

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Evaluación de la Tasa de Crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* Rands en
Medios Alternativos

Por:

CARLOS URIEL FLORES SALINAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Evaluación de la Tasa de Crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* Rands en
Medios Alternativos

Por:

CARLOS URIEL FLORES SALINAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor Principal

Dr. Ernesto Cerna Chávez
Coasesor

Ing. Anselmo Hernández Pérez
Coasesor

Dr. Gabriel Morales Gallegos
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A:

Principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional

A la “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro” por la gran oportunidad que me brindó al permitirme ingresar a sus aulas, por la herramienta más valiosa que me dio que es el estudio, por la enseñanza que a través de sus profesores me otorgaron para poder formarme como persona y porque me enseñó a mantenerme siempre firme, seguro y con la cabeza en alto ante cualquier adversidad, soy y siempre seré con mucho orgullo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

A mi asesor principal Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por su incondicional apoyo en la realización de este trabajo de tesis y especialmente por la paciencia con la que me dirigió

Mi más grande sincero agradecimiento al Ing. Anselmo Hernández Pérez, por su participación y apoyo en dicho trabajo realizado.

Mc. Omegar Bautista Hernández, por su participación y apoyo en dicho trabajo realizado.

Mc. Juan Carlos Delgado, por su participación y apoyo en dicho trabajo realizado

DEDICATORIA

A esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme confianza y el apoyo brindado. Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes:

Papá Filiberto

Mamá Camila

Hermanos: Luis y Yesica

A mi novia Mary

Abuelos paternos⁺ y maternos

Así como como amigos y compañeros de toda mi preparación académica sin descartar a familiares.

Profesores y a la UAAAN

Que de ellos tomé sus buenos consejos y ejemplos para llegar hasta aquí.

Con cariño y admiración, les dedico este logro como una más de mis metas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Pag.

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	3
Objetivo.....	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Historia y origen	4
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	5
Botánica y morfología	5
PRODUCCIÓN	6
Nivel Mundial	6
Nivel nacional	7
IMPORTANCIA ECONÓMICA	9
CARACTERÍSTICAS GENERALES	10
<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.....	10
Ubicación taxonómica.....	11
Características morfológicas de <i>P. cinnamomi</i>	11
Micelio.....	11
REPRODUCCIÓN	12

Reproducción asexual.....	12
Reproducción sexual.....	15
Oogonio reproducción sexual	15
Anteridio (Órgano sexual)	16
Oospora	16
Ciclo biológico de <i>P. cinnamomi</i>	16
Sintomatología	17
Diseminación de <i>P. cinnamomi</i>	18
Factores ambientales y su relación con el hospedante y el patógeno.....	19
ESTRATEGIAS DE CONTROL	23
Métodos preventivos.....	23
Control químico.....	24
Control Biológico.....	25
Suelos supresivos.....	26
Resistencia genética.....	28
Control físico.....	29
Efecto del acolchado de la actividad microbiana en el suelo	29
Acción del acolchado y control de patógenos del suelo	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
MUESTREO	32
Aislamientos del hongo.....	32
Purificación y multiplicación de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	33
Identificación de oomycetos.....	33
TASA DE CRECIMIENTO	34
Medios de cultivo utilizados	34
Parámetros a Evaluar.....	35
Diseño Experimental.....	35

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Identificación de oomyceto.....	37
CONCLUSIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	52

ÍNDICE DE CUADROS

Pag.

Tabla 1. Producción de aguacate por estado.....	8
Tabla 2. Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.....	9
Tabla 3. Aislamiento de muestras.....	36
Tabla 4. Tasa de crecimiento de los medios alternativos evaluados.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Porcentaje de aportación por continente	7
Figura 2. Principales países productores de aguacate en el Mundo	7
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en raíces de aguacate.	17
Figura 4. Morfología de crecimiento en medio de cultivo PDA y estructuras formadas, A: <i>Mortierella</i> spp. B: <i>Fusarium</i> spp.....	37
Figura 5. Morfología de crecimiento en los diferentes medios de cultivo en donde A: PDA, B: Chicharo-Agar, C: V8®-Agar y D: Centeno-Agar.	38
Figura 6. Estructuras morfológicas de <i>P. cinnamomi</i> en diferentes medios A) Centeno, clamidospora; B) V8, oogonio; C) Chicharo, clamidospora; D) PDA, Micelio turuloso.	38
Figura 7. Interacción de las 3 cepas de <i>P. cinnamomi</i> de los 4 medios evaluados	40

RESUMEN

Persea americana se caracteriza por su gran variabilidad y por ser una de las familias del reino vegetal más numerosas, con alrededor de 92 géneros descritos y un número indeterminado de especies que varía de 2.840 a 3.340 que se distribuyen por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El estudio de la macrobiótica del suelo cobra mayor importancia en el complejo marchitez del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*) debido a que en esta patología pueden estar implicados agentes causales de tipo biótico y abiótico, siendo el Oomycete *Phytophthora cinnamomi* (Rands) es una de las principales enfermedades radicales, del cultivo de aguacate. El objetivo del trabajo fue, evaluar la tasa de crecimiento en 4 medios alternativos como V8, PDA, Centeno-gar y Chicharo-agar. En los resultados obtenidos por medio de una gráfica de relación entre medios lo que indica que el medio de cultivo Chicharo-agar predomina en el mayor crecimiento tomado en el tiempo de 120 hrs. El cual podemos destacar que el trabajo en laboratorio ya realizado, si existe un rango de crecimiento altamente significativo.

Correo electrónico; Carlos Uriel Flores Salinas, uriel_31_buitre@hotmail.com

Palabras clave: *Persea americana*, *Phytophthora cinnamomi*, Medios Alternativos.

INTRODUCCIÓN

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

P. americana Mill pertenece a la familia *Lauraceae*, uno de los grupos de angiospermas más antiguos (Renner, 1999). Se caracteriza por su gran variabilidad y por ser una de las familias del reino vegetal más numerosas, con alrededor de 92 géneros descritos y un número indeterminado de especies que varía de 2.840 a 3.340 que se distribuyen por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Renner, 2004).

La productividad del cultivo en esta amplia gama de ambientes, depende de un conjunto de factores, algunos más o menos ligados con las características agroambientales de los huertos. Sin embargo factores bióticos y abióticos como lo son heladas, granizadas, vientos fuertes, nutrición, el riego, la presencia de plagas como trips, *Frankinella* spp, *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché), *Scirtotrips* spp, (Terebrantia: Thripidae), *Pseudophilotrips perseae* (Watson) araña roja, *Oligonychus punicae*. Hirst. (Acarina: Tetranychidae) y enfermedades como roña (*Sphaceloma perseae*) y antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* Penz), son la amplia gama de limitantes para obtener los rendimientos y calidad de fruto esperado (Anguiano et al., 2003).

La microbiota del suelo, puede servir como un bio-indicador de la salud de los ecosistemas y agro ecosistemas, reflejando el efecto de los procesos agrícolas y el manejo de los recursos sobre este componente, afectando tanto su biodiversidad, como la densidad de las poblaciones microbianas (Buckley & Schmidt, 2003; Girvan et al., 2004; Ariena et al., 2006)

Estas variables pueden verse reducidas por el efecto de las prácticas agrícolas basadas en productos químicos y pueden recuperarse con medidas como la aplicación de algunas fuentes de materia orgánica (Richter *et al.*, 2011).

El estudio de la macrobiótica del suelo cobra mayor importancia en el complejo marchitez del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*) debido a que en esta patología pueden estar implicados agentes causales de tipo biótico y abiótico, siendo el Oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands (1922) el más relevante, el cual puede causar pérdidas económicas considerables, al no realizar un correcto manejo de esta enfermedad, donde se deben buscar medidas con el medio ambiente tratando de generar el menor desequilibrio en los agro ecosistemas (Pérez, 2008; Richter *et al.*, 2011). La tristeza es la enfermedad más importante del cultivo de *P. americana* en el mundo, uno de los patógenos más destructivos en el cultivo, ocasionando la muerte descendente de los árboles. La enfermedad fue descrita en 1922 por Rands en arboles de canela; siendo detectado atacando aguacatero por primera vez en E.U.A. en California, se le considera como la enfermedad más importante del aguacate, para la década de los 1980's se tenía 1500 ha afectadas (Zentmyer, 1980). En Perú en 1950 se calcularon 50,000 árboles enfermos. También se le ha encontrado en Brasil, Trinidad, Cuba, Puerto Rico, Hawaii, Honduras y Argentina (Vidales, 1999). En Australia el patógeno se ha encontrado como parte de la micro-flora en suelos forestales, en 1965 se le considero el problema más fuerte. En Sudáfrica para 1971 se tenía afectando el 20% de las huertas y para 1977 se consideró el problemas más fuerte pues ya afectaba el 50% de la plantaciones en la región de Queensland, (Weste, 1994). En México se encontró en Tamaulipas, Puebla, Chipas, Veracruz, Nayarit, Morelos. En puebla, se han observado niveles de incidencia del 75% en los arboles de aguacate. Mientras que en Querétaro ocasiono la desaparición del cultivo (Téliz *et al.*, 1989). Así mismo se han detectado en 1977 con 13,000 árboles enfermos, distribuidos en áreas muy localizadas de los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, San Juan Nuevo, Tinguindin, Los Reyes y Ziracuaretiro (Vidales, 1999)

Justificación

La evaluación de 4 medios de cultivo para el aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* aportara información sobre la tasa de crecimiento de dicho fitopatógeno.

Objetivo

Tiene como objetivo el presente trabajo la evaluación *in vitro* de cuatro medios de cultivo para determinar la tasa de crecimiento y estructuras morfológicas características de *P. cinnamomi*.

Hipótesis

Existen medios alternativos en los cuales *Phytophthora cinnamomi* presenta un crecimiento más acelerado y así poder determinar la tasa de crecimiento

REVISIÓN DE LITERATURA

Historia y origen

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

México es considerado como el país con mayor diversidad de aguacate en donde existen 20 diferentes especies emparentadas con el aguacate, *Persea americana*. De acuerdo con Barrientos *et al.*, (2000), mencionan que se reconocen tres razas: la Mexicana, la Antillana y la Guatemalteca. Bergh y Ellstrand, (1986 y 1992) clasificaron las variedades botánicas, quedando la raza mexicana como *Persea americana* var. *drymifolia*, la raza Antillana como *P. americana* y la raza Guatemalteca como *P.americana* var. *guatemalensis*.

En el Códice Florentino escrito por Sahagún (1549), citado por Garibay en 1979, mencionan tres tipos de aguacate aoacatl, tlacacolaoacatl y quiloaoacatl, los que de acuerdo con sus descripciones posiblemente representan las tres razas mencionadas anteriormente, cada una con características morfológicas y fisiológicas diferentes (Barrientos *et al.*, 2000).

La domesticación de la raza Mexicana y Guatemalteca ocurrió en las regiones altas de México y Guatemala, la raza Antillana se originó en la Costa del Pacífico Centroamericano, desde Guatemala hasta Costa Rica (Storey *et al.*, 1986, Bergh y Ellstrand, 1986 y Bergh, 1992).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Clase: Dicotiledoneas

Subclase: Diapétales

Orden: Ranales

Familia: *Lauraceae*

Género: *Persea*

Especie: *P. americana* Fersini (1975).

Esta especie, pertenece a la familia de las *Lauraceae*, la cual es considerada junto a otras como la más primitiva de las dicotiledóneas; está formada por árboles o arbustos y algunas parasitas trepadoras. La familia *Lauraceae* comprende cerca de 49 géneros y alrededor de 1000 especies distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Avilan *et al.*, 1995).

Botánica y morfología

Es una planta perenne, de gran crecimiento vegetativo, llegando en su hábitat natural a una altura de 10 a 12 metros. Con raíces superficiales, que absorben agua y nutrientes principalmente en las puntas a través de los tejidos primarios; esto determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad que induce a ataques de hongos y pudriciones vasculares. Las ramas son abundantes, delgadas y frágiles, sensibles a las quemaduras de sol y a las heladas, se rompen con facilidad al cargar muchos frutos o por acción del viento, las flores son hermafroditas, simétricas, de color verde amarillento.

Las hojas son alternas, pecioladas y simples, de forma variable: oval-oblongas u obovado- ovales, elípticas o aovadas y están provistas de yemas axilares. El ápice es más o menos agudo según la raza. La dimensión de las hojas varía mucho (de 5 a 20 cm de longitud y de 3 a 10 cm de ancho). La cara superior es galabra mientras que la inferior es pubescente. La nervadura principal tiene

color amarillo pálido y especialmente es prominente en la cara inferior (Calabrese, 1992).

El sistema radical se caracteriza por presentar diversidad de formas, sin embargo, está constituido por una raíz columnar primaria, notablemente ramificada en haces secundarias y terciarios, el ápice de las raíces está protegido por la caliptra, pero el cuerpo está desprovisto de pelos radicales, la absorción de agua se realiza a través de las células corticales las cuales se alargan y suberizan constituyendo la exodermis, la cual tiene como función proteger el parénquima cortical. El deterioro o daño que puede sufrir la exodermis, determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad que induce el ataque de hongos que infectan los tejidos (Avilan *et al.*, 1995).

Los frutos de *P. americana* son de tamaño diverso, los hay de cascara lisa, rugosa, fina, gruesa, mediana y delgada. Su color puede ser de diferentes tonos, desde verde, rojizo, marrón, morados hasta negros. Su forma es variada, los hay piriformes, ovaladas, redondas o elípticas (Calabrese, 1992).

PRODUCCIÓN

Nivel Mundial

La producción mundial del cultivo del aguacate oscila 4,700,000 toneladas de aguacate, siendo el continente americano el principal productor con el 70.3% de la producción, lo que equivale a 3,317,609.00 ton, la aportación de los demás continentes se observa en la (figura 1) situándose 4 de los principales países productores de aguacate en este continente (figura 2).

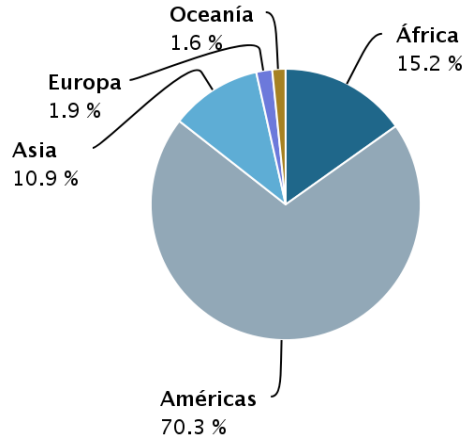


Figura 1. Porcentaje de aportación por continente (Tomada de FAOSTAT, 2013).

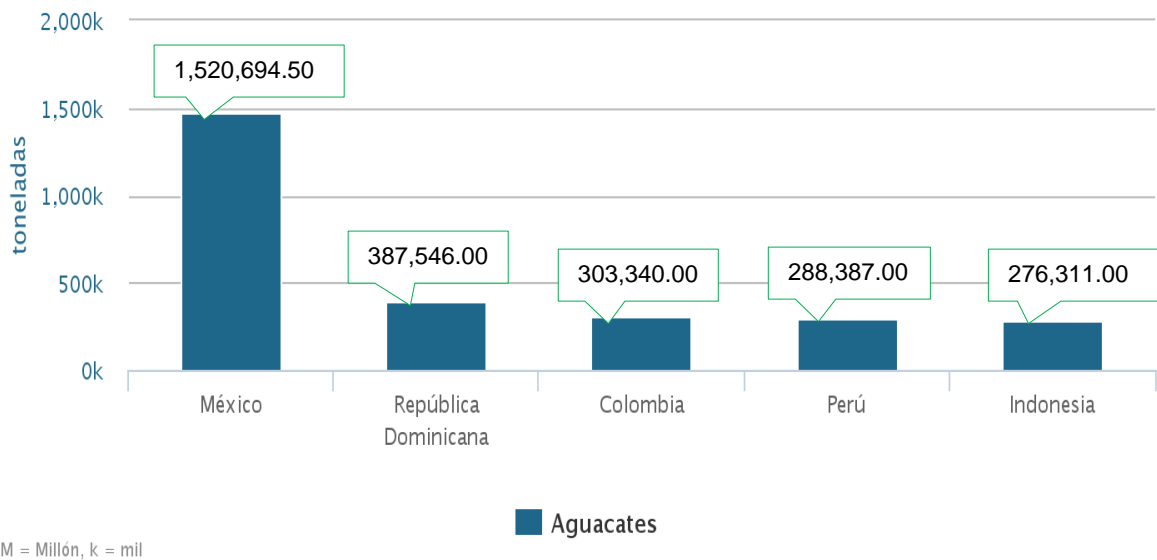


Figura 2. Principales países productores de aguacate en el Mundo (Tomado de FAOSTAT, 2013).

Nivel nacional

México es el principal productor y consumidor de aguacate (*Persea americana*) en el mundo, con una producción de 1,520,694.50 ton, con una superficie de 121 491 ha (SIAP, 2013). Siendo Michoacán, Jalisco, México y Nayarit los principales estados productores (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de aguacate por estado (SIAP, 2014).

Ubicación	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Michoacán	127,084.07	118,606.98	1,219,553.58	10.28	17,452,759.26
Jalisco	14,976.00	10,827.11	100,250.33	9.26	1,393,565.91
México	7,420.00	5,841.50	64,928.13	11.12	686,993.35
Nayarit	5,329.87	4,211.95	36,691.01	8.71	301,540.46
Guerrero	4,251.49	2,804.19	14,827.79	5.29	134,541.55
Morelos	3,763.00	3,405.50	27,656.05	8.12	245,596.87
Chiapas	3,293.40	1,022.00	7,547.55	7.38	80,978.16
Puebla	2,869.50	2,180.00	11,758.05	5.39	48,121.33

Siendo el estado de Michoacán el principal productor, con una aportación de 1,219, 553.58 ton, lo que representa un 80.19% de la producción total del país (SAGARPA-SIAP, 2014). Los principales municipios productores en el estado de Michoacán se muestran en la tabla 2; que representan el 60.2% de la superficie total plantada en el estado, es decir 127, 048.07 ha, con un rendimiento de 10.28 t/ha, un valor de producción 17,452,759.26 miles de pesos (Tabla 2).

Tabla 2. Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.(Tomada de SIAP, 2014).

Municipio	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Tancítaro	21,600.00	21,600.00	206,812.00	9.58	2,707,457.89
Tacámbaro	14,232.00	13,760.00	140,782.18	10.23	2,134,622.28
Salvador E.	14,194.00	12,793.00	141,822.00	11.09	1,992,804.88
Uruapan	14,030.00	14,030.00	141,107.80	10.06	2,012,418.50
Ario	12,536.00	11,445.00	128,058.50	11.19	1,782,663.96
Peribán	12,393.00	12,378.00	137,268.22	11.09	2,179,778.26
Nuevo Parangaricutiro	6,500.00	6,500.00	63,339.00	9.74	911,208.32
Ziracuaretiro	3,770.00	3,770.00	34,935.50	9.27	496,220.73
Los Reyes	3,769.60	2,890.00	33,166.00	11.48	512,555.05
Tingambato	3,036.00	3,036.00	29,259.00	9.64	388,929.76

IMPORTANCIA ECONÓMICA

Su importancia es innegable ya que por sí mismo, representa el 50% del PIB primario estatal y el ingreso de divisas frescas de más de 500 millones de dólares anuales (APEAM, 2012). A nivel nacional superan los 25,000 productores, con un crecimiento de la industria aguacatera de aproximadamente el 2.5% anual, participando más de 400 empacadores, establecidos el 80% en el estado de Michoacán, lo que genera la contratación de más de 115,000 empleos de manera directa e indirecta, beneficiando aproximadamente a 500,000 personas, (COMA, 2005).

La apertura del mercado estadounidense en la temporada de noviembre 1997- febrero 1998, el aguacate mexicano ha permitido incrementar las exportaciones con los beneficios económicos que trae respecto al fortalecimiento de la generación de empleos, así como la baja proporción de producción destinada a exportación indica que existe potencial para incursionar en diferentes mercados.

CARACTERÍSTICAS GENERALES

***Phytophthora cinnamomi* Rands.**

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

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

En México, la tristeza del aguacatero ha afectado seriamente huertos de aguacate, como los que se encuentran en Querétaro, Comonfort, Gto. Atlixco, Pue. y Uruapan, Mich. En Michoacán, *P. cinnamomi* ataco a 5500 árboles ocasionando su muerte. En 1994 la tristeza del aguacatero causo declinación en 100 mil árboles de aguacate en Uruapan, Mich., repercutiendo en la baja productividad del aguacate Hass y causando pérdidas económicas para los productores por más de 32 millones de pesos (Vidales *et al.*, 1994 y Newett *et al.*, 2002).

Ubicación taxonómica

El género *Phytophthora* pertenece a (Tuset, 1977).

Reino: Cromista

Phylum: Oomycota

Clase: Oomicete

Sub clase: Peronosporomycetidae

Orden: Peronosporales

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora cinnamomi* Rands

Características morfológicas de *P. cinnamomi*

P. cinnamomi se clasifica en la sección VI de Waterhouse (1963) en la clave para las especies de *Phytophthora* De Bary. Esto es según la descripción original del fitopatógeno, publicado por Rands en 1922. Más tarde, Ribeiro (1978), estableció claves para la fácil identificación de *Phytophthora cinnamomi* (Birch y Whisson 2001 y Hardham, 2005).

Micelio.

Todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo, de paredes paralelas o irregularmente calibradas, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. El micelio es cenocítico, observándose solo raramente la presencia de algunos tabiques que normalmente se encuentran separando las partes viejas carentes de protoplasma (Waterhouse, 1963; Feld, 1979).

Existen algunas especies en las cuales, bajo ciertas condiciones de cultivo, el micelio se presenta turuloso, con protuberancias y vesículas como por ejemplo en *P. cinnamomi*, *P. cactorum* y *P. cryptogea* (Waterhouse, 1963; Feld, 1979).

En los medios de cultivo el micelio se presenta aéreo, el cual puede ser marcadamente radiado o ligeramente estrellado, presentándose los bordes de la colonia redondeados o sinuosos y sumergido en el medio siendo precisamente en este último en el que pueden diferenciarse las protuberancias y engrosamientos, más o menos notable (Tuset, 1977). El micelio es capaz de vivir de forma saprófita sobre las partículas de materia orgánica del suelo en ausencia del huésped (Gallo, 1984; Gallo *et al.*, 1990).

Es importante señalar que en el cultivo *in vitro* se pueden originar variaciones del aspecto del micelio en algún sector de la colonia, las cuales pueden ser relevantes tanto macroscópica como microscópicamente en cuanto a la morfología, así como desde el punto de vista fisiológico y parasitario, debido a la posibilidad de producirse nuevas razas más virulentas (Feld, 1979).

Cuando las especies del género *Pythophthora* son cultivadas *in vitro* el desarrollo del micelio se ve condicionado por varios factores tales como la composición del medio, la temperatura, los nutrientes, la tensión de oxígeno y de CO₂, el pH y en menor escala la luz (Tuset, 1977; Estoup y Anger, 1998).

El tipo de medio ejerce una influencia muy importante en la velocidad de crecimiento, el cual se ve favorecido en aquellos ricos en hidratos de carbono. Es importante resaltar el papel que ocupa la temperatura entre los factores que limitan el crecimiento vegetativo, razones por las cuales constituye un parámetro de elevada relevancia en la taxonomía. El margen de temperatura en el cual está comprendido el desarrollo del micelio va desde 1°C de temperatura mínima hasta los 37°C como máxima temperatura de crecimiento activo, situándose entre los 20-28°C la temperatura óptima para la mayoría de las especies, teniendo en cuenta que este valor es específico para cada una de ellas (Feld, 1979).

En el caso del pH el rango permisible para el cultivo *in vitro* de estas especies se encuentra entre 3.5 y 10, siendo el crecimiento óptimo específico para la mayoría de las especies, encontrándose en un rango entre 4.5 y 5.5. Generalmente, los valores de pH que permiten el mejor desarrollo del micelio, también son favorables para la producción de esporangios, clamidosporas y oosporas (Feld, 1979).

REPRODUCCIÓN

Las especies del género *Phytophthora* presentan dos tipos de reproducción: asexual (con la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas) y sexual (mediante la formación de oosporas) (Zentmyer, 1986).

Reproducción asexual.

El esporangióforo no se diferencia normalmente de las hifas, aunque en algunas ocasiones este puede ser más ancho o delgado que éstas y puede presentar hinchamientos. La presencia de esporangios es común para todas las especies del género, son incoloros o de color amarillo tenue y de manera general se insertan terminalmente en el esporangióforo, aunque también pueden estar intercalados. El esporangio muchas veces presenta vacuolas y al microscopio se observa un aspecto granuloso en su interior. (Zentmyer y Mitchell, 1986).

Existen características del esporangio que son muy importantes para la taxonomía de las especies como su forma y tamaño, la presencia o no de la papila y sus dimensiones, la manera en que estos se producen, así como la mayor o menor facilidad de este para desprenderse del esporangióforo (esta última característica permite clasificarlos en caedizos si se desprenden fácilmente del esporangióforo y no caedizos si se desprende difícilmente) siendo también importante desde el punto de vista taxonómico la longitud del pedicelo que va unido al esporangio cuando este se desprende del esporangióforo (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Existen factores que afectan la producción y el desarrollo de los esporangios como son: la humedad, la tensión de oxígeno, la luz, la temperatura y la nutrición. La presencia de humedad es fundamental para la formación de esporangios, aunque la cantidad necesaria de la misma varía para cada especie. En la mayoría de las especies los esporangios se producen más abundantemente en presencia de luz, aunque el efecto de la misma es muy variable, llegando a estimularla en algún caso e inhibiéndola en otros (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

El factor temperatura, que como se indicó anteriormente ejerce una gran influencia en el desarrollo vegetativo del hongo, también influye grandemente en el desarrollo y formación del esporangio. La temperatura óptima para la producción de esporangios es diferente y específica para cada especie, por lo que juega un papel destacado en la taxonomía, las mismas están comprendidas entre los 20 y los 28°C (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Las zoosporas se forman dentro del esporangio, para lo cual es necesario la presencia de agua libre. La formación de estas puede estimularse in vitro cuando se incuba un cultivo con esporangios durante pocos minutos a temperaturas entre 5 y 10°C. La exposición más prolongada a estas temperaturas (10-15 minutos) provoca que las zoosporas sean liberadas, lo cual constituye la forma de germinación indirecta de estos hongos (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Las especies de este género presentan además una forma de germinación directa, en la cual el tubo germinativo se origina, principalmente, a partir de la papila del esporangio, este a su vez puede dar lugar rápidamente al micelio o producir un nuevo esporangio, todo lo cual depende de las condiciones del medio de cultivo (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Las zoosporas son las estructuras primarias que causan una nueva infección de las raíces. Estas esporas pueden nadar cortas distancias en el suelo con elevada humedad, así como también pueden ser transportadas grandes distancias en el agua de irrigación o por las lluvias. Además de esta forma de dispersión las especies de *Phytophthora* pueden dispersarse en la naturaleza por el aire o siendo transportadas por la actividad de los humanos y algunos invertebrados (Ristaino y Gumpertz, 2000).

Los miembros de este género producen además clamidosporas, las cuales constituyen un órgano de conservación y supervivencia (Feld *et al.*, 1979). Generalmente son de forma redondeada con una pared bien definida (más de 2 micras de espesor), siendo comúnmente intercalares aunque también pueden encontrarse en el extremo terminal de la hifa. Al principio las clamidosporas son hialinas, tornándose de un color amarillo o ligeramente marrón con la edad. Es importante señalar que no se forman en todas las especies, por lo cual su

presencia es importante para la taxonomía de las mismas (Boccas y Laville, 1976; Tuset, 1977).

Las clamidosporas pueden germinar dando lugar a numerosos tubos germinativos o a la producción de esporangios, lo cual dependerá de la cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo. En cuanto a la influencia de la temperatura se plantea que un rango entre 18-30°C es óptimo para que ocurra la germinación de las clamidosporas, aunque también se ha producido germinación entre 9-12°C y a 33°C, el pH óptimo para que ocurra este proceso está comprendido entre 5 y 7, aunque a valores de pH de 3 y 9 también se ha producido germinación de las clamidosporas (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Además es importante mencionar que las clamidosporas que persisten en el suelo constituyen también unidades infectivas (Gallo *et al.*, 1990).

Reproducción sexual.

Los órganos sexuales constituyen el elemento taxonómico más constantes y por tanto son de gran valor en la clasificación de las especies. No todas las especies los producen o se muestran inconstantes en cuanto a su formación, por lo que en algunos casos se requieren medios de cultivo especiales. Incluso en la naturaleza existen casos, como por ejemplo *P. citrophthora*, donde no se ha observado la producción de estos órganos de reproducción (Boccas y Laville, 1976; Tuset, 1977).

Oogonio (Órgano sexual)

Es de forma esférica o ligeramente ahusada, usualmente se encuentra en el ápice de una hifa, aunque también puede aparecer intercalado, separado del resto de la hifa por un grueso tabique. En cultivos jóvenes es hialino pero posteriormente, con el envejecimiento, se torna amarillo o ligeramente marrón. En la mayoría de las especies es suave y puede presentar ligeras protuberancias o verrugas en algunos casos (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Anteridio (Órgano sexual)

Presenta una forma variable, puede ser esférico, oval, en forma de clavo o cilíndrico. Observándose de manera habitual solitario, hialino y con una pared externa delgada. Su disposición respecto al oogonio puede ser anfígeno o paragino, o ambas a la vez, siendo importante tener en cuenta esta disposición para realizar la clasificación taxonómica de las especies (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Oospora

Siempre se presenta de manera individual, ocupando relativamente toda la cavidad del oogonio. Es de forma esférica, lisa o moderadamente verrugosa, y su coloración puede ser hialina o ligeramente amarillo oscuro (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Ciclo biológico de *P. cinnamomi*

La pudrición de raíces por *Phytophthora cinnamomi* es una enfermedad importante por que sobrevive por varios años en raíces y suelo en forma de clamidosporas, aun en ausencia de plantas hospedantes. La autoinfección de las raíces es un sistema dinámico cuando la temperatura en el suelo se incrementa de 24 a 28°C y existe humedad excesiva por efectos de riegos pesados, lluvia abundante, inundación o cuando hay mal drenaje. Las clamidosporas germinan y dan origen a hifas del hongo que se conocen en forma colectiva como micelio, reiniciando el ciclo de infección. El micelio origina clamidosporas y otras estructuras especializadas (esporangios) que contienen zoosporas (Andrade *et al.*, 2012).

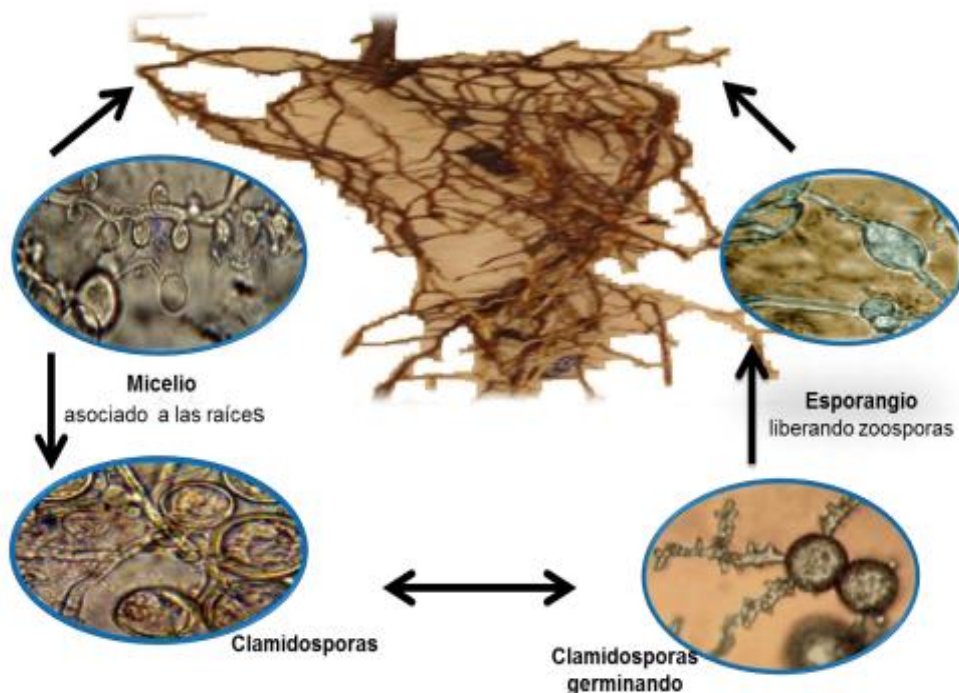


Figura 3. Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi* en raíces de aguacate Tomado de (Andrade *et al.*, 2012).

Las zoosporas son las estructuras que constituyen el inoculo primario y secundario del hongo, causando nuevas infecciones de las raíces. Estas zoosporas tienen movimiento propio y se desplazan con agilidad sobre la superficie del agua, pueden nadar cortas distancias en el suelo con alta humedad, se pueden transportar a grandes distancias en el agua de riego o por las lluvias. Además, esta forma de dispersión le permite llegar a las raíces jóvenes en cuestión de minutos y horas. El avance de la infección pudre gran volumen de raíces y las plantas desarrollan los síntomas de la enfermedad conocida en México como la tristeza del aguacatero que cuando logra infectar la base del tronco el árbol de aguacate desarrolla la enfermedad del cancro (Zentmyer 1980, Coffey 1991 y Téliz *et al.*, 2007).

Sintomatología

P. cinnamomi causa varios tipos de lesiones en diferentes hospedantes y también puede llegar a evadir más de una parte del mismo hospedante. En aguacate, primero invade las raíces absorbentes (1 a 3 mm de diámetro), provocando pudrición de color marrón a negro, con progresión en raíces más

desarrolladas. Por lo que el primer síndrome en arboles infectados es un marchitamiento de la planta por pudrición de raíces conocida como la tristeza del aguacatero (Zentmyer, 1985), debido a que disminuye la absorción de agua y nutrientes, induciendo también clorosis general, que finalmente causa defoliación. Estos síntomas se presentan en cualquier etapa biológica de la planta. Al perder la vigorosidad el árbol infectado produce gran cantidad de frutos pequeños que son generalmente abortados antes de su madurez y finalmente el árbol muere (Zentmyer, 1985 y Téliz *et al.*, 2007).

Este patógeno también invade la base del tronco y se desarrollan síntomas de cancro del tronco que llega a alcanzar e uno a dos metros de altura y que se caracteriza por presentar coloración de café claro a oscuras debajo de la corteza y exudaciones acuosas acompañadas en algunas ocasiones de gomosis y polvo blanco en la superficie del tronco. En las plántulas de aguacate, *P. cinnamomi* produce necrosis y constricción del tallo (Zentmyer, 1980, Ceja *et al.*, 2000). En 1959, se observaron por primera vez en California, síntomas de cancro en árboles de macadamia y aguacate. En 1960 se comprobó que el agente causal del cancro en estos árboles era ocasionado por *P. cinnamomi* (Zentmyer *et al.*, 1961 y Zentmyer, 1980). En Michoacán, México Ceja *et al.* (2000) reportan la incidencia de cancro en aguacate de 1 a 90%. Cuando *P. cinnamomi* infecta la base del tronco generalmente los síntomas alcanzan hasta un metro de altura y finalmente el árbol muere (Vidales, 1994).

Diseminación de *P. cinnamomi*

La diseminación juega un papel importante en la distribución nacional y mundial del Oomyceto *P. cinnamomi* puede ser diseminado a nuevas áreas por movimiento del suelo, movimiento de material vegetal con suelo, paso de maquinaria, en el equipo y agua de riego en los zapatos, por transporte en las pezuñas de los animales y llantas de vehículos. Sin embargo, por lo que se ha observado en los bosques de Australia se puede indicar que es el hombre el que más ha contribuido a la diseminación de la enfermedad (Zentmyer, 1980).

Factores ambientales y su relación con el hospedante y el patógeno

En los factores ambientales se incluyen factores físicos (temperatura, humedad, textura del suelo entre otros) químicos (pH e intercambio iónico) y biológicos (bacterias, hongos y el crecimiento y el crecimiento radical entre otras). Cada uno de estos y sus componentes varían en el tiempo y espacio, y cada interacción lleva consigo una secuela de interacciones, por lo que se conoce al ambiente como dinámico, heterogéneo y de gradiente complejo (Cook y Baker, 1983; Duniway, 1983).

La aplicación en exceso del agua y el riego y de las lluvias es el factor más importante en la diseminación de la enfermedad en el campo, porque favorece la reproducción de *P. cinnamomi* debido a que produce esporangios y estos liberan zoosporas (Duniway, 1983; Grove y Boal, 1991).

Una vez que un fitopatógeno se ha introducido a un suelo conductivo, el incremento en el inóculo y desarrollo de la enfermedad depende de los factores físicos, químicos y biológicos (Campbell, 1986). La habilidad de los fitopatógenos para causar epidemias bajo condiciones ambientales diferentes, es ayudada por el fenómeno de compensación o tolerancia. La tolerancia es expresada en patógenos que desarrollan en amplio rango e condiciones o requieren de condiciones específicas para desarrollarse, pero pasan periodos de condiciones adversas con estructuras dormantes altamente resistentes. La compensación se extiende en el espacio de la enfermedad cuando es afectada o un máximo de condiciones. Además, las evidencias circunstanciales y experimentales han sugerido que el campo está involucrado en más de una categoría de compensación (Barr, 1992; Dick, 1995).

Todos los factores físicos son importantes para la actividad de los microorganismos en el suelo, pero ninguno es más dinámico en el tiempo y el espacio que el agua y la aireación en el suelo. El agua es el factor primario y afecta selectivamente la actividad de los microorganismos por lo menos en cuatro formas: 1) intercambio de gases (aireación del suelo), 2) difusión de solutos, 3) movilidad de organismos y 4) energía libre (potencial de agua), la cual determina la disponibilidad de agua para el crecimiento, nutrición y metabolismo (Cook y Baker, 1983; Grove y Boal, 1991).

Algunos de los cambios físicos y bioquímicos que ocurre en la planta durante la tensión de humedad pueden ser importantes en el progreso de la enfermedad incluyendo, en el crecimiento radical, pérdida de turgencia, cambios en la síntesis de proteína y funcionamiento inadecuado de enzimas. La tasa de respiración puede ser suficiente para mantener las células, pero no para proveer defensa contra patógenos (Cook y Baker, 1983; Sivasithamparam, 1991).

La saturación de agua puede predisponer al hospedante y permitir la infección donde el oxígeno es suficiente para la actividad de las zoosporas. Los resultados experimentales sugieren que *P. cinnamomi* tiene la capacidad de formar esporangios en la mayoría de las condiciones de humedad que predominan en los suelos agrícolas durante el desarrollo del cultivo (Duniway, 1983; Dick, 1995).

Los requerimientos de humedad han sido ampliamente estudiados en laboratorio e invernadero. La humedad del suelo juega un papel importante tanto en la susceptibilidad del hospedante, como en varias fases del ciclo de vida del patógeno. La mayor incidencia está fuertemente correlacionada con abundante humedad y drenaje pobre. Los suelos pobremente drenados permanecen húmedos por mucho tiempo, dando oportunidad a la pudrición y liberación de zoosporas Weste, (1983). Grove y Boal, (1991) detectaron mayor germinación de esporangios en suelos con altos niveles de humedad. El crecimiento del micelio y la producción de clamidosporas ocurre en contenidos altos de humedad, por lo que la pudrición radical inducida por *P. cinnamomi* tiende a ser más severa en áreas de humedad constante (Sivasithamparam, 1991). Al mantener la humedad constante se presenta un incremento en las poblaciones de microorganismos del suelo, algunos de los cuales son antagónicos a *Phytophthora* spp. (Weste, 1983).

En el ambiente en suelo, no es suficiente con definir el efecto de la humedad si considerar que otros factores actúan simultáneamente y están condicionados por la humedad del suelo (Pegg y Whiley, 1987). La aireación es una función inversa del contenido de humedad y tiene influencia sobre el crecimiento radical y las enfermedades inducidas por fitopatógenos con origen en el suelo (Cook y Baker, 1983; Kinal *et al.*, 1993). El requerimiento de oxígeno en la raíz es mayor en los puntos de crecimiento donde la respiración es más activa. El ápice radical es el primero en causar un crecimiento y morir cuando hay carencia de oxígeno (Cook y

Baker, 1983). Siguiendo a la detención de la respiración en los ápices radicales, la respuesta de la planta puede incluir 1) baja absorción de agua por la pérdida de turgencia y marchites de hojas, 2) disminución en la producción de giberelinas y citoquininas y un incremento en el abastecimiento de etileno hacia la parte superior, lo que da como resultado un detenimiento en el crecimiento de brotes y senescencia de hojas, 3) continuación de glicolisis por algún tiempo lo que trae como consecuencia que haya una acumulación de etanol y otros productos de fermentación anaeróbica que pueden difundirse a la raíz al suelo (Cook y Baker, 1983), favoreciendo la atracción quimiotáctica de las zoosporas de *P. cinnamomi* a la raíz, por el etanol liberado (Hardham *et al.*, 1991; Kinal *et al.*, 1993).

Así mismo, el etileno es acumulado en el suelo durante los periodos de anaerobiosis con un profundo efecto sobre las raíces de las plantas y posiblemente sobre el desarrollo de la enfermedad. La presencia de etileno acelera la senescencia del tejido vegetal expuesto, lo cual incrementa la susceptibilidad del tejido a ciertos parásitos débiles. La mayoría de los trabajos de investigación sobre la predisposición a enfermedades de la raíz expuestas a inundación no distinguen entre el efecto de bajo nivel de oxígeno y la concentración elevada de etileno (Cook y Baker, 1983).

En la actualidad las pudriciones radicales por *Phytophthora* spp. han atraído el interés de los investigadores, porque las mismas condiciones que favorecen la información y dispersión de zoosporas, pueden predisponer al hospedero a la infección (Weste, 1983; Kinal *et al.*, 1993).

Los estudios del efecto de la temperatura, sobre las enfermedades de las plantas, son generalmente basados en la temperatura del suelo. Para un entendimiento de la influencia de la temperatura sobre la actividad del patógeno o interacción patógeno-antagonista-planta, se requiere del conocimiento de la temperatura de la planta. Además, la temperatura de la planta también afecta la susceptibilidad de ésta a patógenos (Cook y Baker, 1983).

Zentmyer (1985) relaciona la curva de crecimiento de *P. cinnamomi* con la del hospedero a diferentes temperaturas y observa que las curvas se comportan de manera similar excepto a 33°C en que el hospedero desarrolla bien y el patógeno es inhibido en especies forestales susceptibles también se observa que la

colonización ya avance del patógeno en la raíz, siempre es dependiente de la temperatura de la raíz y que a 28°C el Oomycete se dispara abundantemente por todo el sistema radical (Grant y Byrt, 1984).

Existe una porción del año en que las condiciones son más favorables para el crecimiento e infección micelial para la formación de esporangios y la infección de zoosporas. Durante el invierno el crecimiento del patógeno y la formación esporangial es limitada por las bajas temperaturas; la supresión microbiana también es restringida. La inactivación de *P. cinnamomi* está directamente relacionada con temperaturas inferiores de 0°C. La inactivación del micelio ocurre a 2, 6, ó 16 días a - 6.7°C, -3.8°C y -1.4°C respectivamente (Benson, 1987). La temperatura del suelo óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 20°C. El micelio se desarrolla entre 7.5 y 28°C con un óptimo 24°C. Las zoosporas no se producen a temperaturas inferiores a 17°C (Hardham *et al.*, 1991).

La curva de crecimiento de *P. cinnamomi* es similar a la del aguacatero, excepto a los 35°C, temperatura a la cual *P. americana* puede crecer y el patógeno no (Zentmyer, 1985). La predisposición del aguacate al ataque de *P. cinnamomi* puede ser inducida por diversos componentes químicos como exudados radicales, nutrientes y/o compuestos constituyentes del suelo. Los Oomycetes dependen en gran medida de los exudados radicales, por que infectan típicamente la zona apical de la raíz (Cook y Baker, 1983). *P. cinnamomi* infecta las la raíz cuando tiene desarrollos radicales rápidos y vigorosos (Campbell, 1986). La invasión parece estar relacionada con la exudación química y consecuentemente, la atracción es mayor cuando el desarrollo radical es más activo (Campbell, 1986).

Los elementos como N, P, K, Ca y Mg, no pueden ser aprovechados eficientemente por un sistema radical dañado o alterado, por lo que la planta con pudrición radical se debilita y el progreso de la enfermedad es más rápido (Cook y Baker, 1983). Las plantas deficientes estos nutrientes también producen poca raíz, situación relevante porque una planta en condiciones nutrimentales adecuadas y con desarrollo abundante de raíz, puede compensar el daño y mantener la tolerancia de la planta a la enfermedad (Cook y Baker, 1983).

En general el efecto del nitrógeno sobre las enfermedades ocasionadas por Oomycetes varía con diferentes combinaciones hospedante-patógeno. Algunos

efectos con altos niveles de nitrógeno han sido explorados con la pudrición radical causada por *P. cinnamomi*. Se ha demostrado que la concentración alta de nitritos en soluciones nutritivas reduce la pudrición radical de *P. americana*, pero concluyen que la alta salinidad de solución es la responsable del efecto. Se ha encontrado que el nitrito en soluciones nutritivas es más tóxico a *P. cinnamomi* que el aguacate, respuesta que depende del pH. Además señala la eficacia de altos niveles de nitrógeno en residuos orgánicos y harina de alfalfa, para el control de la pudrición radical. Se ha demostrado que los niveles de amoníaco tóxico a *P. cinnamomi* se presenta en suelos donde se aplica harina de alfalfa. Se ha encontrado que el ácido nítrico y el amoníaco producidos a pH 6 y 8, son responsables de la inhibición de *P. cinnamomi* en suelos mejorados con altos niveles de urea (Cook y Baker, 1983).

El nitrato de calcio a 100, 200 y 300 µg, nitrógeno y sulfato de amonio a 300 µg de nitrógeno por gramo de suelo reducen significativamente la pudrición radial en *Persea indica* en invernadero; bacterias y actinomicetes en suelos fertilizados con bajos niveles de sulfato de amonio son más abundantes que el testigo (Lee y Zentmyer, 1982).

El incremento en la concentración de las sales en suelos, producto del uso de agua salinas es otro medio por el cual las plantas pueden entrar en tensión y ser predispuestas a patógenos (Cook y Baker, 1983; Sulistyowati y Keane, 1992).

ESTRATEGIAS DE CONTROL

Métodos preventivos

La obtención de semilla sana por medio de tratamientos de agua caliente o con fumigantes es efectiva, pero como *P. cinnamomi* puede ser diseminado por agua de riego corriendo sobre suelos infestados hacia suelos no infestados se debe implementar un riego en forma de cajetes individuales para evitar que este hongo pase de un árbol enfermo a uno sano. La frecuencia de riegos tiene gran importancia en la tasa de incremento de pudrición de raíces de *P. americana*, en suelo infestado la enfermedad parece más pronto y causa daños más rápidos en árboles donde se dan riegos frecuentes y pesados (semanales) que en aquellos irrigados cada 15 días (Coffey, 1991).

Control químico

Darvas *et al.*, (1983), al trabajar con árboles de diez años de edad y en tres años de ensayo aplicaron 0.4g/m² de fosetyl aluminio en el área de sombra, 0.028 g/m² de metalaxyl y 0.4 g/m² de fosetyl-Al en el área de sombra; 0.028 g/m³ de metalaxyl y 0.4 g/m² de Dowco 444. Los efectos diferentes entre tratamientos en los primeros dos años fueron bajos, pero en el tercer año de aplicaciones de fosetyl-Al redujeron efectivamente la incidencia de *P. cinnamomi* en las raíces alimentadoras. Los otros tratamientos no fueron efectivos y el Dowco 444 fue fitotóxico en algunos árboles.

De Boer *et al.*, (1990) controla la tristeza del aguacate (*P. cinnamomi*) aplicando al cajete del árbol una solución de fosetyl- Al. Pegg *et al.*, (1990) controlan a *P. cinnamomi* en aguacate, con inyecciones al tronco y aplicaciones foliares de fosetyl – Al. Marks y Smith, (1990) controlan la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi* en *Rhododendrum*, *Levadendron*, *Eucalyptus*, con fosetyl–Al al suelo y al follaje.

Darvas, (1983 y 1984) observaron un excelente control de pudrición radical en arboles de *P. americana* totalmente al ser inyectados con fosetyl- Al dos veces por año en dosis de 0.4 g.i.a/m² del área de goteo. El tratamiento resulta en una reducción significativa de incidencia *P. cinnamomi* en las raíces alimentadoras y además se obtienen un incremento en el contenido de aluminio en los árboles tratados. Así mismo mencionan que el metalaxyl inyectado en 0.28 g.i.a y pyroxyfur en 0.4 g.i.a/m² del área de goteo no controla la enfermedad. Los resultados anteriores coinciden con lo encontrado por (Bruck y Kenerley, 1983) al aplicar metalaxyl en el control de *P. cinnamomi* sobre la pudrición de raíz de *Abies fraseri*.

Coffey y Bower, (1984) tiene buen control de *P. cinnamomi* en plantas de aguacate Hass de 2 años de edad injertados sobre porta injertó clonal Duke 7 con el uso de fosetyl-Al, con una aplicación de 48 horas antes de la plantación (500 ug/ml) y 2 ó 4 veces por año en tratamientos al suelo después de plantar en dosis de 35 ó 70 g.ia/m². Los mismos autores mencionan que arboles de aguacate de cultivar “Fuerte” de 20 años de edad sobre patrones susceptibles a *P. cinnamomi*, severamente infectados con el patógeno son descopados y tratados con metalaxil – fosetyl- Al y ambos fungicidas restablecen la producción de frutos en 2 años, pero

el tratamiento mejor en costo/beneficio es una aspersión foliar (3 g.i.a/l) de fosetyl – Al en 3 a 5 aplicaciones por año.

El metalxyl es un producto específico contra *P. cinnamomi*. Sin embargo su efectividad disminuye con el tiempo, debido a la resistencia que el patógeno desarrolla hacia el fungicida, como con enfermedades importantes como el tizón tardío de la Papa, *P. infestans* y el mildiu del Tabaco *Peronospora destructor* (Téliz, 2000).

Al aplicar metalaxyl granulado a la dosis de 2.5 g.i.a/m² de suelo con el objeto de disminuir las poblaciones de *Phytophthora* en el suelo, se disminuye en los árboles que reciben el fungicida solo o mezclado con estiércol de bovino pero no erradica el hongo del suelo, el hongo sobrevive y vuelve a incrementar su población en el suelo una vez que el efecto químico ha disminuido o desaparecido (Téliz, 2000). Se prueba Fosetyl-Al inyectado en el tronco de árboles enfermos con tristeza, los resultados fueron positivos en el mayor desarrollo de raíces y en una mejor producción inicial de fruta.

Control Biológico

Algunos basidiomycetes antagonistas a *P. cinnamomi* son: *Bovista brunnea*, *Clavulina amethystina*, *Clitocybe eucalyptorum*, *C. infundibuliformis*, *Collybia sp*, *C. abutyracea*, *Cortinarius austro – venetus*, *C. walkeri*, *Geastrum*, *Gymnopilus*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hygrophorus niveus*: Estos antagonistas ocasionan lisis en el micelio, clamidosporas, esporangios y oosporas en el patógeno; estos efectos han sido demostrados, pero muy poco se han utilizado bajo condiciones de campo (Baker, 1990; Linderman y Ribeiro, 1991).

La pudrición de la raíz de la soya causada por *P. sojae*, es controlada en una serie de experimentos de campo por la aplicación de esporas de *Bacillus cereus* cepa UW85. La bacteria del patógeno a una dosis 100 mg/ml (Osburn *et al.*, 1995).

Coffey, (1991), cita la posibilidad de aplicar microorganismos a la rizosfera de las plantaciones de aguacate para el control de *P. cinnamomi*. Además de aplicar un manejo integrado del agua de riego, también utilizar patrones tolerantes a la enfermedad y control químico cuando fuera necesario.

El potencial de control biológico de la especie de *Trichoderma* y *Gliocladium* fue revisado por (Papavizas, 1985). Una formulación de hongos benéficos de *G. virens* es comercialmente viable bajo el nombre de GL-21. Este producto es eficiente contra especies de *Phytophthora* (Papavizas, 1985).

Cepas de *Myrothecium roridum* son activas en la supresión de *P. cinnamomi* sobre *Persea indica* el cual se ha adaptado a la rizosfera del aguacatero (Gees y Coffey, 1989).

Suelos supresivos

La supresividad de algunos suelos es un fenómeno que se detectó desde hace mucho tiempo, sin embargo, hasta el momento solo se ha podido explicar parcialmente. Los antagonistas sobreviven tratamientos de vapor de agua al suelo (60°C por 30 minutos) y suprimen la pudrición radical y la supervivencia del hongo *P. cinnamomi*, debido a que algunas bacterias micolíticas formadas de esporas como *Bacillus subtilis*, son capaces de lisar al micelio y de romper los esporangios de este hongo por la acción de estos u otros microorganismos (Baker, 1990).

La primera evidencia de suelos supresivos de *P. cinnamomi* es reportada en Australia por, (Baker, 1990) quien observa supresión de este hongo en suelo en suelo de una arboleda de Queensland en donde árboles adultos de *P. americana* estaban creciendo bien en presencia del patógeno y bajo condiciones de alta humedad del suelo, altos contenidos de materia orgánica, mucho nitrógeno y altos niveles de cationes intercambiables calcio y magnesio.

Linderman, (1989) demuestra que al crecer árboles de eucalipto en suelos ricos en materia orgánica y bien drenados son resistentes a *P. cinnamomi*, sugieren que las bases para esta resistencia parecen residir en la flora microbial presente en estos suelos, ya que al esterilizar este suelo las plantas crecidas en él fueron completamente susceptibles a la infección.

Tsao *et al.*, (1994) demuestra que en suelos naturales modificados con gallinaza y urea al 2 y 0.1 % respectivamente, causan que el pH de 7 se incrementara a más 8.6 y que luego se cayera hasta el rango ácido, lo cual se atribuye a los procesos de amonificación y nitrificación. Concluyen que se puede

encontrar altas concentraciones de NH_4 y NO_2 en los suelos modificados, las cuales son responsables, al menos en parte de la supresión de este hongo.

Los modificadores del suelo es una alternativa potencial, pero en México se ha explorado poco. Sin embargo, a nivel mundial hay ejemplos de la efectividad de modificadores orgánicos del suelo en el control de enfermedades radicales, incluyendo pudrición de la raíz de la fres con residuos de soya, pudrición de la raíz del algodón causada por *P. omnivorum* con abonos verdes (Linderman y Ribeiro, 1991).

Baker, (1990) observa que la pudrición de la raíz del Aguacate causada por *P. cinnamomi* puede lograrse mediante las aplicaciones de modificadores orgánicos relativamente bajos en su relación carbono nitrógeno; como abono de pollo, harina de plumas, harina de pescado y una preparación de alga molida, o bien con certeza de madera dura.

Baker, (1990) informa que la *P. cinnamomi* es controlada usando al lupino como cobertera y aplicando estiércol de gallina y piedra caliza. Este mismo autor observa un efecto similar cuando adiciona al azufre para modificar el pH del suelo, pero con árboles de pino.

Linderman y Ribeiro, (1991) al hacer una revisión de “suelos supresivos” ha sido descrito por Baker y Cook (1974), como aquellos suelos en los que la incidencia o severidad de una enfermedad sigue siendo baja, a pesar de que exista la presencia de un patógeno, el hospedero susceptible y las condiciones ambientales que favorecen su infección y posterior desarrollo de la enfermedad se encuentran que estos deben tener las siguientes características:

- a) Alto contenido de materia orgánica algunas veces son una capa de humus de 23 centímetros de profundidad, con lo cual se mejora la estructura y drenaje del suelo.
- b) Niveles altos de Ca (frecuentemente 20-25 meq./100 g) con el calcio aparentemente obstruido en el ciclo orgánico. Niveles que estimulan a los microorganismos antagonistas.
- c) Altos niveles de pH de 6 a 7 el cual es favorable para las bacterias.

- d) Altos niveles de nitrógeno tipo amoniacal y nitrato, aparentemente encerrado en el ciclo orgánico, con estos niveles el suelo es muy activo biológicamente.
- e) Alta actividad biológica.
- f) Suelos bien drenados.

Resistencia genética

Un control efectivo del patógeno del suelo es el uso de la resistencia de la planta (Zentmyer y Schieber, 1987). La tristeza del aguacatero puede ser controlada por el uso de un patrón resistente que produce frutos no comestibles (Zentmyer, 1980). Sin embargo, sus posibilidades son bajas actualmente, ya que por ser un cultivo perenne se requiere implantar un proyecto a largo plazo en busca de materiales resistentes, además de que entre las especies de *Persea* existe incompatibilidad lo cual hace aun difícil su establecimiento. A pesar de esto han existido intentos por encontrar patrones resistentes; Zentmyer y Schieber, (1987) pudieron obtener material aparentemente resistentes a *P. cinnamomi*, de un material colectado en México. Estos investigadores aportaron que de *P. cinnamomi* var. *drymifolia* se obtuvieron los cultivares Duke 6 y 7, muestran buena resistencia al hongo y que G22 y G/6 tienen un grado similar de resistencia y Duke 5 y Duke Grace son más susceptibles al patógeno. Pruebas iniciales con el cultivar Úntales son prometedoras. El cultivar Topa Topa muestra menor resistencia que los otros cultivares, solo los cultivares Duke 6 y 7 se están explotando comercialmente. Pero estos materiales bajo condiciones severas de infestación pueden ser dañados.

Zentmyer y Schieber, (1987) encuentran que el borbonol, una sustancia antifungosa preformada, es aislada de raíces y tallos de *P. borbónica* y es detectada en tejidos de otras especies resistentes a *P. cinnamomi* a una concentración mínima de 1 mg/ml y también la pudrición de esporangios o concentraciones de 5-10 mg/ml. A pesar de su potente actividad fúngica la evidencia disponible no es ligada a la expresión de la resistencia de *P. cinnamomi* que ocurre en muchas especies de *Persea* silvestres.

En el campo experimental de California indican que los patrones de los cultivares: Thomas, Martín Grande, Barr Duke, y D9 injertado sobre Hass son más resistentes que los cultivares Topa Topa, Borchard y G6 (Botha *et al.*, 1990).

Control físico

Efecto del acolchado de la actividad microbiana en el suelo

Existe una gran cantidad de estudios sobre diferentes cultivos y patógenos, en diferentes condiciones climático-edáficas y con estudio de apoyo de laboratorio. De esta manera general se reconoce efectos principales que son la innovación térmica directa de microorganismos causantes de enfermedades y los efectos indirectos causados por cambios en poblaciones de microorganismos, favoreciendo en control biológico de determinados patógenos. También se reconoce el efecto de temperaturas sub-letales sobre la tasa de reproducción de determinados microorganismos, completando de esta manera otros métodos de control (Katan y De Vay, 1991).

Stapleton, (1985) menciona que varios estudios de inactivación térmica de varios microorganismos en laboratorio han demostrado que por encima de 50°C (temperatura que a menudo se alcanza, en solarización), la, sobre sobre vivencia de estos se limita a unas pocas horas únicamente. Por otra parte a temperaturas de 37 a 50°C, la erradicación o marcada reducción en las poblaciones ocurre dentro de dos o cinco semanas de tratamiento.

Katan y De Vay, (1991) mencionan los efectos de solarización sobre agentes potenciales de control biológico; al respecto, estos autores encuentran hongos tolerantes y actinomicetos son afectados en menor grado que fitopatógenos y el total de hongos, posteriormente estos organismos tolerantes recolonizan el suelo tratado (solarizado), con poblaciones mayores que en el suelo testigo. La bacteria *Pseudomonas fluorescens* es severamente reducida por solarización, pero, rápidamente recolonizan el suelo tratado. También poblaciones de bacterias gram-positivas son reducidas por espacio de un año, después de solarizar el suelo mientras que *Bacillus spp* son esporas a menudo rotas por altas temperaturas prosperan en suelos solarizados. La mayoría de estos microorganismos

mencionados como agentes de control biológico de microorganismos fitopatógenos (Stapleton y Devay, 1986).

En otros estudios, Katan y De Vay, (1991), mencionan que hongos antagonistas, como *Trichoderma harzianum*, colonizan agresivamente suelos solarizados. Todos estos trabajos sugieren que la técnica de solarización provoca cambios en la biota del suelo y en el propio sustrato que favorecen el desarrollo de microorganismos con mayor habilidad competitiva. Estos microorganismos que son favorecidos por el calentamiento solar del suelo son a menudo saprofitos más que fitopatógenos y normalmente tiene requerimientos más especializados para su crecimiento.

Baker, (1990) resume los siguientes principios en el tratamiento del suelo utilizando calor para el control de enfermedades radicales:

1.- Los organismos vivos varían ampliamente en su tolerancia a altas temperaturas.

2.- Los microorganismos parásitos mueren a temperaturas más bajas que los saprofitos.

3.- Mientras más alto sea el contenido de humedad en el suelo, mayor es la susceptibilidad de material vivo a la destrucción por el calor.

4.- El nivel de dominancia de propágulos de parásitos es directamente relacionado a su tolerancia al calor.

5.- La alta temperatura que se requiere para matar un microorganismo, está directamente relacionada al rango de temperaturas, en el cual el organismo se ha adaptado previamente durante su crecimiento.

6.- Los efectos dañinos, del tratamiento de calor en los microorganismos, se establecen desde un rango de retardo en la germinación hasta el crecimiento parcial y muerte eventual o inmediata.

7.- Los microorganismos parásitos mueren a temperaturas ligeramente dañinas para el hospedero.

Acción del acolchado y control de patógenos del suelo

Benson (1987) cita que *P. cinnamomi* sufre inactividad completa a temperaturas de 39 a 44°C; Pullman *et al.*, (1981). En California E.U.A. reportan resultados similares en solarización en el control de *Verticillium spp.* en algodón y coliflor. Diferentes periodos de solarización son efectivos para disminuir o eliminar el inóculo primario de este hongo en el suelo. Un tratamiento de dos semanas de solarización con un plástico de 1 mm de espesor logra reducir de 67.0 propágulos por gramo de suelo. A una profundidad de 0-15 cm en el suelo solarizado durante 4 semanas se reduce 87.3 propágulos por gramo de suelo. A las 9 semanas de tratamiento el inóculo se redujo 79.3 propágulos por gramo de suelo a 0.0 en la misma profundidad con plástico de 4 mm de espesor. En las profundidades de 15 a 30 cm y de 30 a 45 cm se obtienen resultados similares, se logra reducir el número de propágulos por gramo de suelo cuando se realizan tratamientos de 4 y 9 semanas, con reducciones muy significativas en relación, al testigo también en el tratamiento de 2 semanas.

Katan y De Vay (1991) reportan el uso de polietileno transparente de 0.03 mm de espesor, para cubrir un suelo previamente irrigado durante los meses de julio y agosto. Después de 2 semanas bajo tratamiento *V. dahliae* es eliminado a una profundidad del suelo de 0 a 25 cm; en posteriores experimentos de campo con berenjena y tomate se reporta una reducción de marchites por *Vercicillium* de 25 a 95%, las malezas son controladas y se mejora el crecimiento de las plantas.

Kassaby, (1985) prueba la eficiencia de solarización de suelo con polietileno transparente, para controlar *V. dahliae* y *Practylenchus thornei*. El suelo es irrigado y cubierto con polietileno de 0.04 mm de espesor, por 31 días y conservado húmedo, posteriormente se efectúa siembra en el terreno tratado. El tratamiento de solarización elimina los microesclerocios de *V. dahliae* y disminuye el índice de enfermedad en un 96 a 99% y la población de *P. thornei* en un 80-100%, controla las malezas y aumenta el rendimiento en un 35% en relación con el testigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

Los muestreos en campo consistieron en la colecta de raíces y tierra de árboles que mostraban la sintomatología característica de ataque de *Phytophthora cinnamomi* (tristeza del aguacate) en tres huertas de los municipios de San Juan Nuevo, Tancítaro, Uruapan y Peribán, pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán. Se realizó un muestreo dirigido a una profundidad de 0-30 cm en cuatro puntos cercanos al área de goteo. Con ayuda de una pala se tomaron las muestras de suelo y raíz para colocarlas en bolsas de polietileno previamente identificadas con los datos de cada localidad, se obtuvo una muestra compuesta de 1 kg por árbol, se muestrearon 4 árboles por huerta y posteriormente se transportaron al laboratorio de fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Aislamientos del hongo

Para el aislamiento del hongo se emplearon dos metodologías, la primera fue mediante las raíces que presentaban sintomatología característica de *Phytophthora cinnamomi* como: tejido necrosado color café oscuro, las raíces se lavaron en agua corriente para fragmentarlas en trozos no mayores a 0.5 cm; con apoyo de un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal seleccionando los límites de tejido sano y enfermo. En la cámara de flujo laminar los trozos de raíz se lavaron en solución de hipoclorito de sodio al 3 % por un minuto, seguido de tres lavados de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente previamente esterilizado. Una vez secas, se sembraron 4 fragmentos de raíces en placa Petri en medio selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, pcnb e himexazol) (Erwin y Ribeiro, 1996) y finalmente los aislados se incubaron a 28°C por tres días (Fierro, 2011).

La segunda metodología consistió en el método indirecto o trampa para aislar *P. cinnamomi* del suelo, con la técnica de la manzana, la cual proporciona un óptimo a este tipo de hongo, sin embargo permite el crecimiento de otro

Oomicetos como *Pythium*. En la manzana previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 3 %, se realizó un agujero de 1 cm de diámetro con el apoyo de un sacabocados, a una profundidad de 3-4 cm, en donde se rellena con suelo hasta llenar el orificio dentro de la manzana, sobre la tierra se colocó algodón humedecido con agua destilada estéril para después sellar con Kleen-Pack y evitar el ingreso de otro patógeno; se deja 7 días a que el oomiceto desarrolle dentro de la manzana, cuando se visualiza alrededor del orificio una coloración café oscuro se parte con apoyo de un bisturí, se recuperan cortes de la zona de avance del patógeno (Campbell, 1949;. Rondon *et al.*, 1988), se colocan en medio selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, pcnb e himexazol) (Erwin y Ribeiro, 1996) sellándose los extremos con Kleen-Pack y se incubaron a 28°C (Fierro, 2011).

Purificación y multiplicación de *Phytophthora cinnamomi*

Una vez obtenidas las cepas puras de los diferentes aislados fueron transferidas en cajas Petri conteniendo medio de cultivo V8; para lo anterior se utilizó un disco de 0.5 cm el cuál contenía el hongo; el explante se colocó en el centro de la caja Petri, fueron selladas con Kleen-Pack y se incubaron a 28°C. Se realizaron varias copias y se almacenaron en el laboratorio de Fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su posterior uso.

Identificación de oomicetos

Una vez que los aislados fueron aislados y purificados, los diferentes oomicetos que se aislaron se identificaron morfológicamente con las claves de Erwin y Ribeiro, 1996).

TASA DE CRECIMIENTO

Medios de cultivo utilizados

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento y purificación del fitopatógeno fue PARPH V8[®]-Agar, para la evaluación de la tasa de crecimiento se utilizaron los medios PDA (Papa-Dextrosa-Agar), Agar-Chícharo y Centeno-Agar

Medio de cultivo V8[®]-Agar: 200 ml de jugo de verduras V8[®], 4.5 g de Carbonato de Calcio, 16 g de Agar y 800 ml de Agua destilada. Al jugo V8[®] se le agrega Carbonato de Calcio seguido de agitación constante hasta disolver y se deja reposar por 10 minutos, se centrifuga a 3000 r.p.m por un lapso de 20 minutos, se recuperan 200 ml de sobrenadante, se vierten 800 ml de agua destilada estéril, se agregan 16 gr de Agar Bacteriológico, se agita y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio de cultivo Centeno-Agar: para la elaboración de 1 litro de medio de cultivo se necesitan 60 gr de granos de centeno, los cuales se dejan remojar por 36 hrs, transcurrido el tiempo se retira el sobrenadante para licuarlo hasta obtener una consistencia espesa, se calienta por 3 hrs a 50°C, se pasa por una malla fina con la finalidad de eliminar residuos del grano, al filtrado se le agregan 20 gr de sacarosa y 16 gr de Agar-Bacteriológico, se afora a 1000 ml y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) sintético: para la elaboración del medio se pesan 39 gr del medio BD-Bioxon[®] se vierten en un matraz, se agrega 1000 ml de agua destilada agitando suavemente para lograr que se disuelva, una vez disuelto se tapa el matraz con papel aluminio y se esteriliza en autoclave por un lapso de tiempo de 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio de cultivo Agar-Chícharo: para la elaboración de 1 litro de medio de cultivo se necesitan 160 gr de chicharos previamente congelados, se licuan hasta obtener una consistencia espesa, se pasa por una malla fina con la finalidad de eliminar residuos del grano, al filtrado se le agregan 5 gr de sacarosa y 16 gr de

Agar-Bacteriológico, se afora a 1000 ml y se esteriliza en autoclave por 15 min a 15 libras de presión.

Parámetros a Evaluar.

Para medir el efecto de los diferentes tratamientos sobre la tasa de crecimiento del hongo, se midió el crecimiento diario en los diferentes medios de cultivo con ayuda de un vernier; cabe mencionar que este parámetro fue evaluado para los aislados identificados como *Phytophthora cinnamomi* obtenidos a partir del medio selectivo para oomicetos.

Diseño Experimental

Dado que el experimento se llevó a cabo bajo condiciones controladas, se utilizó un diseño experimental completamente al azar considerando 4 tratamientos con cuatro repeticiones, para el análisis de datos se usó el método de modelos lineales generalizados, y realizando un análisis de varianza de la regresión, utilizando es programa estadístico R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los muestreos realizados se obtuvieron diferentes patógenos (Tabla 3), los cuales fueron identificados hasta género con claves de identificación taxonómica.

Tabla 3. Aislamiento de muestras

Municipio	RAÍZ			MANZANA		
	<i>Mortierella</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
Peribán	X	X				X
Tancítaro	X	X				
Uruapan	X	X				X
San Juan Nvo	X	X				

En la tabla anterior podemos observar que para los aislamientos a partir de raíz se obtuvieron un 50% del hongo *Mortierella spp.* y en igual porcentaje de cepas de *Fusarium spp.* (Tabla 3), lo cual coincide con lo reportado por Gualdron *et al.*, (1997), quien realizó muestreos en bosques de Bogotá, Colombia y en el total de sus aislados reporta que *Mortierella humilis* presentó el porcentaje más alto de incidencia, sin embargo reporta otras especies de *Mortierella* como lo son *M. vinacea* y *M. minutissima*, e incluso describe al género *Fusarium* en segundo lugar de incidencia. Lo anterior concuerda con los aislados obtenidos en nuestro trabajo ya que la altitud, clima y tipo de vegetación coinciden con los de la franja aguacatera del estado Michoacán

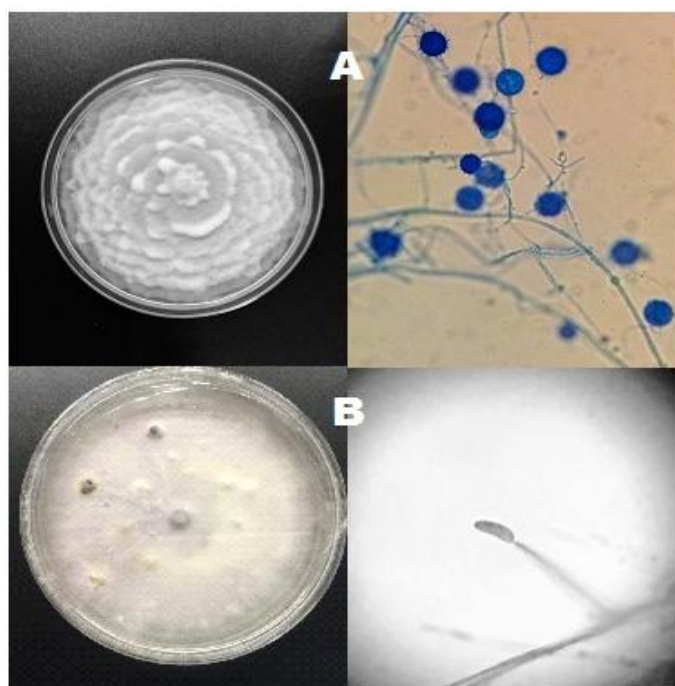


Figura 4. Morfología de crecimiento en medio de cultivo PDA y estructuras formadas, A: *Mortierella* spp. B: *Fusarium* spp.

Para los aislados obtenidos del método indirecto de trampeo con manzana se logró obtener tres aislados del fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi* en los municipios de Peribán, Uruapan, lo cual se asemeja a lo reportado por Ochoa *et al.*,(2007), quien emplea esta técnica y logra aislar el oomiceto satisfactoriamente.

Identificación de oomiceto

Las estructuras que se observadas fueron clamidosporas, oogonios, Micelio turuloso en nuestros aislados (figura 6), lo que coincide con lo reportado por Gallegly (2008), quien aisló cepas de *Phytophthora cinnamomi* para dicha identificación del fitopatógeno de *Persea americana*.

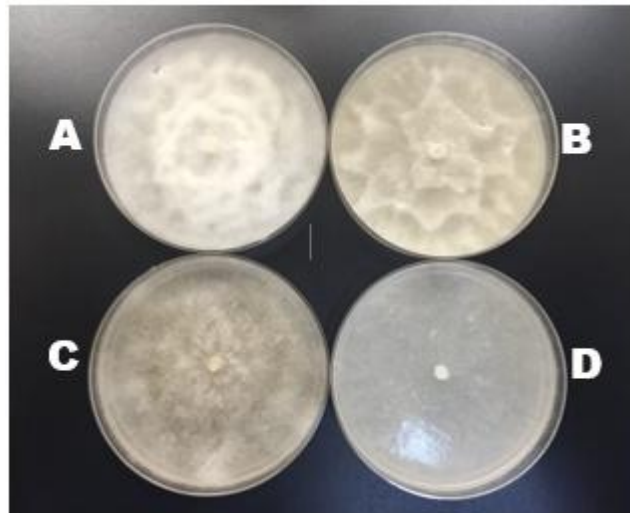


Figura 5. Morfología de crecimiento en los diferentes medios de cultivo en donde A: PDA, B: Chicharo-Agar, C: V8[®]-Agar y D: Centeno-Agar.

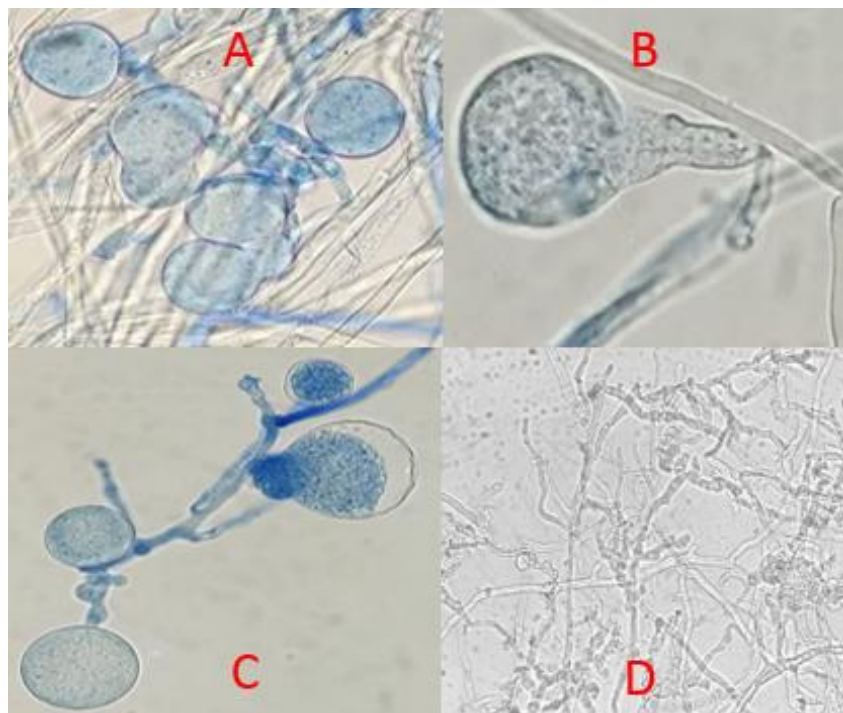


Figura 6. Estructuras morfológicas de *P. cinnamomi* en diferentes medios A) Centeno, clamidospora; B) V8, oogonio; C) Chicharo, clamidospora; D) PDA, Micelio turuloso.

Una vez que se logró aislar e identificar a *Phytophthora cinnamomi*, los tres aislados fueron registrados con la nomenclatura Pc33, Pc41 y Pc42, y posteriormente se transfirieron a los medios V8[®]-Agar, PDA, Centeno-Agar y Chicharo-Agar como cultivos puros y las tres cepas presentaron diferente morfología de crecimiento dependiendo el medio de cultivo como se observa en la figura 6.

Tabla 4. Tasa de crecimiento de los medios alternativos evaluados.

Comparaciones de las regresiones					
Medio	Tratamiento	Intercepto ^a	Parámetro ^a	P-valor ^b	R ² aj.
V8	Pc33	0.952	0.044	< 2.2e-16	0.985
	Pc41	0.411	0.042	< 2.2e-16	0.985
	Pc42	0.642	0.05	< 2.2e-16	0.958
Centeno	Pc33	0.731*	0.067	< 2.2e-16	0.976
	Pc41	0.27	0.07	< 2.2e-16	0.949
	Pc42	0.585*	0.06	< 2.2e-16	0.978
Chicharo	Pc33	1.02	0.06	< 2.2e-16	0.959
	Pc41	1.028	1.065	< 2.2e-16	0.967
	Pc42	1.052	0.068	< 2.2e-16	0.944
PDA	Pc33	0.04	0.039	< 2.2e-16	0.967
	Pc41	0.04	0.037	< 2.2e-16	0.979
	Pc42	0.0519	0.038	< 2.2e-16	0.973

*: cepa del mismo medio estadísticamente iguales a: cm, b: valores <0.05 regresiones altamente significativa, aj.:ajustada

Los resultados obtenidos para el medio de centeno muestran que hay una diferencia entre aislados, siendo la cepa Pc41 la que muestra el mayor crecimiento en mm por hora, Cedeño *et al.*, (2008) evaluó diferentes medios en *Phytophthora infestans*, obteniendo una tasa de crecimiento de 0.003 mm/h, lo anterior es diferente a lo obtenido en el presente trabajo esto puede ser a la diferencia de la especie de hongo evaluado. Para el medio de cultivo V8 se tiene que el aislado Pc42 es el que crece más rápido, sin embargo las cepas Pc33 y Pc41 tienen un crecimiento muy similar entre sí, Andrade en el (2012) obtiene un crecimiento de

4.5 cm en 120 horas, sin embargo conociendo nuestros parámetros, estimando el crecimiento de las cepas evaluadas en este estudio llegarían a 4.5 cm en 85 horas. Entre las cepas *Pc42*, *Pc41*, *Pc42* del medio de cultivo PDA existe una diferencia significativa mínima de 1, destacando el de mayor crecimiento la cepa *Pc33*, así mismo el trabajo llevado a cabo por Rodríguez *et al.*, (2003) es más alto el crecimiento tomando en cuenta que existe la misma medición de mm/d. En el medio de cultivo de Chicharo-agar la cepa *Pc41* en el trabajo realizado se demuestra que obtiene un crecimiento altamente significativo, el medio ya mencionado nos dice que las cepas *Pc42*, *Pc33* en comparación a la cepa *Pc41* existe una diferencia de crecimiento con un rango de 1 a 1.3 mm/

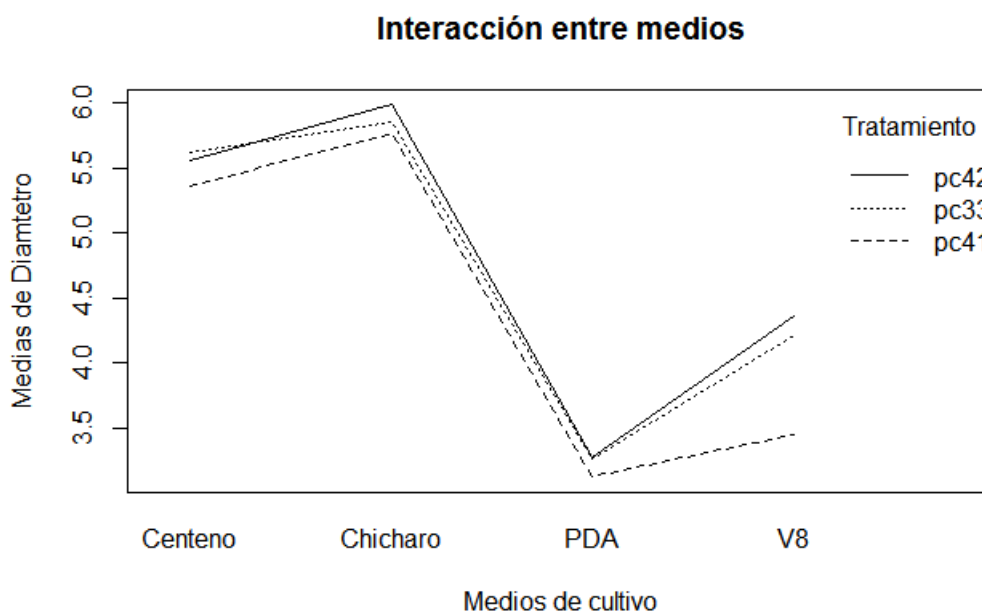


Figura 7. Interacción de las 3 cepas de *P. cinnamomi* de los 4 medios evaluados

En la gráfica (figura 7) se obtuvo una relación entre medios lo que indica que el medio de cultivo Chicharo-agar predomina en el mayor crecimiento tomado crecimiento en el tiempo de 120 hrs es la cepa *Pc42*, así mismo se demuestra una significancia mayor en cuanto a crecimiento por encima de los medios centeno, PDA y V8, seguido de la cepa *Pc33*, los resultados que se demuestran en comparación a Cedeño *et al.*, (2008); Andrade en el (2012); Rodríguez *et al.*, (2003), podemos destacar que el trabajo en laboratorio ya realizado, si existe un rango de crecimiento altamente significativo.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se dice que el medio de cultivo Centeno-agar fue el más eficiente para aislar y así obtener un mayor crecimiento de estructuras morfológicas el cual caracterizan a *Phytophthora cinnamomi*

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, HP; De León, C; Espíndola, BMC; Alvarado, RD; López, JA; García, ER. 2012. Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Usando temperaturas controladas. Spanish Journal of Rural Development. 4:1-8.
- Anguiano C.J., V.M. Coria A., J. A. Ruiz C., G. Chávez L., Y J.J. Alcantar R. 2003. Caracterización edáfica y climática del área productora de aguacate *Persea americana* cv. "Hass" en Michoacán México. V. Congreso Mundial del Aguacate. Málaga, España. p. 146-147.
- APEAM Asociación de productores y empaques exportadores de aguacate de Michoacán. 2012. Cierre de exportación de aguacate. www.apeamac.mx
- Ariena H, Van Bruggen A, Semenov M, Van Diepeningen A, de Vos O & Blok W. 2006. Relation between soil health, wavelike fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. European Journal of Plant Pathology, 115:105-122.
- Avilan R., L., F. Leal P. y D. Bautista A. 1995. Manual de fruticultura. Editorial Americana, C.A. Caracas, Venezuela. p. 666-776.
- Barr, D. J. S. 1992. Evolución de reinos y organismos de la perspectiva de la micología. Micología 84: 1-11.
- Baker, F. F. 1990. An overview of current and future strategies and models for biological control. Biological Control of Soil borne Plant Pathogens. Ed. CAB Internacional, London. 479 p.
- Baker, K., Cook, R. 1974. Biological control of plant pathogens. American Phytopathology. Society. 433 p.

- Barrientos, PAF; López, LL. 2000. Historia y genética del aguacate. In: Téliz, OD; Gonzales, RH; Dromundo, R. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, Méx. p. 19-31.
- Benson, D. M. 1987. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* on root rot of azalea treated with preinoculation applications of metalaxyl. Plant Dis. 71: 818-820.
- Bergh, BO; Ellstrand, N. 1986. Taxonomy of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 70:135-146.
- Bergh, BO. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 76:61-75.
- Birch, R.J.P; Whisson, C.S. 2001. *Phytophthora infestans*, entra en la era de la genómica. Molecular Plant Pathol. 2: 257-263
- Botha, T., F.C. Wehner, y J.M. Kotzé. 1990. Evaluation of new and existing techniques for in vitro screening of tolerance to *Phytophthora cinnamomi* avocado rootstocks. Phytophylactica. 22:335-338.
- Bruck, R. I., C. M. Kenerley. 1983. Effects of metalaxil on *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Abiesfraseri*. Plant Dis. 67:688-690.
- Buckley D & Schmidt T. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. Environment microbiology, 5:441-452.
- Calabrese, F. 1992. El Aguacate. Ediciones Mundi Prensa. p. 249.
- Campbell, W.A. 1949. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. Plant Disease Reporter 33:134-135.
- Campbell, C. L. 1986. Interpretation and uses of diseases progress curves for root diseases. in plant disease Epidemiology; population dynamics and

management. Vol. I. K. J. Leonard and W. E. Fry, eds. Macmillan, New York. 372 pp. 38-54 p.

Cedeño, L., Fermín, G., Mora, G., A., Briceño, A., Quintero, K., San Román, M. Y Moreno, M. 2008. Medios de cultivos alternativos para aislar *Phytophthora infestans* de folíolos de papa. Fitopatol. Venez. 21:34-40

Ceja, TLF; Téliz, OD; Osada, KS; Morales, GJL. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. En cuatro municipios de estado de Michoacán, Méx. Rev. Mexi. Fitopatol. 18:79-86.

Coffey, M. D. 1991. Strategies for integrated control of soil borne *Phytophthora* species. Cambridge, 447 p.

COMA. 2005. Censo de aguacate en Michoacán. Comisión Michoacana del Aguacate, Plan Rector del Sistema Producto Aguacate. Uruapan, Mich. 115 p.

Cook, R.J., y K.F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens American Phytopathological Society, St. Paul, Min. 539 p.

Darvas, J. M. 1983. Systemic fungicides applied as trunk paint against root rot of avocado. S. Afr. Avocado Growers Assoc. YRBK: 72-73.

Darvas, J. M., J. C. Toerien y D. L. Milhe. 1984. Control of avocado root rot by trunk injection with phosethyl-Al Plant Dis. 68:691-693.

De Boer, R. F., F. C. Greenhalgh, K. G. Pegg, P. E. Mayers, T. M. Lim, y S. Flett. 1990. Phosphorus acid treatments control *Phytophthora* diseases in Australia. Plant Prot. 20: 193-197.

Dick, M. W. 1995. Reproducción sexual de Peronosporamycetes. Can. J. Bot. 73: 5712-5724.

- Duniway, J.M. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. p 175- 187 in *Phytophthora: Its Biology, taxonomy, ecology, and pathology*. D. C.
- Erwin, D; Ribeiro, O.1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathol. Soc. Press. St. 269-280 p.
- Estoup, A. y B. Anger. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. En *Advances in Molecular Ecology*. G. R. Carvalho (ed.): 51-86. IOS Press. Amsterdam.
- FAOSTAT. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database consulted on November 2015: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>
- Feld, S.J., Menge, J.A., and Pehrson, J.E. 1979. Brow rot of citrus. A review of the diseases. *The Magazine of the Citrus Industry Citrograph* (64), No 5.
- Fierro, C. D. 2011. Etiología y manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán. Montecillo. Texcoco, Edo. de México. Colegio de Posgraduados 18 p.
- Garybay, KAM. 1979. Historia general de las cosas de nueva España, escrito por Fray Bernardino de Sahagún Edit. Porrúa. 43: 205-227.
- Gallegly, ME; Hong, M. 2008. *Phytophthora* identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phythopathol. Soc., MN.158 P.
- Gallo, LL.L. 1984. Resistencia, patogenicidad y control —in vivoll e —in vitroll de *Phytophthora cinnamomi* Rands, parasito del aguacate. III Congreso de Fitopatología. Consejería de Agricultura y Pesca. Gobierno de Canarias. p-96.
- Gallo, LL.L., Hdez. Hdez, J., y Vega, J. S.A. 1990. Enfermedades del aguacate presentes en Canarias con especial referencia a *Phytophthora cinnamomi*

- Rands (Podredumbre de la raíz). II Congreso de Fitopatología. Departamento de Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. 7-19.
- Gess, R., y M.D. Coffey. 1989. Evaluation of a strain of *Myrothecium roridum* as a potencial biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 79: 1079- 1084.
- Girvan M, Bullimore J, Ball A, Pretty J & Osborn A. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2692-2701.
- Grant, B. R. y P. N., Byrt. 1984. Root temperature effects on the growth of *Phytophthora cinnamomi* in the roots of *Eucalyptus marginata* y *E. calophylla*. *Phytopathology*. 74: 179-184.
- Gualdrón A. C. Suárez N. A. Valencia Z. H. 1997. Hongos Del Suelo Aislados de Zonas de Vegetación Natural del Páramo de Chisaca, Colombia. *Revista Caldasia* 19(1-2): 235-245, Vol. 19. Nos. 1-2.
- Hardham, A. R., F. Gubler, J. Elliott. 1991. A review of methods for the production and use of monoclonal antibodies to study zoosporic plant pathogens. *J. Microsc.* 162: 305-318.
- Hardham, A. R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Mole. Plant Pathol.* 6: 589-604.
- Huguenin, B; Boher, B; Haury, A; Laville, E. 1975. Estudio de *Phytophthora cinnamomi* del aguacatero en el Camerún. *Fruits* 30:525-533.
- Kassaby, F.Y. 1985. Solar-heating soil control of damping-off diseases. *Soil Biol. Biochem.* 17:429-434.
- Katan, J., y J.E. De Vay. 1991. Soil solarización. Ed. CRC Press, Boca Raton, Fla. 256 p.

- Kinal, J., B. L. Shearer, y R. G. Fairman. 1993. Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* through lateritic soil by laterally flowing subsurface water. Plant Dis. 77: 1085-1090.
- Lee, B. S., y Zentmyer, G.A. 1982. Influence of calcium nitrate and ammonium sulfate on *Phytophthora* root rot of *Persea indica*. Phytopathology 72: 1558-1564
- Linderman, R.G. 1989. Organic amendments and soil-borne diseases. J. Plant Pathol. 11: 180-183.
- Linderman, R.G. y O.K. Ribeiro. 1991. Chemical and biological control of *Phytophthora* species in woody plants. Ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 447 p.
- Llacer, G., Lopez, M.,M., Trapero, A. y Bello, A., 2000. Patología vegetal. Editorial Grupo Mundi Prensa. Segunda Edición. Tomo II impreso en España. p 724.
- Marks, G. C. y I. W. Smith. 1990. Control of experimental *Phytophthora cinnamomi* stem infections of Rhododendron, Leucadendron, and Eucalyptus by dimethomorph, fosetyl-Al and metalaxyl. J. Exp. Agric. 30:139-143.
- Newett, SDE; Crandy, JH; Balerdi, CF. 2002. Cultivars and rootstocks. In: Whiley, AW; Schaffer, B; Wolsten holme. Avocado: Botany, production and uses. BN. CABI Publ., p. 161-187.
- Osburn, R.M., J.L. Milner, J.L. Oplinger, R.S. Smith, y J. Handelsman. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. Plant Dis. 79: 551-556.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23:23-54.

- Pegg, K. G. A. W. Whiley, y P. A. Hargreaves. 1990. Phosphonic acid (phosphorous) acid treatments control *Phytophthora* diseases in avocado and pineapple. *Plant Pathol.* 19:122-124.
- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Coates, L; Whiley, T. 2008. *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. P. 23-25 *In: The Hon. Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australia Rural Woman of the Year Award 2008 to Mrs Ros Smerdon.* Canberra. Vol. 19, num. 2. 52 p.
- Pérez M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 21:01-24.
- Portugal, V., Cerna-Chávez, E., Landeros-Flores, J., Hernández-Castillo, F.D. y Flores-Olivas, A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:161-166.
- Pullman, G.S., J.E. De Vay, R.H. Garber, A.R. Weinhold. 1981. Soil solarization for the control of *Verticillium* wilt of cotton and the reduction of soil borne populations of *Verticillium dahliae*, *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, and *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 71: 110-113.
- Renner S. 1999. Circumscription and phylogeny of Laurales: evidence from molecular and morphological data. *Am.J. Bot.* 86: 1301-1315.
- Renner S. 2004. Variation in diversity among Laurales, Early Cretaceous to present. *Biol. Skr.* 55: 441-458.
- Richter B, Ivors K, Shi W & Benson DM. 2011. Cellulase activity as a mechanism for suppression of *Phytophthora* root rot in mulches. *Phytopathology*, 101:223-230
- Ribeiro, O.1978. A source book of the genus *Phytophthora*, Univ. of Calif., Riverside, 417 p.

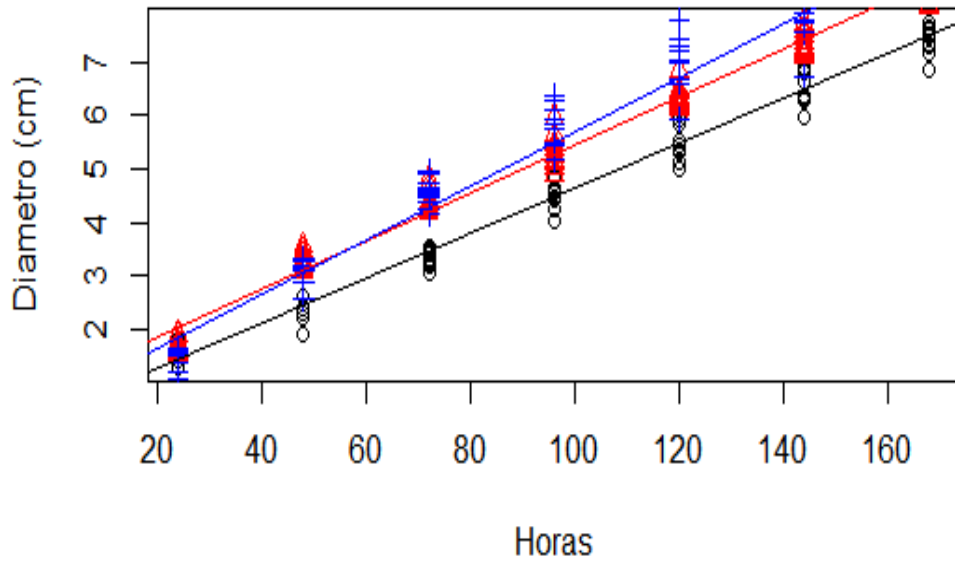
- Rodríguez, M., MC., R. Santiago M.A., Blanco S. J.D. Pozo Q.M.I. Colino N.E.J. Palo N.L.M. Torres-Vila. 2003. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in declining Mediterranean open woodlands (dehesas) in Extremadura (SW Spain) and its growth *in vitro*. Bol. San. Veg. Plagas, 29:627-640.
- Róndon, A., Suárez, Z., Figueroa, M. y Tellechea, V. 1988. Comportamiento de los pato tipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de aguacate en Venezuela. Fitopatología Venezolana 1:14-16.
- SAGARPA-SIAP. 2014. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo social, pesca y alimentación. Sistema de agroalimentaria y pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta 10 de octubre de 2015.
- Sánchez, P.J. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill). y especies afines en México. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:7-18.
- SIAP. 2014. Sistema de agroalimentaria y pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://www.siap.gob.mx> Fecha de consulta 10 de octubre de 2015.
- Sivasithamparam, K. 1991. Some effects of stracts from tree barks and sawdust on *Phytophthora cinnamomi* Rands. Aust. Plant Pathol. 10: 18-20.
- Stapleton, J.J. 1985. A nonchemical approach for management of plant pathogens y pests. Phytopathology. 75: 1429-1436.
- Stapleton, J.J. y J.E. De Vay. 1986. Soil solarization: a nonchemical approach for management of plant pathogens and pests. Crop Prot. 5: 190-198.
- Storey, WB; Bergh, B; Zentmyer, GA. 1986. The origin. Indigenous range and dissemination of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 70:127-143.

- Sulistyowati, L. y P. J. Keane. 1992. Effect of soil salinity and water content on stem of rot caused by *Phytophthora citrophthora* and accumulation of phytoalexin in citrus root stalks. *Phytopathology* 82: 771-777.
- Téliz, D. 2000. El Aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa, México, D. F. 219 p.
- Téliz, OD; Mora, A.A. 2007. Enfermedades del aguacate. Téliz, OD; Mora, AA. El aguacate y su manejo integrado, Ediciones Mundi-Prensa, Méx. p. 171-208.
- Téliz, D., Mora, G. y Rodríguez, P. 1989. Manejo integrado de la tristeza (*P. cinnamomi*) del aguacate (*Persea americana*) en Atlixco, Puebla. *Rev. Mex. De fitopatología*. 7:225-239.
- Torres, PVH. 2009. La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Rev. de Geografía Agrícola. Univ. Autónoma. Chapingo*, núm.43
- Tsao, P.H., L.C. Gruber, L.A. Portales, A.M. Gochangco, P.B. Luzaran, B de los Santos, y H. 1994. Some new records of *Phytophthora* crown and root rots in the Philippines and in world literature. *Phytopathology* 84: 871.
- Tuset, B.J.J. 1977. Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* de Bary en España. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INICA)*. No 7.
- Vidales, FJA; Morales, GJL. 1994. Guía para el cultivo del aguacate. Guía técnica núm. 5, CIPAC, INIFAP SARH. 46 p.
- Vidales, F.J.A. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands), del aguacate (*Persea americana* Mill cv. Hass) *Revista Chapingo. Serie Horticultura. Vol. V.* 255-259.
- Vidales, PVH. 2009. La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Rev. de Geografía Agrícola. Univ. Autón. Chapingo*, núm. 43.

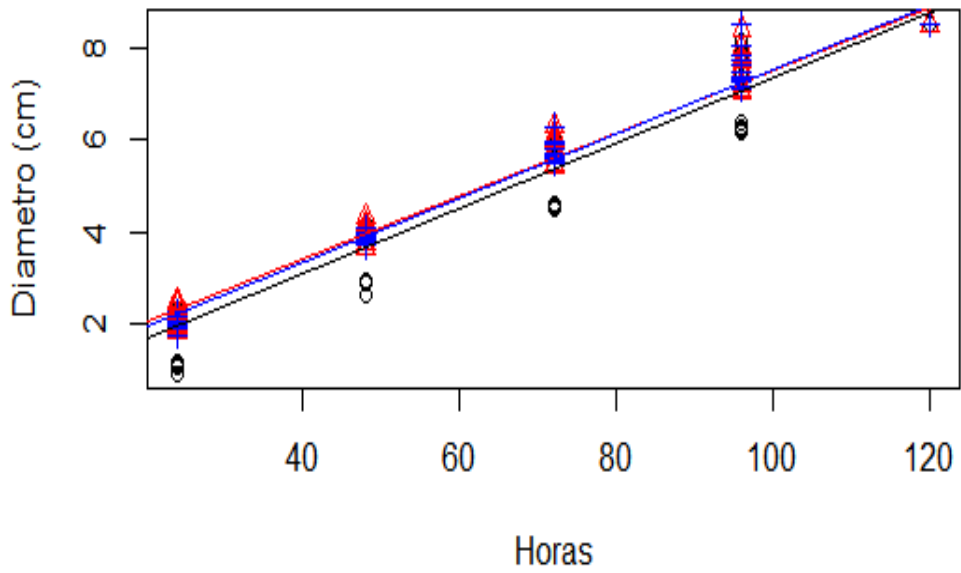
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Papers. No 92
- Weste, G. 1983. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. Biology, taxonomy, Ecology, y pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki – Garcia, and P.H. Tsao. Eds. American Phythopathology Society, St. Paul, Minn 392 p.
- Weste, G. 1994. Impact of *Phytophthora* species on native vegetation of Australia and Papua, New Guinea. Austr. Plant Pathol.
- Waterhouse, GM. 1963. Key to the species *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycol. Inst. Kew. 92 p.
- Zentmyer, GA; Storey, WB. 1961. *Phytophthora* canker of rootstocks. Calif. Avocado Soc. Yearbook 45: 107-109.
- Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes. Phytopathological Monograph. No. 10. Phytopathol. Soc. 96 p.
- Zentmyer, GA. 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 69:89-94.
- Zentmyer, G.A., y E. Schieber. 1987. The search for resitance to *Phytophthora* root rot in Latin America. S. Afr. Avocado Growers Assoc. Year. 10:109-110.

ANEXOS

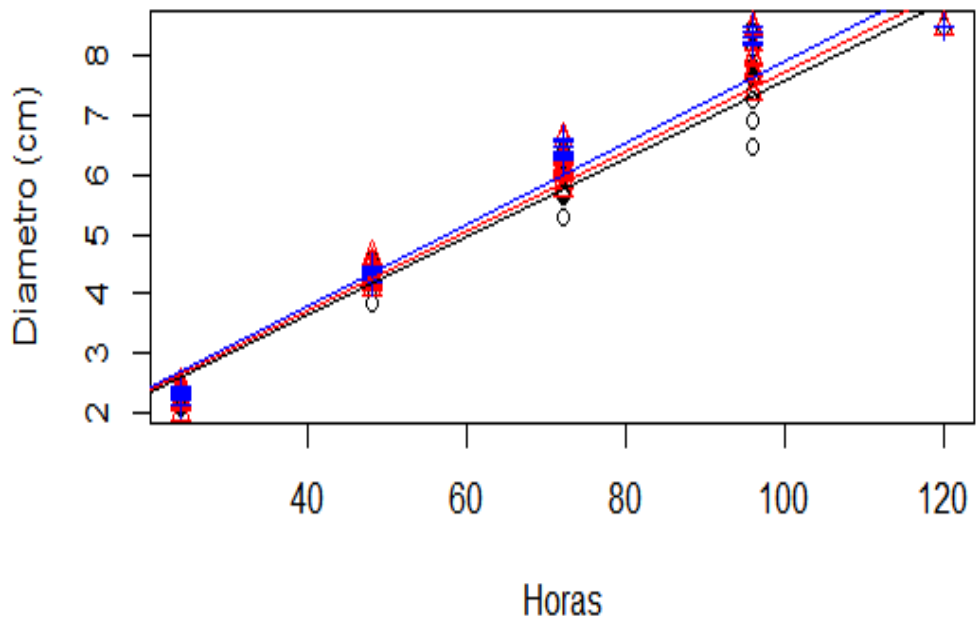
MEDIO V8



MEDIO CENTENO



MEDIO CHÍCHARO



MEDIO PDA

