: 892-894
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora cinnamomi* de bary. *Mycol. Pap* 92. Common. Mycol. Inst. Kew, surrey, England. Pp-22
- Ko Wen-hsiung. 1988. Heterotalismo y homotalismo hormonal en *Phytophthora*. *Phytopathology*. 26: 57-73.

- Ko Wen-hsiung 1978 Heterothallic: *Phytophthora cinnamomi* evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. J. Microbiol. 107: 15-18
- Zaki, A. I., Zentmyer, G. A., Sims J. J., and Keen, N. T. 1982. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by oleic acid and lipids from avocado roots. Phytopathology. 73:199 -203.
- Zentmyer G. A, Klure, L. J. and Pond, E. C. 1979. The influence of temperature and nutrition of formation of sexual structures by *Phytophthora cinnamomi* Mycology. 71: 55-67.
- Zentmyer, G. A. 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. Phytopathology. 66: 982-986
- Zentmyer, G. A. 1977. Origin of *Phytophthora cinnamomi*: evidence that it is not an indigenous fungus in the America. Phytopathology 67:1373–1377.
- Zentmyer, G. A. and Guillemet. 1981. The effect of temperature on growth and pathogenesis of *Phytophthora cinnamomi* on growth of its avocado host. Phytopathology 71: 925 – 928
- Zentmyer, G. A, 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monogr. # 10. The American Phytopathological Society, St, Paul , Mn. 96 Pp.
- Zentmyer, G. A, and Erwin, D. C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. Phytopathology 60:1120-1127.
- Zentmyer, 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monogr. 10.Am. Phytopathology. Soc. St., Paul, Mn 96 Pp.
- Zentmyer, G. A. and Mircetich S. M. 1965. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology. 56: 710
- Zentmyer, G. A. 1976. Distribution of A1 mating type of *P. cinnamomi*. Phytopathology. 66: 701-703.

ANEXOS



Anexo 1



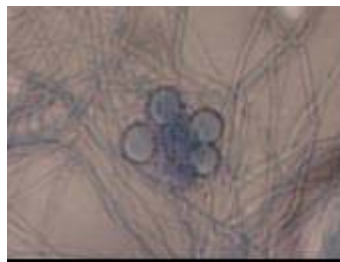
Anexo 2



Anexo 3



Anexo 4



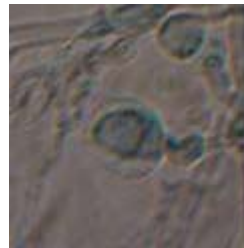
Anexo 5



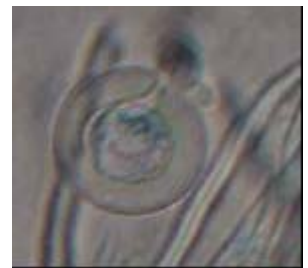
Anexo 6



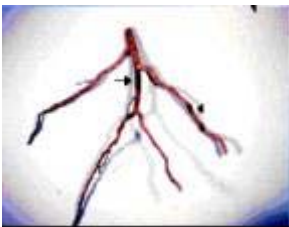
Anexo 7



Anexo 8



Anexo 9



Anexo 10



Anexo 11



Anexo 12