

■ Aislamiento, identificación y patogenicidad de hongos asociados a la tristeza del aguacatero en Michoacán, México

Y. Carranza Rojas, J. L. Morales García, M. E. Pedraza Santos, A. T. Chávez Bárcenas, K. L. Morales Montelongo Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, U.M.S.N.H., Uruapan, Michoacán, México.

RESUMEN

La tristeza del aguacate (*Persea americana*) es una de las principales enfermedades de raíz, que causa defoliación, secamiento de ramas y muerte del árbol en algunos casos rápidamente; ocasionando grandes pérdidas económicas. En Michoacán, se presenta en aproximadamente 5 % de la superficie cultivada. El objetivo del presente estudio fue aislar, identificar y realizar pruebas de patogenicidad de los hongos asociados a la raíz de aguacate con síntomas de tristeza. Se colectaron raíces de árboles enfermos para el aislamiento e identificación de los microorganismos, obtención de plantas sana de aguacate criollo raza mexicana para realizar los postulados de Koch, en laboratorio y en invernadero. En medio de cultivo PDA, se obtuvieron 27 Cepas. Para las pruebas de patogenicidad se seleccionaron los géneros de hongos fitopatógenos más importantes por su incidencia: *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *F. tabacinum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *Verticillium sp.*, *Cilindrocarpon sp.*, *Melanospora sp.*, y *Phytophthora cinnamomi*, a concentraciones de 1x10⁶ y 1x10⁹ conidio, en 200 mL de agua para cada planta. Se obtuvieron los síntomas a los 4 y 14 días en laboratorio y 7 a 52 días en vivero, confirmando los postulados de Koch. Se concluye que en la enfermedad están involucrados varios hongos, que actúan en tiempo y espacios diferentes en la rizosfera de la planta.

Palabras clave: Aislar, Identificar, Asociados, Inoculación, Rizosfera, aguacate.

INTRODUCCIÓN

El aguacate actualmente se cultiva en 59 países tropicales y regiones sub-tropicales (Bernal & Cipriano, 2008). México ocupa el primer lugar en plantaciones comerciales con 49 %, se obtiene el 34 % de la producción mundial, por lo cual se le considera el mayor productor en el mundo (FAOSTAT, 2013, SAGARPA, 2014). En México son 28 los Estados que reportan superficie sembrada de aguacate, Michoacán el principal productor convirtiéndose en la región productora más importante del mundo (SAGARPA, 2013). La Tristeza del Aguacatero es la enfermedad más importante y destructiva del cultivo de aguacate en el mundo, ataca árboles de todas las edades, incluyendo los de vivero, destruye las raicillas delgadas provocando la muerte al árbol. Los síntomas similares generados por los diferentes agentes causales y la carencia de un diagnóstico preciso, han generado prácticas inadecuadas de manejo, encaminados solo al control de *Phytophthora cinnamomi* como único agente causal. El efecto del mal manejo de la marchitez ha ocasionado pérdidas cuantiosas; resultando en el decaimiento y muerte de los árboles en meses o pocos años, después de la siembra (Ciro *et al.*, 2006; Tamayo, 2007; Aproare Sat, 2009; Duque, 2011; Vásquez *et al.*, 2011). En el estado de Michoacán esta enfermedad ocasiona daños en plantaciones del 8 al 15 % y se presenta en aproximadamente 5 % de la superficie cultivada afectando económicamente a productores, incide en la rentabilidad, incrementa costos de producción, reduce la producción y la calidad de la fruta (Morales, 2013). Los árboles afectados presentan un decaimiento progresivo el cual ofrece un aspecto general de marchitez, en el follaje se observa un color verde pálido, clorosis, defoliación, necrosis y hojas más pequeñas de lo normal. Posteriormente las hojas se caen empezando por las puntas de las ramas iniciándose así la defoliación. La fructificación va decayendo, aunque a veces se puede producir una fructificación excesiva, con muchos frutos de tamaño pequeño que no llegan a engordar (Morales, 2011). En la zona radical se observa la ausencia de raicillas y las raíces más viejas y gruesas desarrollan en su interior manchas de color castaño-rojizo cuando el árbol presenta un estado avanzado de la enfermedad. Cuando la enfermedad se detecta en sus inicios únicamente se observa que las raíces absorbentes se tornan de un color oscuro, se vuelven quebradizas y finalmente mueren. Los síntomas mencionados anteriormente se detectan fácilmente en época de lluvias (Morales, 2011). Años atrás se atribuía esta enfermedad únicamente a *P. cinnamomi*, sin embargo en los últimos años se han observado síntomas aéreos de muerte regresiva, brotes y ramas secas, que no han correspondido con el aislamiento de este patógeno. En Michoacán se carece de información completa sobre el complejo de la marchitez en aguacate y no se ha implementado un sistema de diagnóstico oportuno, preciso, organizado y concreto para todas las áreas en producción. Con base en lo anterior, los objetivos de este estudio fueron Aislar, identificar, realizar pruebas de patogenicidad con hongos asociados a la raíz de aguacate con síntomas de tristeza y determinar la severidad de los patógenos y el tiempo en el cual causan daño en plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en una etapa de campo y otra de laboratorio. La primera etapa consistió en la colecta de raíces de árboles enfermos con síntomas de tristeza de aguacate y colecta de semilla de aguacate criollo raza mexicana. La segunda consistió en el aislamiento e identificación de los microorganismos asociados al síntoma de tristeza y la realización de las pruebas de patogenicidad en el laboratorio de la facultad de agrobiología “Presidente Juárez”. La colecta de raíces se llevó a cabo en la huerta “El Salto 2” ubicada en Matangarán (San José del Valle) localizado en el municipio de Uruapan, del estado de Michoacán de Ocampo, México. Se colectaron raíces de 75 árboles con los síntomas de la enfermedad, los cuales se marcaron para tenerlos ubicados, las raíces presentaban un color café oscuro de aspecto quebradizo y se descortezaban fácilmente, cada una de las muestras fueron colocadas en bolsas de papel y fueron etiquetadas de acuerdo al orden de colecta, indicando la fecha y número de árbol. Las muestras se tomaron a una distancia de 50 cm del tronco del árbol realizando un bloque de 30X30X30 cm en el sistema radicular, se transportaron al laboratorio, para su posterior procesamiento.

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento y purificación de los patógenos fue Papa-Dextrosa-Agar PDA sintético adicionado con 7 mL de ácido tartárico al 10 % para evitar el crecimiento de bacterias, su almacenamiento fue a una temperatura de 4 °C previo a su uso. Las raíces colectadas en campo fueron lavadas con jabón y agua corriente, se cortaron secciones de tejido de 2 a 3 mm, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 a 30 segundos con agitación permanente, se enjuagaron en agua destilada estéril tres veces para eliminar el exceso de desinfectantes, se secaron y se sembraron en medio de cultivo PDA 5 secciones de tejido por caja Petri, posteriormente se sellaron los bordes con Kleen-Pack para evitar contaminaciones. Finalmente las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 24 °C en la oscuridad, cada uno de los aislamientos fueron purificados 15 días después en cajas Petri nuevas e incubadas de acuerdo a las condiciones ya mencionadas. Una vez purificado el material se realizó la identificación morfológica con ayuda de claves especializadas (Nelson *et al.* 1983; Barnett y Hunter, 1998). Con el fin de determinar si alguno de los microorganismos, aislados a partir de tejidos afectados por el síntoma de tristeza del aguacate, es el causante de esta enfermedad se realizaron pruebas de patogenicidad en laboratorio y en invernadero. Para lo cual se utilizó semilla procedente de aguacates criollos raza mexicana (*Persea americana*) de buena calidad, se obtuvieron alrededor de 200 semillas. El sustrato utilizado fue Peat Moos, las semillas se lavaron, se expusieron al sol por 20 a 30 minutos; luego se sumergieron en agua caliente a 49 °C durante 30 minutos; se realizó la escarificación de la semilla y el corte de candado, posteriormente se protegieron con un fungicida específico. Se sembraron 100 semillas en vasos de unicel de 1 L y fueron colocados en el invernadero de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, y 100 semillas en vasos de unicel del número 12, estas se dejaron en el laboratorio, regándose cuando se requería. Se realizaron las pruebas de patogenicidad de acuerdo con los postulados de Koch y la técnica descrita por Agrios (2005). Para lo cual se seleccionaron los hongos de acuerdo a la frecuencia de aparición. La inoculación se realizó en: plantas en condiciones de invernadero y en plántulas en condiciones de laboratorio. En caso de las plántulas en condiciones de laboratorio se realizó de la siguiente manera: Una vez que tenían seis o más hojas verdaderas se procedió a la inoculación. Cada inóculo se licuó en agua destilada estéril ajustando a una concentración de 1x10⁶ y 1x10⁹ esporas por mL de cada uno se colocaron 200 mL en frascos de cristal previamente esterilizados. Las plántulas de aguacate se sacaron de los vasos, se lavaron las raíces, se realizó una poda de raíz y se colocaron en frascos con la solución de los patógenos. Las plántulas se mantuvieron en el laboratorio observándose diariamente. Las evaluaciones se realizaron una vez por semana, evaluando daño (clorosis, necrosis y pudrición de raíces). En el caso de plantas de invernadero la inoculación se realizó de la siguiente manera: Una vez que las plantas alcanzaron 30 cm de altura, se sacaron del sustrato, se lavó la raíz y se procedió a realizar una poda; posteriormente se sumergieron en recipientes que contenía la solución con el patógeno a una concentración de 1x10⁶ y 1x10⁹ esporas/mL, respectivamente, las plantas permanecieron expuestas al patógeno durante un día; posteriormente se volvieron a colocar en los vasos con el sustrato. Las plantas inoculadas se dejaron en el invernadero, las evaluaciones se realizaron una vez por semana, tomando en cuenta la evolución de los síntomas. Al detectar síntomas de la enfermedad en las plantas, se procedió a hacer el reaislamiento, con el fin de observar las características del hongo desarrollado en las cajas Petri antes de hacer la inoculación. Se compararon las características morfológicas del hongo inoculado, los síntomas que presentaron las plantas inoculadas, periodo de incubación y daño de tejido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aislamientos de los 75 árboles muestreados se obtuvieron 27 cepas de hongos. Seis presentaron las mismas características macroscópicas y microscópicas de algunas especies de *Fusarium* siendo el hongo que se aisló con mayor frecuencia representando el 60.6 % de los aislamientos, encontrándose presente en la mayoría de los árboles seleccionados. Para la realización de las pruebas de patogenicidad se seleccionaron 10 cepas incluyendo las seis especies de *Fusarium* sp. y las cuatro siguientes en frecuencia de aparición, dentro de los cuales se encuentran los siguientes: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichioides*, *F. sambucinum*, *F. tabacinum*, *Verticillium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Melanospora* sp. Con las 10 cepas inoculadas en plantas sanas de aguacate (*Persea americana*), se evaluó la aparición de los síntomas hasta que se presentaron los daños más severos o muerte de las plantas observando si existía diferencia en el tiempo de aparición y severidad de los síntomas. Se obtuvieron los síntomas a los 4 y 14 días en laboratorio y 7 a 52 días en vivero en función de la concentración utilizada y el hongo inoculado, confirmando los postulados de Koch.

Los síntomas que presentaron las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichioides*, *F. sambucinum* y *F. tabacinum* fueron: Las plantas en laboratorio presentaron: En raíz coloración café o blanca en algunas, protuberancias café, la raíz principal presentó grietas, desprendimiento de corteza y de raíces delgadas y necrosis. En hojas se presentó clorosis, marchitez, manchas de un tono verde seco con una ligera coloración blanca y un halo café, manchas necróticas, necrosis, defoliación, algunas secas y adheridas y el tallo de algunas plantas tomó una coloración negra. Para *F. solani* algunas plantas continuaron en crecimiento. Estos síntomas coinciden con los reportados por (Dhingra y Muchovej, 1979; Nelson, 1981; Farr *et al.*, 1989; Jones, 1991; Vargas, 1992; Jones *et al.*, 1997; Chongo *et al.*, 2001; Ozbay y Newman, 2004; Martínez, 2006). Los síntomas causados por *F. moniliforme*, *F. sporotrichioides* y *F. tabacinum* no han sido reportados en árboles de aguacate. Los síntomas en invernadero fueron: Clorosis, mosaico en toda la superficie de algunas hojas, puntos de café a negros, manchas necróticas, necrosis de la orilla de la hoja hacia la nervadura central, defoliación, hojas secas en algunas plantas en su totalidad y adheridas al tallo y tallos de coloración negra.

Los síntomas que presentaron las plantas inoculadas con *Melanospora* sp., *Verticillium* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Cylindrocarpon* sp. fueron: Las plantas en laboratorio presentaron: En la raíz coloración café o blanca, desprendimiento, grietas en la corteza, protuberancias y necrosis. En el follaje clorosis, hojas marchitas, manchas pequeñas necróticas, necrosis en la orilla de las hojas, defoliación, hojas secas y adheridas, algunos tallos tomaron una coloración negra, hubo plantas que continuaron en crecimiento. En el caso de *Melanospora* sp. los síntomas presentes no han sido reportados en el cultivo de aguacate. Los síntomas observados con *Cylindrocarpon* sp. no coinciden con los reportados por (Grasso, 1984; Maluta y Larignon, 1991; Scheck *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2006 y Alanis, 2008) posiblemente debido a que la descripción corresponde a lo observado en plantas adultas y de vivero y en nuestro caso se trata de plantas que estuvieron desarrollándose en recipientes con agua y plantas criollas. Los síntomas en invernadero fueron: Clorosis, Hojas decaídas, marchitez, manchas necróticas, necrosis en puntas y orillas de hojas, brotes tiernos secos, defoliación parcial, hojas secas adheridas y enchinamiento en algunas hojas. Los síntomas observados con *Verticillium* sp. la mayoría coinciden con los reportados por (Agrios 1995; Baraona y Sancho, 2000 y Bernal y Díaz, 2005) pero en arboles adultos. *P. cinnamomi* presenta como síntoma característico el de raíces quebradizas (Sermeño, 2005; Morales, 2011) en el caso de las inoculaciones en invernadero no se presentó debido probablemente a que se trata de plantas jóvenes (Figura 1)



Figura 1. Síntomas de la enfermedad en plantas de aguacate en vivero y laboratorio, inoculadas con las especies de *Fusarium* utilizadas y reisolamiento del patógeno A y E) Síntomas de enfermedad en plantas en laboratorio a una concentración de 1×10^6 y 1×10^9 esporas/mL. C y G) Síntomas de enfermedad en plantas de invernadero a una concentración de 1×10^6 y 1×10^9 esporas/mL. B y F) Características microscópicas y macroscópicas de los reisolamientos de las plantas en laboratorio a concentración de 1×10^6 y 1×10^9 esporas/mL. D y H) Características microscópicas y macroscópicas de los reisolamientos de las plantas en invernadero a concentración de 1×10^6 y 1×10^9 esporas/mL.

La sintomatología que presentaron las plantas en laboratorio y en invernadero, las características macroscópicas, microscópicas y las pruebas de patogenicidad positivas en ambas inoculaciones, comprueban que los aislamientos corresponden a los hongos inoculados. En los tratamientos con las diferentes cepas, todos los hongos evaluados presentaron daños en la raíz de las plantas, esto debido a que ese tejido era el hospedante ideal para las cepas utilizadas, particularmente para las especies de *Fusarium* sp. y *P. cinnamomi* que fueron las cepas que presentaron daños más severos en este tejido. Entre los aislamientos que causaron más daños en las plantas esta *P. cinnamomi*, seguido de *F. oxysporum*, *Verticillium* sp. coincidiendo con (Morales 2011 y Ramírez 2013) que los reportaron como asociados a la tristeza del aguacate, mientras que *F. sambucinum* y *F. tabacinum* ocasionan pudrición de raíz en varios hospederos (Dhingra y Muchovej, 1979; Chongo *et al.*, 2001), *F. moniliforme* ha sido relacionado con enfermedades como leucoencefalomalacia en equinos (Maras, *et al.*, 1976) edema pulmonar en porcinos (Kriek, *et al.*, 1981) y en humanos se ha asociado con cáncer esofágico mediante la ingestión de maíz contaminado con sus toxinas (Chu y Li, 1994), *F. sporotrichioides* se asocia con pudriciones de mazorca se le relaciona con intoxicaciones en humanos y animales (Marasas, 1984; Beardall y Miller, 1994; Desjardins, 2006). Sin haber reportes de que éstos patógenos estén presentes en el cultivo del aguacate en la zona productora de Uruapan Michoacán, en esta investigación se demuestra que estas cepas son altamente agresivas para el cultivo en plantas de laboratorio y en invernadero, en un periodo de incubación de uno a dos meses en función de la concentración utilizada. *Melanospora* sp. es considerado como saprófito de restos vegetales en el suelo o en semillas (Hanlin 1990) y se ha reportado como asociado a los granos de arroz y de trigo con manchado sin haberse comprobado si es causante de ese síntoma o únicamente está presente sin causar enfermedad (Castaño, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2002; Bonilla *et al.*, 2002; Neninger *et al.*, 2003; Barrios y Pérez, 2005; Pineda *et al.*, 2007; Cardona y González, 2008); lo cual difiere con los resultados obtenidos ya que en altas concentraciones el hongo es capaz de provocar síntomas como clorosis, necrosis y defoliación en plantas de aguacate en laboratorio e invernadero lo que indica que en plantas débiles y cuando el patógeno se encuentra en altas concentraciones puede causar daño a la planta. *F. solani* en las inoculaciones en plantas de laboratorio no hubo síntomas severos y las plantas continuaron en crecimiento, lo cual probablemente se debe a que las condiciones de alta humedad no son favorecedoras para el patógeno, en las plantas en invernadero los síntomas fueron muy semejantes a las otras cepas utilizadas, de las especies de *Fusarium* fue la cepa que se evaluó por más tiempo extendiéndose por 6 y 3 meses en concentración de 1×10^6 y 1×10^9 esporas por mL respectivamente siendo la cepa que resulto menos agresiva, lo cual difiere con lo reportado por (Vargas, 1992).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 27 cepas de hongos asociados a la raíz de aguacate, utilizando 10 cepas en orden de frecuencia de aparición las cuales corresponden a *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *F. tabacinum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *Verticillium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Melanospora* sp., y *Phytophthora cinnamomi*.

- Las 10 cepas resultaron positivas en las pruebas de patogenicidad, confirmando que la enfermedad es causada por un complejo de hongos, siendo *P. cinnamomi* la cepa más agresiva en las cuatro inoculaciones utilizadas.
- De las seis especies de *Fusarium* inoculadas, cinco resultaron más agresivas: causando muerte de plantas. Mientras que *F. solani* fue poco agresiva.

LITERATURA CITADA

- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922 pág.
- Arbeláez TG. 2000. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*, some aspects of *Fusarium* genus and the *Fusarium oxysporum* species. Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Colombia.
- Barnett LH., Hunter BB. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 edición. Editorial Macmillan. 218 pp.
- Cantú RJM. 1998. Distribución de cepas de *Fusarium* moniliforme productoras de fumonisina b1 en maíz cultivado en el estado de Nuevo León. Tesis de maestría. Universidad Autónoma De Nuevo León Facultad De Ciencias Biológicas.
- Castaño ZJ. 1998. Etiología del manchado del grano de arroz de secano en Colombia e Indonesia. Arroz, Vol. 27 413:24-32
- García AG. y Martínez FR. 2008. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. Rev. Mex. Biodiv. Vol.81, n.1, Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532010000100003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-8706.
- Georgi JK. 1993. Metodología para la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad “tristeza del palto” aislamiento, identificación y patogenicidad de cepas de *Phytophthora* asociadas. Tesis. Universidad Católica De Valparaiso. Quillota Chile. http://www.avocadosource.com/papers/chile_papers_a-z/g-h-i/georgikaren1993.pdf
- Morales GJL. 2011. Enfermedades de importancia económica en el cultivo de aguacate. III Congreso latinoamericano del Aguacate memorias. corpoaguacate.com/pdf/.../pdf/enfermedadesimportanciaeconomica.pdf
- Nelson PE., Toussoun TA. y Marasas W. 1983. *Fusarium* species an illustrated manual for identification. The Pennsylvania state university press university park and London. 206p.
- Ramírez GGJ. 2013. Incidencia, diagnostico, comportamiento y alternativas de manejo de la marchitez del aguacate con énfasis en *Phytophthora cinnamomi* rands. Tesis Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellin.
- Ramírez GJG y Morales OJG. 2013. Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Colombia. Rev. Protección Veg. Vol.28, n.1 [Consulta octubre 2014], pp. 27-35. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1010-2752.
- Toussoun, T.A. & Nelson, P.E. 1976. *Fusarium* a Pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen 2da Ed. The Pennsylvania State University Press. 216p.