

VARIABILIDAD PATOGENICA DE *Phytophthora cinnamomi* RANDES EN *Persea americana* MILL. DE MICHOACÁN, MÉXICO

Pathogenic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in *Persea americana* Mill. of Michoacan, Mexico

*Yisa María Ochoa-Fuentes, Ernesto Cerna-Chávez, Gabriel Gallegos-Morales, Melchor Cepeda-Siller, Jerónimo Landeros-Flores, Alberto Flores Olivas

Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, CP. 25315. *yisa8a@yahoo.com

Nota científica recibido: 10 de octubre de 2011, **aceptado:** 03 de octubre de 2014

RESUMEN. Se seleccionaron ocho variantes genéticas de *Phytophthora cinnamomi*; se inocularon nueve plantas de aguacate, con cada una de las variantes genéticas y el testigo con agua destilada estéril; se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad, con base en la escala modificada de Zentmyer. Los datos fueron analizados por medio del análisis de varianza; se realizaron pruebas de Tukey al 0.05. Se obtuvo la incidencia de *P. cinnamomi*, presentando diferencia significativa la cepa C4 de Tancítaro con respecto al testigo. Referente a severidad, el estudio mostró que las plantas inoculadas con las cepas provenientes de Uruapan y Peribán murieron al final del experimento; mientras que las inoculadas con los aislados de San Juan Nuevo y Tancítaro presentaron daños severos y las de Salvador Escalante daño moderado; por lo tanto, este estudio demostró variabilidad patogénica que presentan cepas de *P. cinnamomi* obtenidas entre poblaciones cercanas, aproximadamente a 60 km.

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

ABSTRACT. Eight different genetic variants of *Phytophthora cinnamomi*; nine avocado plants were inoculated with each one of the genetic variants and the control with sterile distilled water. The incidence and severity of the disease were determined using Zentmyers modified scale to assess severity. The data were studied using a variance analysis, Tukey tests at 0.05 were also carried out. Our results regarding *P. cinnamomi* incidence, presented a significant difference between Strain C4 and the check-plant. As far as the severity is concerned, the essay showed that plants inoculated with strains C6, C7 and C8 from Uruapan and Peribán regions, died at the end of the experiment; while plants inoculated with C3, C4 and C5 isolates, suffered severe damage; and C1, C2 from Salvador Escalante locality presented moderate damage. Therefore, our essay demonstrated the pathogenic variability of *P. cinnamomi* strains coming from very close populations, located at 60 kms from each other.

Key words: Avocado, avocado trees root rot, incidence, severity.

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor y consumidor de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el mundo, con una producción de 1 230 970 t en una superficie de 121 491 ha (FAOSTAT 2011). Los estados con mayor producción: Michoacán, Nayarit, Morelos y el Estado de México, los cuales, en 2010, contribuyeron con 87 % de la producción nacional; Michoacán es el principal productor, con una su-

perficie de 107 052.12 ha, lo que representa 79.7 % de la producción total del país (SAGARPA-SIAP 2011). Los principales municipios productores en Michoacán son: Uruapan, Tancítaro, Peribán, San Juan Nuevo y Salvador Escalante, que representan 58 % de la superficie total plantada en el estado, es decir 62 343 ha con una producción de 526 684 t. Dentro de la problemática fitosanitaria del frutal, destaca la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero, provocada por *Phytophthora*

cinnamomi Rands, considerado el principal enemigo de éste cultivo en el ámbito mundial (Téliz y Mora 2007). Este fitopatógeno presenta gran capacidad destructiva y un amplio número de hospederos, atacando más de mil especies de plantas (Hardhman 2005). Provoca pérdidas económicas en la mayoría de los países productores de aguacate. En California, se ha estimado que puede afectar entre 60 y 75 % de las huertas, causando una pérdida anual de aproximadamente 44 millones de dólares. Este patógeno ataca a todas las variedades de aguacate, dañando las raíces, y ocasiona la muerte del árbol (Coffey 1992, Whiley *et al.* 2007). En México, se ha detectado la presencia de la tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras; destacando por la severidad de los daños, la región de Atlixco, Puebla, donde ha causado la muerte de miles de árboles; en la región productora de Michoacán, se considera que alrededor de 4 000 ha están afectadas por la enfermedad, y tiende a incrementarse (Téliz 2000). En México, diversos factores han propiciado que la pudrición de raíz del aguacate, ocasionada por *P. cinnamomi*, alcanza niveles epidémicos; por una parte, las características propias de la biología del alga que le confieren un gran capacidad infectiva y la actividad de explotación del cultivo, que no siempre utiliza las técnicas de manejo apropiadas para la disminución del riesgo de contaminación (Ochoa *et al.* 2007). La enfermedad aparece cuando el patógeno entra en actividad, al presentarse un drenaje deficiente, o bien, en suelos relativamente bien drenados en los que se aplican riegos excesivos; la pudrición afecta a plantas de vivero, como a los árboles establecidos de diferente edad (Ben y Michelson 2010). Actualmente, la diversidad patogénica de *P. cinnamomi* en Michoacán no ha sido determinada, por lo que se requieren realizar estudios que determinen la patogenicidad de variantes genéticas, obtenidas de la región y, de esta manera, planear estrategias de control. El objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad patogénica de ocho variantes genéticas de *P. cinnamomi* aisladas de las principales áreas productoras de aguacate de Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados

Ocho variantes genéticas de *P. cinnamomi*, determinadas por AFLP (Amplified fragment length polymorphism), que depende del reconocimiento de sitios de restricción en el ADN por parte de las enzimas, de la relación entre el número de nucleótidos selectivos de oligonucleótidos iniciadores y de la complejidad del genoma (Lin y Kuo 1995). Las variantes fueron obtenidas en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, provenientes de plantas de aguacate de Peribán, Tancítaro, San Juan Nuevo, Uruapan y Salvador Escalante, municipios del estado de Michoacán. Los aislados se purificaron por punta de hifa en medio de cultivo V-8 agar adicionado con dextrosa.

Producción de inóculo

La preparación de inóculo se realizó replicando las ocho variantes genéticas en cajas Petri con medio de cultivo V-8 agar clarificado (adicionado con dextrosa), con 10 repeticiones por cada uno de los aislados; se incubaron a 18 °C en oscuridad por siete días, obteniendo abundante micelio, una vez que las cajas se llenaron con el micelio del patógeno, se tomaron cinco explantes de 1 cm de diámetro de los medios de cultivo con los aislados y se colocaron en tubos de ensayo de 20 mL adicionando 10 mL de agua destilada estéril, enseguida los tubos se incubaron en oscuridad a 18 °C por cinco días. Para determinar la concentración de zoosporas se agitaron los tubos en un vórtex por 30 s, para posteriormente hacer el conteo en el hemacitómetro; este procedimiento se realizó para cada una de las variantes genéticas.

Inoculación e incubación

Se realizó el 14 de febrero de 2005, para la cual se utilizaron 81 plantas de aguacate de seis meses de injertadas de la variedad Hass, en donde se inocularon nueve plantas por cada variante evaluada, éstas provenientes de un vivero certificado. Las plantas fueron inoculadas en la base del tallo, con 200 mL de una suspensión de zoospo-

ras, a una concentración de 1×10^6 zoosporas / mL obtenidas de las variantes genéticas de *P. cinnamomi*; las plantas testigo fueron tratadas con agua destilada estéril; después de la inoculación las plantas fueron colocados a $21 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$.

VARIABLES EVALUADAS

Se determinó la incidencia de plantas enfermas, considerando el porcentaje de las nueve plantas observadas por cada aislado. La severidad de la enfermedad se evaluó con base en la escala propuesta por Zentmyer (1984), donde; 0= planta sana; 1= daño leve (planta achaparrada con inicio de clorosis 1/3 del área foliar); 2= daño medio (planta achaparrada, con 2/3 del área foliar clorótica); 3= daño severo (planta achaparrada, con 100 % del área foliar clorótica); 4= daño muy severo (planta muerta).

Tabla 1. Severidad de ocho variantes genéticas de *Phytophthora. cinnamomi* en aguacate cv Hass a diferentes fechas de muestreo.

Table 1. Severity of eight genetic variants of *Phytophthora. cinnamomi* in avocado cv Hass at different sampling times.

Cepa	Severidad (Zentmyer, 1984)*		
	42 ddi	84 ddi	126 ddi
¹ Cepa 1	1.00	1.25	2.00
¹ Cepa 2	1.00	1.00	2.30
² Cepa 3	1.00	1.25	3.00
³ Cepa 4	1.00	2.00	3.30
³ Cepa 5	2.00	2.40	3.00
⁴ Cepa 6	2.28	3.25	4.00
⁵ Cepa 7	1.16	2.50	3.66
⁴ Cepa 8	2.30	2.50	4.00
Testigo	0	0	0

*Escala de Zentmyer para determinar severidad. 1. Salvador Escalante; 2. San Juan Nuevo; 3. Tancitaro; 4. Uruapan; 5. Peribán; ddi- días después de la inoculación

La presencia de *P. cinnamomi* en las plantas enfermas se verificó, mediante aislamientos realizados cada seis semanas de las raicillas de las plantas con síntomas de la enfermedad, extrayendo trozos de raíces de la zona del avance del patógeno, con la finalidad de asociar la sintomatología con las inoculaciones de las cepas, esto se llevó a cabo mediante muestreo destructivo. En el proceso de aislamiento, las raíces de la planta se lavaron con agua corriente, se tomaron segmentos de 1 cm de

longitud y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % por 30 s. Las raíces se enjuagaron con agua destilada estéril por dos ocasiones y el exceso de agua se eliminó con papel absorbente. Los trozos desinfectados se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo V-8 agar clarificado; la identificación de el patógeno se llevó a cabo por criterios morfológicos de Erwin y Ribeiro (1996), Huberli et al. (1997).

ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, los datos de incidencia fueron analizados por medio del análisis de varianza donde se utilizó el programa SAS (Statistical Analysis System). Las pruebas de medias fueron realizadas por Tukey al 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas que presentaron las plantas enfermas fueron: clorosis progresiva, necrosis de los márgenes de las hojas para terminar en una necrosis generalizada, las raíces de las plantas enfermas se encontraban necrosadas con fácil desprendimiento de la corteza, coincidiendo con los síntomas descritos por Téliz (2000). Los aislamientos de raíces de plantas con síntomas de la enfermedad, mostraron la presencia de *P. cinnamomi* de forma consistente. La incidencia de *P. cinnamomi* en las plantas de aguacate, presentó diferencia significativa ($p < 0.01$) en el aislado 4 de Tancitaro, con respecto al testigo. El aislado mostró 77 % de incidencia, siendo ésta la mayor a los 42 d de inoculación con respecto al resto de los aislados, los provenientes de Uruapan y Peribán mostraron los valores mas altos respecto a la escala con 4 y 3.66 a los 126 d; sin embargo, éste comportamiento ya se mostraba desde el segundo muestreo a los 84 d; por otro lado, los aislados de Salvador Escalante se mostraron al final del experimento como la localidad con menor daño evaluado con 2 y 2.3 en la escala utilizada (Tabla 1). Las plantas inoculadas con los aislados C6, C7 y C8 provenientes de Uruapan y Peribán murieron al final del experimento, 126 días después de la inoculación; mientras que las plantas inoculadas con los aislados C3, C4 y C5 presentaron

solamente daños severos y las inoculadas con los aislados C1 y C2 de Salvador Escalante mostraron daño moderado (Tabla 1) y las plantas testigo no presentaron síntomas y *P. cinnamomi* no fue aislada de éstas. Lo anterior implica que la variación en patogénesis es amplia dentro de cepas de *P. cinnamomi*, lo que concuerda con lo que señalan diversos autores como Dudzinski *et al.* (1993), Tommerup *et al.* (1997), Tommerup (1998), Huberli *et al.* (2001).

La variabilidad en la agresividad de *P. cinnamomi* es amplia, Huberli *et al.* (2001) indicaron que existen tres tipos de respuesta: la primera de ellas, aislados con alta capacidad para matar plantas a los 54 d después de la inoculación; la segunda: plantas que murieron a los 106-177 d, los cuales fueron considerados intermedios en su patogenicidad, y la tercera agrupa aislados que no inducen muerte a la planta y fueron considerados

no patogénicos. La considerable variación en patogenicidad ha sido reportada en Australia (Dudzinski *et al.* 1993), Francia (Robin y Desprez-Loustau 1998) y Sudáfrica (Linde *et al.* 1999) en colecciones nacionales de aislados; aunque Dudzinski *et al.* (1993) demostraron la variabilidad en aislados locales, quienes encontraron una diferencia de 2.3 veces en la capacidad de provocar la muerte a las plantas de 18 aislados A2 provenientes de Australia, comparado con aislados locales que dieron una diferencia de 5 veces. Por lo que podemos concluir que nuestro estudio demostró la variación patogénica de las cepas de *P. cinnamomi* en Aguacate Hass, ésta ocurrió en poblaciones a 60 km de distancia.

LITERATURA CITADA

- Ben Y, Michelson E (2010) Avocado Rootstocks. Horticultural Review 17: 381-429.
- Coffey MD (1992) Phytophthora root rot of avocado. In Plant 22: 423-444.
- Dudzinski ML, Old KM, Gibbs RJ (1993) Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. Australian Journal of Botany 17: 35-37.
- Erwin DC y Ribeiro OK (1996) Phytophthora Diseases Worldwide. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- FAOSTAT (2011) ProdStat database, yearly production. <http://faostat.fao.org>. Fecha de consulta 1 de octubre de 2011.
- Hardhman RA (2005) Pathogen profile *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6: 589-604.
- Huberli D, Tommerup LC, Hardy GE (1997) The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi* Mycological Research 101: 1383-1388.
- Huberli D, Tommerup LC, Dobrowolski MP, Calver C, Hardy JG (2001) Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. Mycological Research 105: 1053-1064.
- Lin JJ, Kuo J (1995) AFLP a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus 17: 66-70.
- Linde C, Drenth A, Wingfield MJ (1999) Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. European Journal of Plant Pathology 105: 667-680.
- Ochoa FYM, Martínez VO, Olalde PV, Cerna ChE, Landeros FJ Hernández CFD, Flores OA (2007) Genetic Variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán México. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 161-166.

- Robin C, Desprez-Loustau ML (1998). Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Plant Pathology 104: 465-475.
- SAGARPA-SIAP (2011) SAGARPA-SIAP. Secretaria de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. Estadística pecuaria. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta 1 de septiembre de 2011.
- Téliz OD (2000). El Aguacate y su Manejo Integrado. Ed Mundi-Prensa. Mexico. D.F. 219 p.
- Téliz OD y Mora AA (2007). El aguacate y su manejo integrado. Segunda edición. Editorial Mundi Prensa. pp: 192-202.
- Tommerup IC, Hardy JG, Huberli D, Colquhoun IJ (1997). Selecting plants resistant to *Phytophthora cinnamomi*. Eleventh Biennial Austral Plant Pathol Soc Conference. 89 p.
- Tommerup IC (1998) Diseases wich disrupt natural ecosystems. Seventh International Conference of Plant Pathology. Edinburgh, Scotland p. 4.4.1S.
- Whiley AW, Schaffer B y Wosltenholme BN (2007) El Palto, botánica producción y usos. Ediciones Universitarias de Valparaiso. Pontificia Universidad Católica de Valparaiso Chile. 364 p.
- Zentmyer GA (1984) Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. California Avocado Society 69: 89-94.

