



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de aislamientos de *Phytophthora* asociados al cultivo de aguacate en el sur occidente de Colombia

Carol Julieth Marulanda Medina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia
2017

Identificación de aislamientos de *Phytophthora* asociados al cultivo de aguacate en el sur occidente de Colombia

Carol Julieth Marulanda Medina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D. Nubia Murcia Riaño
Corpoica C.I. Palmira

Codirector:

Ph.D. Jaime Eduardo Muñoz Flórez
Profesor titular

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos
Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2017

Dedicado a mi padres y hermano, con infinito agradecimiento por su apoyo y amor incondicional, mantenido a través del tiempo y la distancia.

A mi gran amiga Jacqueline Londoño, que siempre ha sido y será la mejor compañera de vida.

A ti, Arnold Higuita. Gracias por la tranquilidad brindada y por tu constante apoyo.

Agradecimientos

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica C.I. Palmira, por permitirme desarrollar todas las actividades de este trabajo en el laboratorio de Fitopatología y en la casa de malla.

Un especial agradecimiento a la doctora Nubia Murcia y al Ingeniero Agrónomo MSc.. Mauricio Martínez, por el apoyo, el ánimo infundido y la confianza depositada en mí. Todo fue posible gracias a ustedes.

A la investigadora Máster Diana M. Rodríguez, por ser una guía incondicional, por las valiosas contribuciones, por las enseñanzas y por el tiempo dedicado, pero sobre todo por su amistad.

A la Señora Luz Marina Acosta Torres, por su apoyo incondicional, por sus consejos y sus oraciones que siempre me llenaron de vitalidad. Parte de este trabajo se lo debo a usted.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Lizeth, Hover, Diego, Yeison, Alejandro, infinitas gracias por todas sus colaboraciones y por todos los momentos compartidos.

A los Agrónomos Jhon Correa y Hermilzon Escobar, por su colaboración en el inicio de este trabajo.

A los asistentes de investigación pertenecientes al laboratorio de Fitopatología por el apoyo brindado en el transcurso de todo el trabajo.

Al profesor Jaime Eduardo por el tiempo dedicado. A mis compañeras de maestría, Viviana, Sandra, Martha y por supuesto, a Carlo Alberto; conocerlos fue gratificante.

Por último, gracias a mi familia, tías y primos, que siempre me apoyaron y acompañaron.

Resumen

Phytophthora sp. es un oomycete que en Colombia se encuentra asociado a la pudrición radical en varias de las zonas productoras de aguacate (*Persea americana*). *Phytophthora* sp. está presente en el suelo y factores como el nivel freático alto, excesos de humedad y mal drenaje, influyen en la presencia del patógeno. Algunos departamentos del sur occidente del país han incrementado las áreas de siembra del cultivo de aguacate y junto a este incremento se han encontrado síntomas de pudriciones, amarillamiento y retraso del crecimiento de los árboles, los cuales están relacionados con el patógeno. Una de las estrategias de manejo para la pudrición radical causada por *Phytophthora* sp. es la utilización de portainjertos tolerantes, sin embargo, el mecanismo de infección del patógeno resulta complejo, por lo que es necesario conocer su biología y genética a la hora de implementar un método control. En la presente investigación se aislaron e identificaron 45 aislamientos de *Phytophthora* procedentes de tres departamentos de Colombia. Los aislamientos se obtuvieron de muestras de suelo y raíces de árboles de aguacate sanos y enfermos. Mediante un análisis morfológico a género, con características macroscópicas de las colonias y microscópicas de las estructuras, y molecular a especie, con la utilización de marcadores moleculares (secuencias de la región interna transcrita -ITS), se comprobó la identificación de los aislamientos; posteriormente se evaluó la patogenicidad de estos aislamientos con la metodología de inoculación con micelio en herida al tallo de plantas de aguacate Hass y con una prueba de inoculación artificial en hojas de aguacate. Se obtuvieron 45 aislamientos del orden Oomycetes. Los análisis morfológicos de las colonias indicaron que los aislamientos presentaron dos tipos de crecimiento: 11 aislamientos con colonia tipo estrella y 34 aislamientos con colonia tipo roseta, característica que los identifica como *Phytophthora*; estos aislamientos presentaron micelio coraloide, hinchazones hifales y esporangios no papilados, a diferencia de las otras (11 aislamientos tipo estrella) que presentaron micelio liso y sin esporangios, por lo cual no se identifican dentro del género *Phytophthora*. Con las regiones ITS 1 y 4 se comprobó que los 34 aislamientos de *Phytophthora* pertenecen a la especie *P. cinnamomi*. Con la metodología de inoculación por herida al tallo, se evidenció que los

34 aislamientos de *P. cinnamomi* fueron capaces de producir necrosamiento en plantas de aguacate Hass. De acuerdo con los análisis estadísticos, los aislamientos más patogénicos fueron Tamb-09, Cajib-37 y Dag-65. El aislamiento Tamb-09 se destacó como el más agresivo con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), mientras que el aislamiento Per-128 fue menos agresivo, ya que no produjo necrosamiento en el tallo. La prueba de inoculación artificial en discos de hojas permitió obtener una suspensión de zoosporas móviles y una leve lesión en los discos inoculados con el aislamiento más patogénico Tamb-09; aunque no se generaron suficientes síntomas de necrosamientos en todos los discos de hojas, este ensayo preliminar genera bases para continuar con una metodología alterna para producir inoculaciones. Estos resultados confirman la presencia de *Phytophthora cinnamomi* en cultivos comerciales de aguacate de los departamentos del Cauca, Valle del Cauca y Risaralda; además, la colección de aislamientos patogénicos se constituye en un potencial para establecer ensayos de tolerancia en materiales de aguacate utilizados como portainjertos.

Palabras clave: *P. cinnamomi*, morfología, identificación molecular, patogenicidad, pudrición radical.

Abstract

Phytophthora sp. is an oomycete that in Colombia is associated with root rot in several of the avocado producing areas (*Persea americana*). *Phytophthora* sp. is present in the soil and factors such as the high phreatic level, excess moisture and poor drainage influence the presence of the pathogen. Some departments of the south west of the country have increased the planting areas of the avocado crop and along with this increase have been found symptoms of decay, yellowing and retardation of the growth of the trees, which are related to the pathogen. One of the management strategies for root rot caused by *Phytophthora* sp. is the use of tolerant rootstocks, however, the mechanism of infection of the pathogen is complex, so it is necessary to know their biology and genetics when implementing a control method. In the present investigation, 45 isolates of *Phytophthora* from three departments of Colombia were isolated and identified. Isolates were obtained from soil and roots samples from healthy and diseased avocado trees. By means of a morphological analysis to gender, with macroscopic characteristics of the colonies and microscopic of the structures, and molecular to species, with the use of molecular markers (sequences of the internal region transcripta -ITS), the identification of the isolates was proved; subsequently the pathogenicity of these isolates was evaluated with a methodology of inoculation with mycelium in wound to the stalk of Hass avocado plants and with a test of artificial inoculation in avocado leaves. We obtained 45 isolates of the order Oomycetes. The morphological analyzes of the colonies indicated that the isolates presented two types of growth: 11 isolates with star-type colony and 34 isolates with rosette-type colony, a characteristic that identifies them as *Phytophthora*; these isolates presented coralloide mycelium, hyphal swellings and nonpapillated sporangia, unlike the others (11 star type isolations) that presented smooth mycelium and without sporangia, therefore they are not identified within the genus *Phytophthora*. With regions ITS 1 and 4 it was found that the 34 *Phytophthora* isolates belong to the species *P. cinnamomi*. With the methodology of inoculation by wound to the stem, it was evidenced that the 34 isolations of *P. cinnamomi* were capable of producing necrosis in Hass avocado plants. According to the statistical analyzes, the most pathogenic isolates were Tamb-09, Cajib-37 and Dag-65. The Tamb-09 isolation stood out as the most aggressive with significant statistical difference ($P < 0.05$),

whereas the Per-128 isolation was less aggressive, since it did not produce necrosis in the stem. The artificial inoculation test in leaf discs allowed obtaining a suspension of mobile zoospores and a slight lesion in the discs inoculated with the most pathogenic isolation Tamb-09; although sufficient symptoms of necroses were not generated in all leaf discs, this preliminary test generates bases to continue with an alternative methodology to produce inoculations. These results confirm the presence of *Phytophthora cinnamomi* in commercial avocado cultivation in the departments of Cauca, Valle del Cauca and Risaralda; In addition, the collection of pathogenic isolates constitute a potential to establish tolerance tests on avocado materials used as rootstocks.

Keywords: *P. cinnamomi*, morphology, molecular identification, pathogenicity, root rot.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. Justificación	7
1.1 Hipótesis.....	11
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo General.....	13
2.2 Objetivo Específicos	13
3. Marco teórico y revisión de literatura	15
3.1 El cultivo de aguacate.....	15
3.1.1 Centro de origen del aguacate	15
3.1.2 Razas y principales características	16
3.1.3 Aspectos técnicos del cultivo.....	17
3.2 El cultivo del aguacate en Colombia	18
3.3 Patosistema <i>Persea americana</i> – <i>Phytophthora cinnamomi</i>	19
3.3.1 La enfermedad pudrición radical	20
3.3.2 El hospedero – <i>Persea americana</i>	20
3.3.3 El patógeno – <i>Phytophthora cinnamomi</i>	21
3.3.4 Importancia de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	21
3.3.5 Clasificación Taxonómica de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	22
3.3.6 Características morfológicas de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	23
3.3.7 Estructuras de supervivencia de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	24
3.3.8 Ciclo biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	25
3.3.9 Factores ambientales relacionados al patosistema	26
3.3.10 Sintomatología	27
3.4 Identificación, detección y diagnóstico de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	28
3.4.1 Identificación en campo.....	29
3.4.2 Identificación in vitro.....	29
3.4.3 Inducción de esporangios	30
3.4.4 Cultivo en placa y trampeo	30
3.4.5 Técnicas de biología molecular	31
3.5 Tolerancia y resistencia de portainjertos de aguacate a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	33

3.6	Métodos para evaluar tolerancia en diferentes materiales de aguacate	35
4.	Materiales y métodos.....	39
4.1	Localización	39
4.2	Establecimiento de una colección de aislamientos de <i>P. cinnamomi</i>	39
4.3	Caracterización morfológica	41
4.3.1	Medición del crecimiento radial de la colonia	41
4.3.2	Producción de esporangios.....	42
4.4	Caracterización molecular	43
4.4.1	Extracción de ADN	43
4.4.2	Amplificación por PCR	43
4.4.3	Digestiones del fragmento amplificado	44
4.4.4	Secuenciación de la región ITS	45
4.5	Selección de aislamientos patogénicos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	46
4.6	Prueba de inoculación artificial en hojas.....	46
4.7	Análisis de datos	48
5.	Resultados y discusión	49
5.1	Establecimiento de una colección de aislamientos de <i>P. cinnamomi</i>	49
5.2	Caracterización morfológica	50
5.2.1	Crecimiento radial de la colonia	50
5.2.2	Producción de esporangios.....	51
5.3	Caracterización molecular	54
5.3.1	Extracción de ADN	54
5.3.2	Amplificación por PCR	54
5.3.3	Digestiones del fragmento amplificado	56
5.3.4	Secuenciación de la región ITS	60
5.4	Selección de aislamientos patogénicos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	62
5.5	Prueba de inoculación artificial en hojas.....	64
5.6	Análisis de datos	66
6.	Conclusiones y recomendaciones	69
6.1	Conclusiones.....	69
6.2	Recomendaciones.....	70
A.	Anexo: Aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> pertenecientes al laboratorio de Fitopatología de Corpoica C.I. Palmira.....	71
B.	Anexo: Crecimiento de las colonias de la colección de aislamientos	75
	Bibliografía	77

Lista de figuras

Pág.

Figura 3-1:	Ciclo de la enfermedad de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . Fuente: Dann et al. (2013)	26
Figura 4-1:	Técnica de cultivo trampa (Erwin y Ribeiro, 1996) con manzanas verdes maduras.	41
Figura 4-2:	Inoculación con micelio en herida al tallo (Corpoica, 2009)	46
Figura 4-3:	Discos inoculados con suspensión de zoosporas (Barreto et al, 2015; Argolo-Magalhaes et al, 2016)	47
Figura 5-1:	Aislamiento reactivado y purificado en medio PDA	49
Figura 5-2:	A. Micelio cenocítico y coraloide. B. Hinchazones hifales. C. Clamidoporas. 40x	50
Figura 5-3:	A. Aislamiento con colonia tipo rosáceo, a los 9 dds. Procedente del Valle del Cauca. B. Aislamiento con colonia tipo estrella, a los 7 dds. Procedente del Valle del Cauca	51
Figura 5-4:	Formas de esporangios observadas en los aislamientos. A. Esporangios ovoide-elongado sin papila. B. Esporangios limoniformes sin papila. 40x	53
Figura 5-5:	Medición de esporangio elongado no papilado. 100x	53
Figura 5-6:	Gel de agarosa al 1.5 % a 100 voltios por 60 minutos, en cada carril se adicionó: 1.5 µl de marcador de peso molecular de 100 pb (M) y 2.5 µl del producto amplificado más 2 µl de azul de bromofenol+GelRed 13.3x (1 µl de GelRed por cada 750 µl de azul de bromofenol)	55
Figura 5-7:	Digestión del producto amplificado A2/I2 con enzima MspI. Gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) teñido con GelRed, se corrió a 160 voltios por 70 minutos, en cada carril se adicionó: 2µl de marcador de peso molecular de 100 pb (M) y 4µl del producto digerido más 2 µl de azul de bromofenol	57
Figura 5-8:	Digestión del producto amplificado A2/I2 con enzima RsaI. Gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) teñido con GelRed, a 160 voltios-70 minutos, en cada carril se adicionó: 2µl marcador de peso molecular 100 pb (M), 1µl marcador de peso molecular 50 pb y 4µl del producto digerido más 2 µl de azul de bromofenol	58
Figura 5-9:	Digestión del producto amplificado A2/I2 con enzima TaqI. Gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) teñido con GelRed, a 160 voltios-60 minutos, en cada carril se adicionó: 2µl marcador de peso molecular de 100 pb (M), 1µl marcador de peso molecular de 50 pb y 4µl del producto digerido más 2 µl de azul de bromofenol	59

Figura 5-10: Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen ITS ADN de las amplificaciones de <i>P. cinnamomi</i>	61
Figura 5-11: Avance de la lesión a los 6 ddi. A. Testigo. B. Cajib-37. C. Dag-65B. D. Tamb-09.....	62
Figura 5-12: Desarrollo de la lesión. A. Tamb-09, 6 ddi. B. Cajib-37, 9 ddi. C. Dag-65B, 9 ddi. D. Testigo.....	63
Figura 5-13: Liberación de zoosporas móviles después de someter a choque térmico los esporangios de <i>P. cinnamomi</i>	64
Figura 5-14: Discos inoculados con 20µL de una suspensión de zoosporas a $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ zoosporas móviles. A. Cajib-37. B. Dag-65B. C. Tamb-09. D. Testigo	65
Figura 5-15: Avance de la lesión (cm) de los aislamientos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en las cinco evaluaciones.	68
Figura 5-16: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de los aislamientos más patogénicos, el aislamiento menos agresivo y un testigo absoluto.....	68

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1: Principales características por tipo de variedad de aguacate.	16
Tabla 4-1: Secuencia de cebadores de oligonucleótidos específicos del género <i>Phytophthora</i>	44
Tabla 4-2: Tamaños de las bandas (pb) esperadas de la digestión del producto de la amplificación con las enzimas de restricción <i>MspI</i> , <i>RsaI</i> y <i>TaqI</i>	45
Tabla 5-1: Prueba múltiple de medias por Duncan para selección de aislamientos patogénicos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	66
Tabla 5-2: Análisis de varianza (ANOVA) para selección de aislamientos patogénicos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	¡Error! Marcador no definido.

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill), es una fruta tropical perteneciente a la familia de las lauráceas; se ubica en el quinto lugar en términos de volumen de producción y área cultivada en el mundo (Tamayo, 2007, p53). Por su importancia económica, es un cultivo que cuenta con una amplia distribución a nivel mundial y en los últimos 20 años México se ha mantenido en el primer lugar de las lista de los países productores de aguacate en el mundo, seguido se encuentra Indonesia, Estados Unidos de América, Republica Dominicana y Colombia ocupa el quinto lugar (FAOSTAT, 2017) Se estima que la producción mundial de aguacate se encuentra entre los 3.5 millones de toneladas y su consumo se centra en países como Estados Unidos, Francia, Alemania, y España (Schaffer et al, 2013; Yabrudy, 2012).

En Colombia la producción de aguacate se ha incrementado en un 25%, dado que se aumentado su consumo y se han generado nuevos mercados de exportación (SIOC-MADR, 2016). Rios & Tafur (2003) reportaron en un trabajo investigativo de mercados que Colombia al producir aguacates desde el nivel del mar hasta los 2.200 metros de altura, posee un gran potencial exportador, tanto como fruta fresca, como procesada, por las características de las variedades cultivadas y las condiciones agroclimáticas de las regiones productoras.

Este frutal tiene un gran potencial en los mercados internacionales, en el que se destaca la preferencia de los consumidores por el aguacate Hass por sus bondades nutricionales y de sabor (AGRONET, 2017). De acuerdo con la Encuesta Nacional Agropecuaria durante el año 2015 Colombia tenía 58.784 hectáreas plantadas de aguacate, de las cuales 37.917 se encontraban en plena producción con rendimientos de 9,4 toneladas de fruta por hectárea, lo que equivale a una producción total de 309.498 toneladas (DANE, 2016). Se calcula que el 86% del total de área sembrada del país se ubica en los departamentos de Caldas, Tolima, Antioquia, Cesar, Santander, Bolívar, Risaralda, Quindío y Valle del Cauca. Para destacar, el incremento en áreas sembradas en aguacates criollos es cerca

de 38% en los últimos 5 años y de 126 % en el caso del aguacate Hass. (AGRONET, 2017).

El crecimiento exponencial del cultivo de aguacate en el mercado ha generado que los productores mejoren los procesos productivos de la cadena, garantizando que sus siembras estén libres de enfermedades, el cual es un factor que limita el desarrollo de las plantaciones de aguacate. Este cultivo presenta un número importante de problemas fitosanitarios, entre ellos la enfermedad llamada pudrición radical (*Phytophthora Root Rot* – *PRR*) causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, que afecta las raíces y el sistema vascular de los árboles. *P. cinnamomi* es un Oomycete, un grupo diverso de organismos heterotrófico que morfológicamente y fisiológicamente se asemejan a los hongos, pero son filogenéticamente distante de ellos (Gabor & Coffey, 1991; Tamayo, 2007; Coffey, 1987; Tyler, 2002).

La pudrición de radical del aguacate está presente en todas las regiones de cultivos de aguacate y se convirtió en un problema fitosanitario en los años 20 (Zentmyer, 1980). En Colombia, la pudrición radical o pudrición de raíces como también se le conoce, se destaca por ser la enfermedad de mayor importancia por su frecuencia y severidad en todas las zonas productoras de aguacate. Esta enfermedad causa necrosamiento de raíces en árboles de cualquier edad y cuando el patógeno ha invadido el sistema radical, se genera una marchitez generalizada, que provoca pérdidas del 30-50% de los árboles en la etapa de vivero y durante el establecimiento del cultivo (Andrade-Hoyos, 2012; Tamayo, 2007), Según Bernal y Díaz (2005) la pudrición radical se ha reportado en todas las zonas aguacateras de Colombia y ha causado el abandono de muchos cultivos. En el país la enfermedad se presenta en cultivos de aguacate ubicados en los departamentos del Valle del Cauca, Quindío, Caldas, Risaralda, Antioquia, Tolima, Cesar y Cundinamarca (Tamayo, 2007).

El mecanismo de operación de *P. cinnamomi* durante las etapas del proceso infectivo en el cultivo del aguacate puede llegar a ser complejo, por lo que resulta indispensable conocer la biología y la genética del patógeno, así como la interacción en el patosistema microorganismo–hospedante. Sus estructuras especializadas le permiten tener un comportamiento constante en la rizosfera del suelo. Éstas le confieren la capacidad de

dispersión en el ambiente y resistencia a condiciones adversas (Rodríguez-López et al, 2009; Calle, 2017; Andrade, 2012; Torres, 2007).

El desarrollo de la enfermedad se asocia a diferentes factores bióticos y abióticos como el genotipo del árbol, las condiciones físicas y químicas del suelo, así como el clima de la región, presentándose con mayor severidad en condiciones húmedas tropicales y subtropicales. Suelos con mal drenaje, arcillosos, con capas endurecidas y con un nivel freático alto favorecen el rápido avance de la pudrición radical (Erwin y Ribeiro, 1996; Echemendia, 2007; Romero, 2014)

Los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad, más las estructuras especializadas, como esporangios y zoosporas para la supervivencia y diseminación a corto plazo, y clamidosporas y oosporas para una mayor supervivencia a largo plazo, hacen que las técnicas de control sean costosas y de difícil manejo (Drenth & Sendall, 2001). Algunas alternativas de manejo de la enfermedad han estado centradas en la utilización de abonos orgánicos, microorganismos antagonistas (*Trichoderma*), coberturas vegetales (Mulch), inyecciones con fungicidas (Fosetyl Al), fertilizantes a base de calcio y nitrógeno amoniacal, sin embargo, el uso de patrones resistentes se perfila como un control efectivo de la pudrición radical. Zentmyer & Schieber (1987) establecen que un control efectivo de *P. cinnamomi* puede ser el uso de patrones resistentes y que la búsqueda a largo plazo de estos materiales es determinante para el desarrollo del cultivo del aguacate.

Durante años se han realizado estudios de tolerancia a *P. cinnamomi*, los cuales fueron iniciados por Zentmyer (1952), quien realizó una búsqueda de patrones tolerantes o resistentes en 18 países. A través de técnicas de inoculación en plantas se ha evaluado la tolerancia de materiales de aguacate a *P. cinnamomi* (Botha et al, 1989; Salgado & Fucikovsky, 1996) y algunos de ellos han tenido éxito hasta cierto punto, por lo cual el potencial de estos árboles impulsó la evaluación y comparación de varias técnicas in vitro, y la investigación de la modificación de estos procedimientos, así como nuevos métodos para detectar la tolerancia y resistencia de las raíces de aguacate a *P. cinnamomi* (Botha et al, 1989); Sin embargo, después de someterse los árboles seleccionados a muchos años de pruebas intensivas en invernaderos y en campo, ningún portainjerto disponible comercialmente tiene resistencia completa a la enfermedad (Nielsen, 2016).

La búsqueda de patrones o porta injertos de aguacate tolerantes a *P. cinnamomi* en Colombia se ha centrado en la identificación de estos materiales de aguacate, ya que a nivel comercial las semillas utilizadas para producir los porta injertos son susceptibles a la pudrición radical causada por *P. cinnamomi* y se desconoce el origen de éstas. La corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) en el 2009 en conjunto con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y el vivero Profrutales, durante la ejecución del proyecto “Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a *Phytophthora* spp”, desarrollaron actividades de diagnóstico e inspección a cultivos comerciales de aguacate de diversas zonas del país y evaluaron mediante inoculaciones controladas a nivel de invernadero 42 accesiones de aguacate (común o criollo), estableciendo cinco niveles de patogenicidad entre los aislamientos de *P. cinnamomi*. Los resultados indicaron alta patogenicidad de tres aislamientos utilizados y tolerancia de cuatro accesiones de aguacate. Un estudio desarrollado con accesiones del banco de germoplasma de aguacate de Corpoica C. I. Palmira, en el que se evaluó el potencial de estas como porta injertos resistentes a *P. cinnamomi*, concluyó que una de las accesiones era promisoría por su alta resistencia (Rodríguez, 2015).

Teniendo en cuenta que, para poder desarrollar algún método de control, entre ellos el uso de porta injertos tolerantes a *P. cinnamomi*, se hace necesario conocer e identificar las variantes del patógeno, por lo cual en este trabajo se realizó una caracterización morfológica, molecular y patogénica de aislamientos de *P. cinnamomi* de tres departamentos del sur occidente colombiano.

La identificación de *P. cinnamomi* anteriormente no había sido desarrollada con rigurosidad y se basaba en criterios morfológicos. La utilización de pruebas de diagnóstico convencionales a partir de tejido vegetal con síntomas y la inducción de formación de estructuras para revelar caracteres de valor taxonómico, permiten identificar el patógeno hasta cierto punto, ya que se requieren habilidades y tiempos considerables que pueden dificultar el desarrollo de ensayos con grandes cantidades de muestras. Sin embargo, se han desarrollado una variedad de técnicas moleculares para la detección e identificación precisa de las especies de *Phytophthora* (Drenth y Sendall 2001; Ribeiro 1978; Erwin y Ribeiro 1996; Drenth et al, 2006).

Lo anterior hace necesario desarrollar estudios que proporcionen un mayor conocimiento sobre las características específicas de la especie *P. cinnamomi* asociada al cultivo de aguacate en el sur occidente de Colombia, de modo que se generen bases para la implementación de programas que busquen porta injertos resistentes a la enfermedad como una estrategia de manejo.

Para la caracterización morfológica, molecular y patogénica realizada en este estudio, las muestras de suelo y raíces de árboles de aguacate sanos y con síntomas de la enfermedad, colectadas en los departamentos del Cauca, Valle del Cauca y Risaralda, fueron llevadas al laboratorio y se procesaron con las técnicas de siembra de segmentos de tejido en cajas de petri con medio selectivo y con cultivo trampa (Erwin y Ribeiro, 1996). Los aislamientos se evaluaron mediante un análisis morfológico a género, con características macroscópicas de las colonias y microscópicas de las estructuras, teniendo en cuenta los estudios realizados por Drenth & Sendall (2001), Georgi (1993) y Chen-Zentmyer (1970). Para la identificación molecular a nivel de especie se utilizaron marcadores moleculares, a través de la técnica de ITS 1 y 4, que ha sido ampliamente usada para dilucidar relaciones filogenéticas, diferenciando entre especies (Drenth et al, 2006). Los productos amplificados de la región ITS 1 y 4 por PCR usando el cebador directo A2 en combinación con el cebador inverso I2, fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción RsaI, MspI, TaqI, mediante la técnica PCR –RFLP, descrito por Drenth et al. (2006) y Silva et al. (2009). Los cebadores PA2-CICA-P (F) y PI2-CICA-P (R) fueron seleccionados debido a que son “género específicos” y han sido ampliamente utilizados para diferenciar entre especies de *Phytophthora* (Drenth et al, 2006). Para una correcta identificación de la especie *P. cinnamomi*, los productos de PCR –ITS, se enviaron a la compañía MacroGen, para su secuenciación directa. Finalmente, los aislamientos se evaluaron por su patogenicidad con la metodología de inoculación con discos de micelio en herida al tallo de plantas de aguacate Hass (Corpoica, 2009) y con una prueba de inoculación artificial en discos de hojas de aguacate (Barreto et al, 2015; Magalhaes et al, 2016).

1. Justificación

La producción mundial de aguacate sobrepasa las 3.5 millones de toneladas, de las cuales se comercializa el 20%; además, el consumo de este fruto ha aumentado especialmente en países como Estados Unidos, Francia, Alemania, y España, por lo cual se han incrementado las áreas cultivadas en todos los países productores, principalmente en México, Chile, España, Sudáfrica, Australia, Perú, Israel y Estados Unidos. En Colombia durante los últimos años el cultivo del aguacate ha incrementado su área y las exportaciones han experimentado una dinámica ascendente, ya que para el año 2016 se registró una variación positiva del 228 % en volumen, alcanzando las 18.201 toneladas exportadas por un valor de USD 35,04 millones en comparación con las 5.543 toneladas en 2015 (USD 10,2 millones), registrando una variación en precio del 241 %. El fruto con su gran valor nutritivo genera una buena rentabilidad por su alto consumo a nivel local y en el mercado internacional; sin embargo, el cultivo requiere un alto desarrollo tecnológico enfocado en el manejo fitosanitario. (Schaffer et al, 2013; Yabrudy, 2012; Corpoica, 2017)

El cultivo de aguacate se enfrenta a una serie de limitaciones fitosanitarias, por lo cual se debe mantener un monitoreo permanente sobre las enfermedades, que se ven favorecidas por condiciones climáticas excesivas. Uno de los problemas fitosanitarios más importantes que tienen que enfrentar los productores de aguacate, es la pudrición de raíces o tristeza del aguacate ocasionada por *Phytophthora cinnamomi*, cuya presencia está relacionada con el manejo inadecuado del cultivo, factores ambientales y patrones utilizados. Además, se reporta que la variabilidad de los materiales cultivados, factores abióticos y un control fitosanitario deficiente, predisponen el cultivo al ataque de numerosos patógenos (Corpoica, 2017; Vidales-Fernández, 2002).

P. cinnamomi es la especie más dispersa en muchos países del mundo y con un alto número de hospederos. Produce la enfermedad más grave en los cultivos de aguacate en

países como Australia, Nueva Zelanda, Israel, España, África, Estados Unidos, México y países de América y el Caribe. En América Latina, el patógeno fue introducido probablemente de alguna región de Asia Suroriental. Los trabajos de Zentmyer (1961) confirmaron ampliamente la patogenicidad de *P. cinnamomi* y establecieron que el agua es el factor más importante en la formación, dispersión y germinación de las zoosporas (Newel, 1994; Zentmyer, 1992).

Durante años este patógeno ha generado en el mundo pérdidas significativas en los cultivos. En 1974 *P. cinnamomi* causó la pérdida de más del 50% de los árboles de aguacate en Queensland (EE.UU.) y en California alrededor del 60-75% de la superficie cultivada se infectó, causando pérdidas económicas significativas. En México, el patógeno está presente en todas las principales áreas productoras de aguacate, con incidencias que varían entre 5-90%. Los primeros reportes de la enfermedad en el estado de Michoacán (México) fueron en 1979 con 13 mil árboles enfermos. En regiones de Sudáfrica donde se han establecido nuevos huertos de aguacate, el 20% de los árboles se han visto afectados. Así como ha ocurrido en otros países productores de aguacate, en Colombia los cultivos se ven afectados por *P. cinnamomi*, que es la principal especie registrada como la causante de la enfermedad pudrición radical y la cual reporta pérdidas del 50% de los árboles en la etapa de establecimiento en campo (Pegg & Giblin, 2008; Gabor & Coffey, 1991; Lara-Chávez et al, 2007; Ramírez et al, 2014; Pérez-Jiménez, 2008; Teliz, 2000; Tamayo, 2007).

Los departamentos con mayor presencia de la enfermedad son Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Quindío, Tolima y Cesar, siendo este último uno de los principales productores más afectado por *P. cinnamomi*, que durante los últimos años ha causado una disminución del 23 % de la producción de aguacate en el departamento (Tamayo, 2007). En los departamentos de Risaralda, Valle del Cauca y Cauca se ha observado un incremento de las áreas de siembra del cultivo de aguacate y junto a este incremento se han encontrado síntomas de pudriciones, amarillamiento y retraso del crecimiento de los árboles, los cuales están relacionados con el patógeno. La diseminación de la enfermedad se ha asociado al uso de materiales no certificados, a las condiciones físicas y químicas del suelo y a la detección tardía en los cultivos. Estas limitantes han generado problemas sociales en las regiones productoras de aguacate (Romero, 2014; ICA, 2009).

La presencia de *P. cinnamomi* en cultivos comerciales tiene amplios impactos que son económicamente importantes en la silvicultura, la horticultura y en la industria de viveros. Este patógeno posee una serie de estrategias para la supervivencia, la propagación y la diseminación. Asimismo, el cambio climático tiene una influencia significativa en la intensidad y distribución de la enfermedad (Kamoun et al, 2015; Thompson et al, 2014).

Este patógeno crece como filamentos de tamaño microscópico (micelio) y ataca el sistema radical de las plantas. Causa lesiones con áreas necróticas, lo cual reduce o detiene el movimiento de agua y nutrientes dentro de la planta (Parks, 2001). Posee estructuras especializadas que le permite tener un comportamiento constante en la rizosfera del suelo. Estas le confieren la capacidad de dispersión en el ambiente y resistencia a condiciones adversas. El patógeno está presente en el suelo y en restos vegetales, y cuando las condiciones son favorables se presenta la fase asexual, en la cual germinan esporangios que dan origen a zoosporas biflageladas. En la rizosfera de la planta se forman los esporangios que aumentan rápidamente el inóculo en el suelo en un periodo de tiempo corto. Los dos caracteres de diagnóstico de los estados asexuales son la abundancia de hifas coraloides y los agrupamientos en forma de racimos de clamidosporas; mientras que el retrocruzamiento de los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) produce micelio que se caracteriza por tener abundantes hinchamientos hifales o vesículas hinchadas (Calle, 2017; Andrade-Hoyos, 2012; Torres, 2007).

Todos los estudios de identificación de *P. cinnamomi* se han soportado en claves taxonómicas citadas por diversos autores; además de los enfoques morfológicos se han reportado estudios que detallan diferentes técnicas moleculares para la identificación de este patógeno, las cuales simplifican y mejoran la precisión de los diagnósticos e identificación de aislados a un nivel de especie. Algunas de estas técnicas incluyen el uso de patrones de proteínas e isoenzimas; otras se basan en el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN nuclear y mitocondrial y, la más utilizada, la PCR (Polymerase Chain Reaction), con iniciadores específicos para cada especie. Los resultados de esta técnica producen una valiosa información sobre taxonomía, filogenia y variabilidad del Oomycete (Gallegly y Hong, 2008; Tsai et al, 2006; Martín et al, 2000; Martin & Tooley, 2004).

En Colombia, la búsqueda de porta injertos tolerantes aún no se ha explorado lo suficiente, debido a que no se han identificado ni se han evaluado en condiciones de campo clones tolerantes. Estos estudios han sido una tarea difícil, ya que, para producir porta injertos a nivel comercial, los viveros utilizan semillas de origen desconocido y que son susceptibles a la pudrición radical.

Teniendo en cuenta que la pudrición radical es una limitante en la producción del cultivo y que los porta injertos que se utilizan para la producción comercial son susceptibles a la enfermedad, este trabajo se orienta a realizar la caracterización morfológica, molecular y patogénica de la colección de aislamientos *Phytophthora* spp. obtenidos de árboles de aguacate de tres departamentos de Colombia, con el fin de que se puedan desarrollar métodos de evaluación y selección de materiales de aguacate, en condiciones controladas que permitan generar avances científicos y aportes que ayuden a disminuir el impacto de la enfermedad en las zonas productoras del país.

1.1 Hipótesis

A. Hipótesis Nula:

Los aislamientos de *Phytophthora* sp. no corresponden a la especie *P. cinnamomi*.

No hay infección diferencial en los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de tres departamentos del sur occidente de Colombia.

B. Hipótesis Alternativa:

Los aislamientos de *Phytophthora* sp. corresponden a la especie *P. cinnamomi*.

Hay infección diferencial en los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de tres departamentos del sur occidente de Colombia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar las características morfológicas, moleculares y patogénicas de aislamientos de *Phytophthora* obtenidos en huertos de aguacate de tres departamentos del sur occidente de Colombia.

2.2 Objetivo Específicos

- Establecer una colección de aislamientos de *Phytophthora* obtenidos de huertos de aguacate de tres departamentos de Colombia.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislamientos de *Phytophthora* de tres departamentos de Colombia.
- Evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos de *Phytophthora* bajo condiciones in vitro y de vivero.

3.Marco teórico y revisión de literatura

3.1 El cultivo de aguacate

El aguacate, palta o avocado es una de las frutas de mayor antigüedad del continente americano. Sus orígenes se centran en las partes altas México y Guatemala (Yabrudy, 2012; Williams, 1977).

La producción mundial de aguacate sobrepasa las 3.5 millones de toneladas, de las cuales se comercializa el 20% (Schaffer et al, 2013). Yabrudy (2012) en su estudio del aguacate en los montes de María (Caribe Colombiano) mencionó que el consumo de este fruto ha aumentado a nivel mundial, especialmente en países como Estados Unidos, Francia, Alemania, y España. Esto ha hecho que se incremente tanto el área cultivada como la producción en todos los países productores, principalmente en México, Chile, España, Sudáfrica, Australia, Perú, Israel y Estados Unidos”.

3.1.1 Centro de origen del aguacate

El centro de origen del aguacate es América. El subgénero *Persea* predomina desde la parte central de México, Guatemala y hasta Centroamérica (Andrade-Hoyos, 2012, p23). México por formar parte del centro de origen de la especie alberga una amplia diversidad genética y posee unas 20 diferentes especies emparentadas con el aguacate (*Persea americana*) (Sánchez-Pérez, 2007; Andrade-Hoyos, 2012). Estudios arqueológicos en México han indicado que el aguacate se utilizó y seleccionó en este país desde hace 10,000 años (Smith, 1966). El aguacate se distribuye naturalmente desde México hasta Perú, pasando por Centro América, Colombia, Venezuela y Ecuador (Bernal et al, 2014).

3.1.2 Razas y principales características

De acuerdo con la clasificación de Wilson Popenoe (1920), existen tres subespecies distintas de aguacate: la mexicana, la guatemalteca y la antillana (Tabla 3-1) (Yabrudy, 2012). En la clasificación de las variedades botánicas, la raza mexicana quedó como *Persea americana* var. *Drymifolia*, la raza Antillana como *Persea americana* var. *Americana* y la raza guatemalteca como *P. americana* var. *Guatemalensis* (Bergh y Ellstrand, 1986). 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; Bergh, 1992)

Tabla 3-1: Principales características por tipo de variedad de aguacate.

Raza	Altura	Temperatura	Altitud	Peso	Contenido graso	Contenido de Azúcar	Variedad
Antillana	Menor a 1.000 msnm	Entre 18°C y 26°C	Entre 75 mm y 250 mm	Entre 250 gr y 2.500 gr	Entre 5% y 15%	5%	Lorena, Peterson, Wilson Simmonds, Booth 8, Catalina, Criollo
Guatemalteca	Entre 1.000 y 2.000 msnm	Entre 4°C y 19°C	Entre 75 mm y 250 mm	Entre 120 gr y 1.500 gr	Entre 5% y 15%	5%	Choquete, Hass, Simpson, Guatemala, Linda, Reed, Itzama, Fujikawa, Hall
Mexicana	De más de 1.700 msnm	Hasta 2,2°C	Entre 30 mm y 80 mm	Entre 80 gr y 250 gr	Hasta el 30%	2%	Azteca, Fuerte, Nabal, Ettinger, Bacon, Duke, Wurtz

Fuente: Tomado de Yabrudy, 2012.

La variedad *P. drymifolia* (raza mexicana) presenta alto contenido de aceite y aroma anís en las hojas de casi, además posee resistencia al frío. El presunto hábitat nativo de los aguacates mexicanos es a 1,400 a 2,500 msnm. La variedad *P. guatemalensis* (raza guatemalteca) presenta frutos con cáscara más gruesa que la de los otros grupos, lo que le confiere resistencia al transporte; por otra parte, su hábitat nativo presenta condiciones menos extremas. La variedad *P. americana* (raza antillana) se adapta muy fácil al clima tropical y al utilizarlo como patrón tolera ciertos niveles de salinidad. El aguacate antillano se presenta en tierras cálidas y húmedas de Centroamérica (Bergh y Ellstrand, 1986; Kopp, 1966; Papadakis, 1966; Wolstenholme y Whiley, 1999).

“Las tres razas tienen un genoma similar ($2n=24$), la hibridación entre ellas ocurre con facilidad y sus híbridos obtienen ventajas de adaptación climática, así como características

agronómicas mejoradas” (Bergh, 1992, p62). En su revisión de literatura Yabrudy (2012) menciona que:

“El aguacate es una planta donde la polinización cruzada se presenta con facilidad, tanto natural como artificial, generando de manera casi espontanea una cuarta raza o subespecie: la híbrida. Es así como desde principios del siglo pasado se iniciaron los primeros procesos de mejoramiento del aguacate, realizando cruzamientos entre distintas razas. Con la creación de los híbridos se consigue una mejor adaptación del aguacate a ciertas zonas geográficas, a la vez que se obtienen frutos de tamaños comerciales y en algunos casos se modifica la época de cosecha, adelantándola o retrasándola, siendo las circunstancias. Resultado del cruzamiento entre la razas mexicanas y guatemaltecas, se crearon las variedades: fuerte, Ettinger y Collin v-33; del híbrido entre la guatemalteca y la antillana surgieron las variedades, Booth 8, Choquette, Collison, Hall, Santana entre otras” (p36).

3.1.3 Aspectos técnicos del cultivo

El aguacate pertenece a la familia de las *lauráceas*. En condiciones normales el árbol se alcanza los 10 metros de altura con un diámetro de 25 metros en su copa. En su hábitat natural, el aguacate presenta raíces laterales, hojas simples, enteras, lisas, coriáceas y de color verde oscuro. Las flores son hermafroditas, simétricas y verde amarillas. El fruto es una baya que tiene forma ovalada, globular o elíptica, aunque puede cambiar de acuerdo a la especie; este no madura en el árbol y cuando ha alcanzado una madurez fisiológica toma coloraciones verdes, púrpura o negro. Su pulpa normalmente es de color claro, marfil, amarillo o verde claro. Su peso puede oscilar entre los 100 y 3.000 gramos. La forma, color, estructura y consistencia del fruto, son características especiales de cada variedad. (Bernal & Díaz, 2014; Martínez et al. 2011).

Los factores climáticos son un factor crucial para el desarrollo de los cultivos de aguacate y su adaptación varía de acuerdo a la genética de las razas, más los requerimientos son similares a los del cultivo de café, por lo que se puede establecer siembras conjuntas de estos dos productos (Bernal & Díaz, 2005, p15).

3.2 El cultivo del aguacate en Colombia

En Colombia el cultivo de aguacate presentó una participación de producción (Ton.) del 5,7%, en el área rural dispersa censada, con respecto a los demás frutales. El DANE (2014) reporta que los departamentos con mayor participación en la producción de aguacate (fruta fresca) fueron: Valle del Cauca, Tolima, Antioquia, Nariño, Caldas y Cesar con el 69,0 % de la producción en el área rural dispersa censada (p22). Se calcula que en el país unas 25 mil personas dependen de la industria del aguacate, donde Bolívar, Santander y César cuentan con la mayor área cultivada. Los departamentos de Valle del Cauca, Tolima, Quindío, Antioquia, Risaralda, Caldas, Bolívar, Cesar y Santander representan el 86% del total de área sembrada del país (SIOC-MADR, 2016)

De acuerdo a los datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en 2012 existían 35.594 hectáreas (ha) sembradas de aguacate en el país, las cuales se encontraban distribuidas en 21 departamentos (DANE, 2012). En el 2014 la recopilación de información del tercer Censo Nacional de la Encuesta Nacional Agropecuaria, determinó que Colombia en ese año contaba con 54.788 hectáreas plantadas de aguacate, de las cuales 32.777 se encontraban en plena producción (DANE, 2015). Ya para el año 2015 el área plantada (ha) del cultivo de aguacate reportada por la ENA, fue de 58.784 hectáreas y el área en plena edad productiva (ha) fue de 37.917 hectáreas (DANE-ENA, 2016).

Entre 2012 y 2015 el área sembrada se ha incrementado en poco más del 50% y la producción alcanza un 25% en su dinámica de crecimiento. Situación explicada “por la creciente expectativa en torno al sector, el aumento del consumo, el ingreso a nuevos mercados de exportación, promoción de nuevas siembras y mejoramiento de los procesos productivos en la cadena” (SIOC-MADR, 2016, p2).

Por otra parte, Bernal et al. (2014) afirman que “aproximadamente el 49 % de las variedades de aguacate que se cultivan en Colombia corresponde a aguacates criollos, el 26 % a la variedad Hass y el 2 5% restante a aguacates tipo papelillo y a otros como Lorena, Santana, Choquette, Booth 8, Semil 40, Edranol y Trinidad” (p32). En el caso del Aguacate Hass, “Colombia cuenta con condiciones edafoclimáticas favorables para la producción; pero además de las necesidades generales, se requiere mejorar la tecnología aplicada a los cultivos establecidos y la siembra de nuevas áreas bajo criterios de calidad y que tengan certificado de Buenas Prácticas Agrícolas” (SIOC_MADR, 2016, p2).

De acuerdo con datos del ministerio de agricultura, el mercado norteamericano demanda el 50% del total de las exportaciones mundiales de aguacate y tiene una tasa de crecimiento en el consumo del 16%. Por lo cual el gobierno y actores de la industria aguacatera definieron que en el periodo final del 2016 estarían listos los requisitos de admisibilidad fitosanitaria con Estados Unidos, para empezar a exportar aguacate Hass en el primer semestre de 2017 (AGRONET, 2017).

3.3 Patosistema *Persea americana* – *Phytophthora cinnamomi*

Diversos autores han desarrollado estudios de las patogénesis de los microorganismos, evidenciando que los actores y el escenario en el cual se llevan a cabo las interacciones no son muy diversos, esto puede deberse a que el grado de conservación es considerable en este grupo de organismos eucariotes. El primer paso en cualquier interacción directa planta-microorganismo es el reconocimiento, en el cual el hospedero es reconocido por parte del patógeno mediante características químicas, eléctricas y físicas del tejido huésped (raíces de las plantas) a través de estructuras móviles. Los hongos y Oomicetos como individuos que son, incluso a nivel de especie, poseen características que los hacen únicos y pueden tener actores protagónicos específicos en el complejo proceso de la patogénesis (Rodríguez-López et al, 2009; Tyler, 2002; Sánchez-Pérez, 2007)

Phytophthora cinnamomi es un Oomycetes, un grupo diverso de organismos heterotróficos que morfológicamente y fisiológicamente se asemejan a los hongos, pero son filogenéticamente distante de ellos (Tyler, 2002). El mecanismo de operación de *P. cinnamomi* durante las etapas del proceso infectivo en el cultivo del aguacate puede llegar a ser complejo, “por lo que resulta indispensable conocer la biología y la genética del patógeno, así como la interacción en el patosistema microorganismo–hospedante”; además, Rodríguez-López et al. (2009) recomiendan que “se pueden implementar métodos de análisis global para determinar los perfiles de expresión génica en el patógeno o su interacción con el hospedero utilizando condiciones contrastantes de patogénesis (p34).

3.3.1 La enfermedad pudrición radical

La pudrición radical del aguacate causada por *Phytophthora cinnamomi* (*Phytophthora Root Rot* – *PRR*) pudo haber sido introducida con plantas de aguacates, sin embargo, en los años 20 se reportó que la enfermedad probablemente no ocurrió en las regiones de México donde se originó la mayoría de las introducciones de plantas de aguacate. Lo más probable fue que la Pudrición Radical fue introducida en una de las muchas especies ornamentales que ingresaron a California durante el siglo pasado (Coffey, 1987). La pudrición de radical del aguacate está presente en todas las regiones de cultivos de aguacate en California y se convirtió en un problema en los años 20 (Zentmyer, 1980).

En Colombia, la pudrición radical o pudrición de raíces como también se le conoce, se destaca por ser la enfermedad de mayor importancia por su frecuencia y severidad en todas las zonas productoras de aguacate. En el país la enfermedad se presenta en cultivos de aguacate ubicados en los departamentos de Antioquia, Caldas, Cesar, Cundinamarca, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca (Tamayo, 2007).

3.3.2 El hospedero – *Persea americana*

El cultivo del aguacate en los últimos años experimenta una dinámica con tendencia ascendente en las exportaciones, ya que para el año 2016 “se registró una variación positiva del 228 % en volumen, alcanzando las 18.201 toneladas exportadas por un valor de USD 35,04 millones en comparación con las 5.543 toneladas en 2015, un valor de USD 10,2 millones, registrando una variación en precio del 241 %” (Corpoica, 2017). Sin embargo el cultivo se enfrenta a una serie de limitaciones en el tema de manejo de enfermedades, por lo cual se debe mantener un monitoreo permanente sobre las enfermedades que se ven favorecidas por condiciones climáticas excesivas, en las cuales los cultivos se ven expuestos al ataque de patógenos. Uno de los problemas fitosanitarios más importantes que tienen que enfrentar los productores de aguacate, es la pudrición de raíces o tristeza del aguacate ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* (Corpoica, 2017; Vidales-Fernández, 2002).

3.3.3 El patógeno – *Phytophthora cinnamomi*

Phytophthora cinnamomi y otros miembros del género *Phytophthora* tienen un parecido superficial con los hongos, pero no hacen parte del mismo reino y se diferencian en que sus paredes celulares se componen de celulosas en lugar de quitinas; estos pertenecen a los Oomycota (clase Oomycetes) que se colocan en el Reino Chromista (o Stramenopila). Es un patógeno del suelo que ataca el sistema radicular de un amplio rango de especies de plantas. Crece como filamentos de tamaño microscópico (micelio) en la superficie de las raíces e invade las células de las plantas susceptibles. En las plantas hospedantes causa lesiones que parecen áreas podridas. Esto debilita o mata a las plantas al reducir o detener el movimiento de agua y nutrientes dentro de la planta (Calm, 2003).

En 1922 Rands publica el primer reporte de la especie, el cual fue aislado de chancros en árboles de canela (*Cinnamomum burmannii* Blume) (Newell, 1994). En Puerto Rico se aisló e identificó por primera vez de raíces de aguacate en el año 1927 y en California en 1942 (Zentmyer & Thorn, 1967). En la actualidad, la pudrición radical de *Phytophthora cinnamomi* es la enfermedad más grave del aguacate en el mundo (Neilsen, 2016). En Colombia, *P. cinnamomi* ha sido la única especie de este Oomycete que se ha identificado claramente como la causante de la pudrición radical en las zonas productoras de aguacate (Tamayo, 2007).

3.3.4 Importancia de *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi es la especie más dispersa en muchos países del mundo y con un alto número de hospederos. Produce la enfermedad más grave en los cultivos de aguacate en países como Australia, Nueva Zelanda, Israel, España, África, Estados Unidos, México y países de América y el Caribe. En América Latina, el patógeno fue introducido probablemente de alguna región de Asia Suroriental. Los trabajos de George Zentmyer confirmaron ampliamente la patogenicidad de *P. cinnamomi* y establecieron que el agua es el factor más importante en la formación, dispersión y germinación de las zoosporas (Newell, 1994; Zentmyer, 1992; Zentmyer, 1961).

P. cinnamomi tiene amplios impactos que son económicamente importantes en la silvicultura, la horticultura y en la industria de viveros. Este patógeno posee una serie de

estrategias para la supervivencia, la propagación y la diseminación. Asimismo, el cambio climático tiene una influencia significativa en la intensidad y distribución de la enfermedad (Kamoun et al, 2015; Thompson et al, 2014).

En 1974 *P. cinnamomi* causó la pérdida de más del 50% de los árboles de aguacate en Queensland (EE.UU.) y en California alrededor del 60-75% de la superficie cultivada está infectada, causando pérdidas económicas significativas. En México el patógeno está presente en todas las principales áreas productoras de aguacate, con incidencias que varían entre 5-90%. Los primeros reportes de la enfermedad en el estado de Michoacán (México) fueron en 1979 con 13 mil árboles dañados en suelos pobres en materia orgánica. En regiones de Sudáfrica donde se han establecido nuevos huertos de aguacate, el 20% de los árboles se han visto afectados. Así como ha ocurrido en otros países productores de aguacate, en Colombia los cultivos se ven afectados por *P. cinnamomi*, que es la principal especie registrada como la causante de la enfermedad Pudrición Radical y la cual reporta pérdidas del 50% de los árboles en la etapa de establecimiento en campo (Pegg & Giblin, 2008; Gabor & Coffey, 1991; Lara-Chávez et al, 2007; Ramírez et al, 2014; Pérez-Jiménez, 2008; Corpoica, 2009; Teliz, 2000; Tamayo, 2007).

3.3.5 Clasificación Taxonómica de *Phytophthora cinnamomi*

La taxonomía establecida de Peronosporomycetes (Oomycetes) ha cambiado, especialmente después de la incorporación de técnicas moleculares modernas para estudios filogenéticos. Estos estudios están dando lugar a importantes consecuencias evolutivas y taxonómicas de los Oomycetes. Las características estructurales y bioquímicas diferencian los Oomycetes de los hongos verdaderos y actualmente se agrupan en un conjunto llamado Stramenopiles, además se sugiere que el género *Phytophthora* sea transferido de Pythiaceae a Peronosporaceae, ya que hay evidencia de monofilia de un clade que comprende *Phytophthora* y los biótrofos obligados Peronosporales (Pérez-Jiménez, 2008).

Reino: Chromista (Stramenopila)
Filo: Oomycota
Clase: Peronosporea (Oomycetes)

Orden: Peronosporales
Familia: Peronosporaceae
Género: *Phytophthora*
Especie: *P. cinnamomi*

Clasificación filogenética basada en las claves para las especies de *Phytophthora* De Bary del grupo VI de Waterhouse (1963) y en las claves para fácil identificación establecidas por Ribeiro (1978).

3.3.6 Características morfológicas de *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi posee estructuras especializadas que le permite tener un comportamiento constante en la rizosfera del suelo. Estas le confieren la capacidad de dispersión en el ambiente y resistencia a condiciones adversas. El patógeno está presente en el suelo y sobrevive en forma de clamidosporas o como micelio latente en restos vegetales infectados. Cuando las condiciones son favorables se presenta la fase asexual, en la cual germinan esporangios que dan origen a zoosporas biflageladas. En la rizosfera de la planta se forman los esporangios que aumentan rápidamente el inóculo en el suelo en un período de tiempo corto. Los dos caracteres de diagnóstico de los estados asexuales son la abundancia de hifas coraloides y los agrupamientos en forma de racimos de clamidosporas; mientras que el retrocruzamiento de los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) produce micelio que se caracteriza por tener abundantes hinchamientos hifales o vesículas hinchadas (Calle, 2017; Andrade-Hoyos, 2012; Torres, 2007).

Características de las principales estructuras:

- **Micelio**

El micelio es hialino, filamentoso, cenocítico y algunas veces pseudoseptado, ya que cuando transcurre el tiempo se pueden apreciar carentes de protoplasma y a veces aparecen septas. Las hifas con hinchazones son una característica diferencial, estas adquieren un aspecto coraloide y ramificado. (Georgi, 1993; Zentmyer, 1980).

- **Clamidosporas**

Las clamidosporas son las estructuras reproductivas asexuales que se pueden diferenciar de los hinchamientos hifales por presentar estructuras esféricas con paredes delgadas o gruesas. Son globosas y pueden ser terminales o intercales en el micelio, y frecuentemente se forman en ramificaciones. Germinan típicamente a través de varios tubos germinativos (Andrade-Hoyos, 2012; Torres, 2007; Zentmyer, 1980).

- **Esporangios**

Los esporangios no son papilados y no son caducos con formas comúnmente elipsoides a ovoides. Los esporangios ovoides miden cerca de 60 x 34 μm y los elípticos miden cerca de 85 x 35 μm . Son redondeados en la base y se producen por proliferación intercalar (Andrade-Hoyos, 2012, 27; Torres, 2007).

- **Zoosporas**

De un esporangio pueden liberarse un número indefinido de zoosporas, dependiendo de la especie. Las zoosporas son reniformes y biflageladas, frágiles y de vida corta. Se mueven en medio acuáticos a través de sus flagelos y su movimiento se orienta hacia las raíces como sitios favorables para la infección, por los exudados de las plantas o por quimiotaxis (Georgi, 1993; Zentmyer, 1980; Ribeiro, 1978; Newell, 1994).

- **Órganos sexuales**

P. cinnamomi es heterotática y su estado sexual se forma cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se aparean. Los oogonios miden en promedio cerca de 40 μm de diámetro, con anteridios anfígenos (18 μm de ancho a 20 μm de largo), algunos anteridios pueden ser bicelulares y muchas de las oosporas son pleróticas, redondas, hialinas o amarillo oscuro de 35 μm , estas se pueden formar cuando la raza A1 y la A2 son compatibles y se unen (Galindo & Zentmyer, 1964; Andrade-Hoyos, 2012, 26).

3.3.7 Estructuras de supervivencia de *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi posee estructuras que le permiten permanecer latentes en el suelo y que favorecen el desarrollo de la enfermedad. El patógeno hiberna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. Una vez las

condiciones son favorables, las oosporas y las clamidosporas germinan, mientras que el micelio prosigue su desarrollo y/o produce esporangios que liberan zoosporas. Las clamidosporas son estructuras latentes que aseguran la sobrevivencia de este Oomycete y en el caso de *P. cinnamomi* juegan un papel muy importante junto a las oosporas. Las zoosporas son la clave de la diseminación y el establecimiento de la enfermedad, dado que son los principales propágulos infectivos del patógeno (Acosta, 2008; Andrade-Hoyos, 2012; Torres, 2007).

3.3.8 Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi*

Las zoosporas, clamidosporas y oosporas son estructuras que *P. cinnamomi* produce para el desarrollo y la supervivencia de la enfermedad. Con las clamidosporas *P. cinnamomi* sobrevive en el suelo hasta por seis años, aún en ausencia de plantas hospedantes pueden resistir y permanecer viables. El patógeno ingresa al ciclo de esporulación asexual en presencia de humedad excesiva, por efectos de riegos pesados, abundante lluvia, inundación o por mal drenaje, y cuando la temperatura del suelo se eleva de 24 a 28 °C. En estas condiciones las clamidosporas germinan produciendo micelio, posteriormente se forman a partir de hifas somáticas los esporangios que en su interior contienen entre 20 y 30 zoosporas biflageladas uninucleadas; estas se liberan en medio acuoso circundante y se desplazan sobre la superficie del agua a través de sus flagelos. Las zoosporas de *P. cinnamomi* son atraídas a las raíces de aguacate por los exudados de éstas. Cuando las zoosporas encuentran una raíz y hace contacto con ella, pierden sus flagelos y se enquistan, penetrando mediante un tubo germinativo el tejido intracelular de las raíces. La presencia de alta humedad en el suelo aumenta la formación de esporangios y facilita la liberación y libre movimiento de las zoosporas hacia las raíces. Una vez germinadas las zoosporas se desarrolla micelio alrededor del tejido de la raíz, causando infección y pudrición de gran cantidad de raíces. Con el avance de la infección las plantas desarrollan los síntomas de la enfermedad. Al morir el árbol, *P. cinnamomi* forma nuevamente estructuras de resistencia, que en condiciones favorables germinan y reinician el ciclo de la enfermedad (Marais et al, 2002; Téliz y Mora, 2007; Torres, 2007; Neilsen, 2016; Sánchez-Pérez, 2007; Zentmyer, 1961; Zentmyer, 1980; Vidales-Fernández, 2002; Pérez-Jiménez, 2008) (Fig. 3-1).

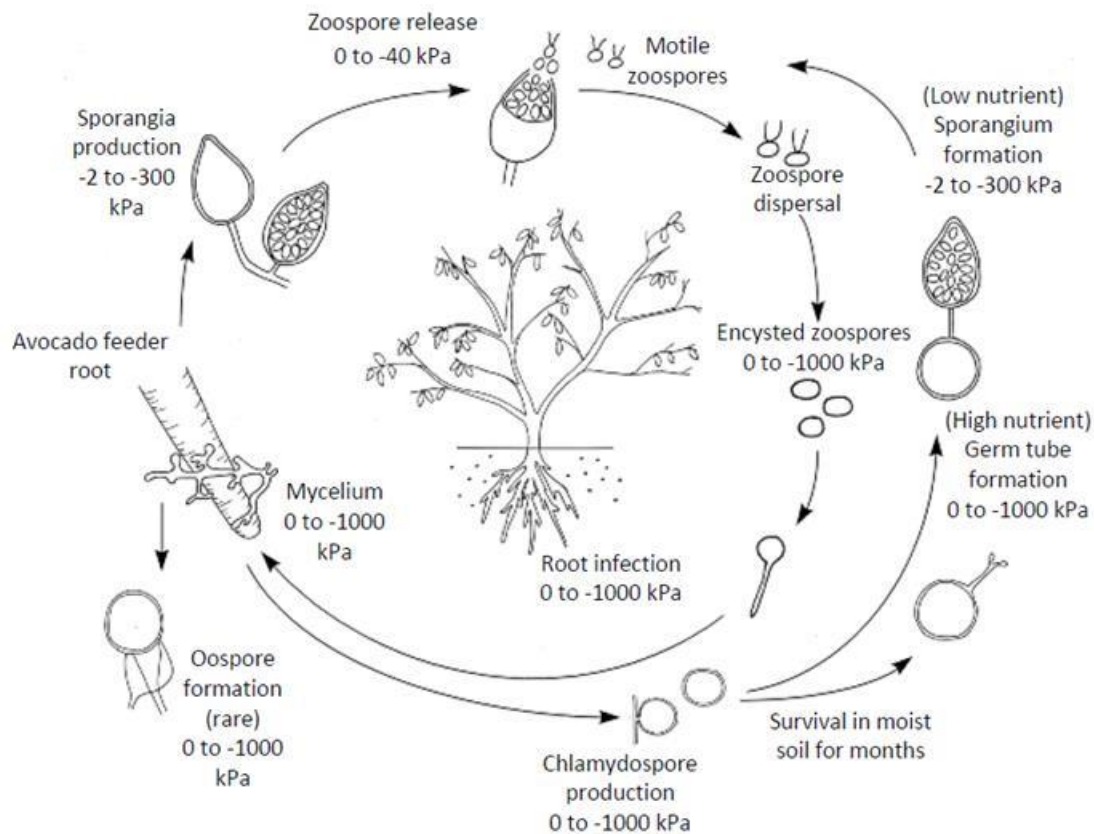


Figura 3-1: Ciclo de la enfermedad de *Phytophthora cinnamomi*. Fuente: Dann et al. (2013)

La etapa sexual de *P. cinnamomi* puede activarse mediante cruces inter e intra específicos en un medio de cultivo cuando se cruza un aislamiento de *P. cinnamomi* con el tipo de apareamiento opuesto (un aislado de la misma u otra especie diferente de *Phytophthora*). *P. cinnamomi* es una especie hermafrodita considerada como heterotálica, con dos tipos de apareamiento designados como A1 y A2. La forma común con distribución mundial es el tipo A2, mientras que el tipo A1 está limitado geográficamente con menos hospedantes (Pérez-Jiménez, 2008).

3.3.9 Factores ambientales relacionados al patosistema

El desarrollo de la pudrición radical en plantas de aguacate depende de condiciones ambientales, que pueden influir en el progreso y la distribución de *P. cinnamomi*. Esta

enfermedad puede producirse bajo un amplio rango de temperaturas del suelo que van desde 21°C hasta 30°C, produciéndose muy poca o ninguna infección a temperaturas superiores a 33°C e inferiores a 10°C. Sus estructuras de resistencia tienen un rango estrecho de temperaturas en el cual pueden formarse y su actividad patogénica se ve afectada en ciertas estaciones del año. El cultivo del aguacate se desarrolla muy bien a temperatura aproximadas a 30°C, sin embargo la producción y crecimiento de esporangios se inhiben a esa temperatura. En condiciones in vitro la temperatura óptima para el crecimiento de *P. cinnamomi* es alrededor de 24 a 27°C, y crece bien con un pH entre 4.5 y 5.5 (Pérez-Jiménez, 2008; Echemendia, 2007; Zentmyer, 1980).

P. cinnamomi está presente en suelos con un drenaje deficiente, su desarrollo y el exceso de humedad son los dos factores que potencian el rápido avance de la enfermedad. Los factores edáficos pueden ser conducentes o adversos a la pudrición radical, según sea el balance de sus efectos sobre el componente patogénico y el componente agronómico. El efecto de la textura de los suelos sobre *P. cinnamomi* es un factor que afecta la liberación de zoosporas y no solamente la humedad está directamente relacionada. La textura afecta la cantidad y el movimiento del agua en el suelo y la facilidad de abastecimiento de nutrientes y aire (Echemendia, 2007; Romero, 2014).

El contenido de agua, la permeabilidad del suelo y las altas temperaturas limitan el crecimiento de *P. cinnamomi* tanto o más que otros factores edáficos. La alta humedad del suelo acentúa la infección debido al incremento de la formación de esporangios y a las condiciones apropiadas para la liberación de zoosporas. Lo contrario sucede cuando hay en el suelo un nivel de humedad correspondiente al doble de capacidad de campo; en esta condición de suelo inundado se produce una escasa esporulación de esporangios por baja concentración de oxígeno (Romero, 2014).

3.3.10 Sintomatología

Generalmente, el principal síntoma causado por *P. cinnamomi* son las raíces podridas; donde se presentan lesiones necróticas, el patógeno avanza penetrando la epidermis y la corteza, matando los tejidos del sistema radicular. Los síntomas secundarios, son una consecuencia de la absorción reducida de agua y nutrientes. Las

plantas se vuelven cloróticas, con hojas más pequeñas de lo normal y finalmente se marchitan (Zentmyer, 1980).

La pudrición de raíces del aguacate se presenta desde la etapa de vivero en los almácigos. Los árboles afectados en la etapa de almácigo, pueden llegar a morir prematuramente antes que se produzca el prendimiento del injerto, debido a la necrosis del cuello del patrón. En otras ocasiones, los árboles exhiben escaso crecimiento, reducido desarrollo foliar y amarillamiento generalizado de hojas. A medida que la infección progresa, se presenta la necrosis de la parte basal del tallo del patrón. Los árboles se marchitan, pierden las hojas y se inicia una muerte ascendente del patrón y descendente de la copa. Al examinar las raíces secundarias, éstas presentan necrosis parcial. En condiciones de campo, la enfermedad se presenta en focos, en las zonas más húmedas. Los árboles afectados detienen su crecimiento, las hojas son de tamaño reducido, pierden su color verde normal y son de apariencia pálida, cuando hay frutos, éstos son numerosos y de tamaño pequeño. Después, las ramas laterales muestran un secamiento descendente y las hojas se secan. Luego se presenta el secamiento generalizado de las hojas, que permanecen adheridas al árbol por algún tiempo, con posterior caída gradual de las mismas hasta que finalmente, el árbol sufre un paloteo generalizado y se seca (Tamayo, 2007, p56).

3.4 Identificación, detección y diagnóstico de *Phytophthora cinnamomi*

Muchas enfermedades causadas por *Phytophthora* spp., anteriormente no habían sido identificadas con rigurosidad o su detección había sido atribuida incorrectamente a patógenos secundarios. Por lo tanto, se han desarrollado una variedad de técnicas moleculares para la detección e identificación precisa de las especies de *Phytophthora*; estas técnicas van desde la tecnología con procedimientos complejos a simples que requieren menos habilidad técnica o equipos sofisticados. La identificación y detección rápida proporciona una herramienta importante en la detección de patógenos y la determinación del agente causal de muchas enfermedades (Drenth et al, 2006; Martin et al, 2012).

Las pruebas de diagnóstico convencionales se basan en aislar *Phytophthora* a partir de tejido vegetal con síntomas (raíces) y de suelo, utilizando medios de cultivo combinados con antibióticos (Drenth y Sendall 2001; Ribeiro 1978; Erwin y Ribeiro 1996). La inducción

de formación de estructuras para revelar caracteres de valor taxonómico y el examen microscópico de la morfología de las esporas requieren habilidades y tiempos considerables, lo que dificulta el desarrollo de ensayos con grandes cantidades de muestras (Drenth et al, 2006). La identificación de *P. cinnamomi* normalmente se ha basado en criterios morfológicos y culturales que requieren un amplio conocimiento sobre Oomycetes. Por consiguiente, es esencial la mejora de los procedimientos de diagnósticos rápidos y precisos para controlar la introducción del patógeno en un área (Pérez-Jiménez, 2008).

Además de los enfoques morfológicos, se han utilizado otros métodos para simplificar y mejorar la precisión de los diagnósticos e identificación de aislados a un nivel de especie, incluido el uso de patrones de proteínas, isoenzimas, serología, análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN nuclear y mitocondrial y, más recientemente, análisis del polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP) región espaciadora transcrita (ITS) del ADN ribosomal (rDNA) (Martin & Tooley, 2004).

3.4.1 Identificación en campo

Para la identificación en campo de la enfermedad producida por *P. cinnamomi*, se debe inicialmente discriminar y delimitar las áreas que muestran los síntomas visibles de la pudrición radical y localizarlas por focos. Las encuestas de campo son necesarias para detallar los antecedentes y manejos. La confirmación de la presencia del patógeno a menudo se realiza mediante análisis de laboratorio de muestras de suelo y tejido de raíces tomadas de plantas afectadas (Calm, 2003).

3.4.2 Identificación in vitro

Muchas especies del género *Phytophthora* se pueden identificar fácilmente. Sin embargo, las diferencias morfológicas entre algunas de ellas son pocas y variables, lo que dificulta la clasificación precisa de la especie. La identificación de *Phytophthora* se basa en las claves taxonómicas de Waterhouse (1963), Stamps et al. (1990) y Ribeiro (1978). Los caracteres que se usan para clasificar especies de *Phytophthora* incluyen la morfología del esporangio, morfología de estructuras sexuales tales como anteridio, oogonio y oosporas, presencia o ausencia de clamidosporas, morfología de hifas y tipo de colonias. Para

identificar morfológicamente *P. cinnamomi* con claves taxonómicas se requiere tener cultivos puros en medios selectivos. La información de las características morfológicas se considera como un primer paso en la identificación de las especies de *Phytophthora* (Drenth & Sendall, 2001; Tsai et al, 2006).

3.4.3 Inducción de esporangios

La inducción de esporangios es la etapa de producción de un gran número de esporas móviles (zoosporas) que se movilizan en el suelo y son las responsables de la mayor parte de la infección en la raíz. *P. cinnamomi* no produce esporangios en cultivo puro ni en medios sólidos; estudios previos han demostrado que se debe usar soluciones de extractos de tierra no estéril para desarrollar esporangios. Otros estudios informan que se pueden obtener esporangios en condiciones estériles, lavando el micelio varias veces con agua destilada estéril o soluciones de sales minerales (Zentmyer & Chen, 1969).

3.4.4 Cultivo en placa y trampeo

Los Oomycetes no son verdaderos hongos, y por lo tanto se requiere de técnicas especiales para su aislamiento. La mayoría de las especies de *Phytophthora* crecen lentamente in vitro en comparación con los hongos saprófitos y las bacterias (Drenth & Sendall, 2001).

El aislamiento de especies de *Phytophthora* a partir de tejido vegetal es relativamente simple y exitoso si el tejido está infectado recientemente. Cuando se toma tejido vegetal necrótico para realizar el aislamiento se pueden presentar otros microorganismos secundarios y es poco probable que se desarrolle micelio de *Phytophthora*. Para aislamientos de diferentes especies de *Phytophthora*, normalmente se usa medios selectivos suplementados con antibióticos y fungicidas para suprimir el crecimiento de otros hongos y mantener bajas las poblaciones de bacterias, ya que estas inhiben el crecimiento de *Phytophthora* por competencia directa o por antagonismo causado por la producción de antibióticos. El uso de medios selectivos por lo general supera estos problemas (Drenth & Sendall, 2001).

El aislamiento directamente del suelo puede resultar dispendioso, pero el uso de técnicas de cebo o trampa aumenta la posibilidad de obtener aislamientos de muestras de suelos infestados. Se ha reportado una amplia gama de métodos en los cuales se utilizan muchas partes de plantas para cebar selectivamente especies de *Phytophthora*. Estos incluyen frutas, semillas, vainas de semillas, plántulas, cotiledones, discos o tiras de hojas y pétalos (Drenth & Sendall, 2001; Martin & Coffey, 2012).

3.4.5 Técnicas de biología molecular

Las técnicas de biología molecular actualmente son muy utilizadas para la detección de fitopatógenos debido a su alto nivel sensibilidad, especificidad para una identificación precisa y rapidez de los procesos de algunas ellas. Las técnicas basadas en las diferencias de las secuencias de ácidos nucleídos entre las especies, favorecen la detección de *P. cinnamomi* y otras especies de *Phytophthora* (Pérez-Jiménez, 2008).

- **Identificación basada en secuencias**

El método molecular más preciso para la identificación de aislados a nivel de especie se logra mediante el análisis de secuencia de loci específicos. Históricamente, se ha utilizado la región ITS, y dado que hay un gran conjunto de datos para este locus que incluye todas las especies descritas, sigue siendo un pilar para este fin. Sin embargo, este no es el locus óptimo para todas las especies, particularmente aquellas que están estrechamente relacionadas filogenéticamente (Martin et al, 2012).

La región del genoma de *Phytophthora* que codifica el ADN ribosomal ha sido la más secuenciada para las filogenias, ya que la región del ADNr es altamente conservada, mientras que la región del espaciador interno transcrito ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNAr (ITS1-ITS2) es variable y se emplea preferentemente en estudios que se dirigen a encontrar similitud o diferencias entre especies (Martin et al, 2000).

Otros desarrollos significativos se han referido a la facilidad con que se puede obtener la información de la secuencia de ADN. Junto con el desarrollo de algoritmos y software bioinformáticos diseñados específicamente para analizar y manipular grandes cantidades de datos de secuencia de ADN. La cantidad cada vez mayor de datos de secuencias de ADN

disponibles y una comprensión cada vez mayor de las relaciones evolutivas entre las diferentes especies de *Phytophthora*, combinadas con la tecnología de amplificación de ADN disponible, permitieron el desarrollo de una gama de ensayos de diagnóstico molecular (Drenth et al, 2006).

▪ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido un gran avance en el campo de la taxonomía y detección molecular de microorganismos. La PCR permite la amplificación rápida de pequeñas cantidades de ADN. Se pueden lograr altos niveles de especificidad mediante el diseño de cebadores de oligonucleótidos, y se puede obtener una alta sensibilidad mediante la elección de las condiciones de reacción. Los cebadores se han diseñado a partir de fragmentos genómicos aleatorios que se han secuenciado parcialmente o a partir de secuencias de genes utilizados en estudios filogenéticos. Se han reportado para *Phytophthora spp.* diversos protocolos de PCR que usan cebadores derivados de la región del espaciador interno transcrito (ITS), puesto que la secuencia de ADN de esta región puede ser fácilmente detectada gracias al alto número de copias en el genoma (Martin et al, 2000; Drenth et al, 2006).

▪ **Técnicas moleculares para el análisis de población**

Se han empleado numerosas técnicas para estudiar la biología y diversidad poblacional de especies de *Phytophthora*. La mayoría de los estudios de diagnósticos y variabilidad intraespecífica de *P. cinnamomi* incluyen marcadores moleculares basados en el ADN como los RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), RAPD (ADN polimórficos amplificados al azar), AFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), microsatélites, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y análisis de haplotipos mitocondriales. El análisis de RFLP es de gran utilidad para la identificación de especies y subpoblaciones de varias especies. Los RAPD generan marcadores dominantes que pueden proporcionar una gran cantidad de bandas polimórficas sin tener conocimiento de las secuencias de ADN genómico. El análisis de AFLP es otra técnica que puede generar gran cantidad de marcadores dominantes para el análisis de poblaciones y es relativamente más sencilla y transferible en los laboratorios que los RAPD. Estas técnicas una vez estén estandarizadas resultan prometedoras por su especificidad y sensibilidad, sin embargo, algunas de ellas pueden tener limitaciones en la reproducibilidad

de los resultados entre diferentes laboratorios e incluso entre diferentes termocicladores (Martin et al, 2012; Calle, 2017).

- **Técnicas moleculares basadas en gel para identificación de especies**

Existen varias técnicas basadas en gel que se pueden usar para identificar aislamientos a nivel de especie utilizando amplicones generados por PCR. Estudios sobre la diferenciación de *Pythium* y *Phytophthora*, han utilizado los cebadores ITS1-4 universales para separar un número limitado de especies de oomicetos de ascomicetos basándose en el tamaño del amplicón de PCR. Para separar aún más las especies de *Pythium* de las especies de *Phytophthora* que tenían el mismo tamaño de amplicón, utilizaron como cebadores de PCR el oligonucleótido que era específico del género *Phytophthora* en ensayos de hibridación, en combinación con el cebador universal ITS1 (Martin et al, 2012; Martin et al, 2000).

- **Enzimas de restricción**

Los productos de amplificación por PCR del ADN extraído de cultivos puros también se han diferenciado por digestiones de restricción y electroforesis en gel. Tres enzimas de restricción pueden diferenciar 27 especies diferentes de *Phytophthora* después de la digestión del amplicón generado por los cebadores que amplifican la región ITS de las especies de *Phytophthora* (Martin et al, 2000). La región ITS-1 se amplifica, desnaturaliza y separa en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Los patrones electroforéticos de la región amplificada por un par de cebadores, A2 (adelante) e I2 (reverso), y digeridos adicionalmente por enzimas de restricción (*MspI*, *RsaI*, *TaqI*) generan perfiles de bandas de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción específicos de especie que son útiles para diferenciar *P. cinnamomi* de otras especies de *Phytophthora* (Martin et al, 2012; Drenth et al, 2006).

3.5 Tolerancia y resistencia de portainjertos de aguacate a *Phytophthora cinnamomi*

Los estudios de resistencia a *P. cinnamomi* fueron iniciados por Zentmyer (1952), quien realizó una búsqueda de patrones resistentes en 18 países. Con técnicas de inoculación de plantas crecidas en soluciones nutritivas y en macetas, y mediante la liberación de

microelectrolitos de raíces y hojas inoculadas, se ha evaluado la resistencia de materiales de aguacate a *P. cinnamomi* (Zentmyer, 1952; Botha et al, 1989; Salgado & Fucikovsky, 1996).

Existen árboles de aguacate que muestran poco o ningún desarrollo aparente de la pudrición radicular en suelos infestados con *P. cinnamomi*. El potencial de estos árboles impulsó la evaluación y comparación de varias técnicas in vitro, y la investigación de la modificación de estos procedimientos, así como nuevos métodos para detectar la tolerancia y resistencia de las raíces de aguacate a *P. cinnamomi* (Botha et al, 1989).

Los programas de mejoramiento y selección de materiales resistentes a la pudrición radical han tenido éxito hasta cierto punto, y se han desarrollado y lanzado varias variedades de portainjertos comercializadas con éxito. Sin embargo, después de someterse las líneas seleccionadas a muchos años de pruebas intensivas en invernaderos y en campo, ningún portainjerto disponible comercialmente tiene resistencia completa a la enfermedad (Neilsen, 2016).

Zentmyer & Schieber (1987) establecen que un control efectivo de *P. cinnamomi* puede ser el uso de patrones resistentes y que la búsqueda a largo plazo de materiales resistentes es determinante para el desarrollo del cultivo del aguacate. No obstante, Andrade-Hoyos (2012) aclara que para utilizar portainjertos resistentes, éstos deben ser propagados clonalmente a fin de que todos tengan la misma identidad genética.

Las exploraciones realizadas en América Latina del género *Persea* han demostrado que la raza mexicana tiene mayor resistencia a la pudrición radical (Salgado & Fucikovsky, 1996). Zentmyer (1980) logró obtener un material aparentemente resistente a *P. cinnamomi* de un material colectado en México. Zentmyer & Schieber (1987) demostraron que la variedad Duke, en especial Duke 7, procedente de *P. americana* var. *drymifolia* (raza mexicana) posee una alta resistencia al patógeno. Por otro lado, el híbrido G755, proveniente de *P. americana* var. *guatemalensis* y *P. schiedeana*, y los materiales G6 y G22 de raza mexicana, tienen un grado similar de resistencia por su aspecto vigoroso, mientras que Duke 5 y Duke grace son más susceptibles a *P. cinnamomi*.

Es importante señalar que estos portainjertos tolerantes en condiciones de infección grave y con densidad de inóculo elevada, resultarían afectados por el patógeno. Por lo tanto, la búsqueda de razas y variedades con mayor resistencia y, además, adaptada a condiciones climáticas específicas, continúa en diferentes países (Pérez-Jiménez, 2008).

Se han investigado diferentes mecanismos de resistencia a la pudrición radical del aguacate utilizando técnicas de detección para determinar su posible aplicación en programas de mejoramiento de patrones de aguacate. Estos aspectos de resistencia incluyen los siguientes: (I) capacidad regenerativa de la raíz, (II) atracción de las zoosporas en términos de tasas de enquistamiento o la concentración y composición de exudados producidos por las raíces, (III) deposición de barreras estructurales como callos y tilosas, (IV) la inducción de diversas vías de defensa bioquímica dentro de las raíces del aguacate en respuesta a la infección por *P. cinnamomi* (Neilsen, 2016).

3.6 Métodos para evaluar tolerancia en diferentes materiales de aguacate

Al ser *P. cinnamomi* un patógeno policíclico, su inóculo se incrementa cada vez más a partir del inóculo inicial, por lo cual las infecciones son sucesivas y se logra una esporulación rápida en tejidos (Romero, 2014). Los métodos para evaluar y seleccionar patrones resistentes a *Phytophthora* han sido establecidos bajo distintas técnicas, teniendo en cuenta la patogenicidad de los aislamientos.

P. cinnamomi tiene una capacidad considerable para producir un rango de fenotipos patógenos. Como no se ha encontrado evidencia de reproducción sexual (recombinación genómica) en el campo, se supone que la variación en los caracteres de la patogénesis debe surgir asexualmente (Pérez-Jiménez, 2008). Rands (1922) estudió las variaciones en la patogénesis, la fisiología y la producción de inóculo, y diferenció "cepas virulentas" de *P. cinnamomi*. Después de esto, otros autores usaron términos como "cepas fisiológicas", "razas fisiológicas" o "biotipos del patógeno", para referirse a la existencia de diferencias significativas entre aislamientos para inducir síntomas en diferentes hospederos (Pérez-Jiménez, 2008).

Hay factores que hacen que las especies del género *Phytophthora* sean patogénicas en las plantas. Estos factores involucran la capacidad de producir diferentes tipos de estructuras especializadas, como esporangios y zoosporas para la supervivencia y diseminación a corto plazo, y clamidosporas y oosporas para una mayor supervivencia a largo plazo. La esporulación en el tejido de la planta es rápida después de la infección, lo que da como resultado una acumulación rápida de inóculo en condiciones ambientales favorables. Finalmente, a través de un estímulo químico (quimiotaxis positiva) las zoosporas de *Phytophthora* tiene la capacidad de atraer y moverse hasta las puntas de las raíces activas, infectando el tejido joven y susceptible (Drenth & Sendall, 2001).

Los métodos convencionales para la selección de materiales resistentes a *P. cinnamomi* se han basado en la inmersión de raíces en soluciones nutritivas inoculadas, en plantas sembradas en suelo infestado y en el desarrollo de métodos rápidos e indirectos, como la inoculación de callos o tallos de las plantas (Botha et al., 1989; Pérez-Jiménez, 2008; Corpoica, 2009).

Con la técnica de inoculación de raíces en solución nutritiva se logra evaluar más de 20.000 plántulas de una forma segura (Zentmyer y Mircetich, 1965). Inoculaciones indirectas en plantas de aguacate es método que permite evaluar la susceptibilidad de materiales producidos por clonación, mediante mediciones del tamaño de la lesión, la severidad y el porcentaje de reaislamiento; esta técnica se recomienda para la evaluación de resistencia a *P. cinnamomi*, ya que de manera rápida y sencilla se puede seleccionar gran cantidad de materiales (Dolan & Coffey, 1986; Salgado & Fucikovsky, 1996).

A través de inoculación con zoosporas se ha probado la resistencia de las raíces y la colonización en hojas de distintos materiales, midiendo la conductividad eléctrica, el enquistamiento de las zoosporas y la colonización lineal. Ésta técnica conlleva tiempo antes de producir la solución de zoosporas, ya que la inducción de esporangios es una técnica laboriosa que requiere ciertas condiciones. No obstante, se ha demostrado que las inoculaciones con micelio de *P. cinnamomi* son igual de infectivas que las efectuadas con concentraciones de zoosporas (Botha et al, 1989; Van der Merwe, 1990).

Otros estudios se han llevado a cabo para comparar diferentes métodos de inoculación in vitro con callos procedentes de peciolo de plantas de aguacate, con el fin de seleccionar portainjertos resistentes a la pudrición radicular. La inoculación de callos con solución de zoosporas de *P. cinnamomi*, permite evaluar el desarrollo hifal y la pérdida de microelectrolitos. Esta técnica de evaluación de resistencia podría dar como resultado portainjertos resistentes a través de la variación somática (Salgado & Fucikovsky, 1996).

4. Materiales y métodos

4.1 Localización

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Fitopatología y en casa de malla de Corpoica, Centro de Investigación Palmira ubicado en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, localizado entre los 03°30'43,6" de latitud norte y 76°18'53,5" de latitud oeste, a una altura de 1.001 m.s.n.m. y con características climáticas generales de humedad relativa promedio anual de 76% y temperatura promedio de 23.5°C (IDEAM, 2010).

4.2 Establecimiento de una colección de aislamientos de *P. cinnamomi*

Para la obtención de los aislamientos y formar la colección de *P. cinnamomi*, se analizaron 120 muestras de suelo y raíces provenientes de árboles de aguacate sanos y con síntomas de la enfermedad pudrición radical. Las muestras fueron colectadas en los departamentos de Cauca, Valle del Cauca y Risaralda durante el año 2014 en el marco del proyecto "Diagnóstico epidemiológico de artropofauna y enfermedades en el cultivo de aguacate en el país - Levantamiento de línea base" financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Las fincas visitadas fueron seleccionadas por presentar síntomas de la enfermedad Pudrición Radical.

Por cada departamento recorrido se visitaron 10 fincas productoras de aguacate Hass, para un total de 30 fincas visitadas por los tres departamentos. De cada finca se tomaron 4 muestras de suelo y raíces. En el departamento del Cauca fueron visitadas fincas en los municipios de Morales, Popayán, Tambo, Piendamó, Timbio y Cajibío. En el departamento del Valle del Cauca fincas ubicadas en los municipios de Sevilla, Caicedonia, Cerrito,

Dagua y Restrepo. En el departamento de Risaralda fincas ubicadas en tres municipios (Belén de Umbría, Pereira y Santa Rosa de Cabal).

Los aislamientos fueron obtenidos mediante la siembra de segmentos de tejido interno de las raíces en cajas de Petri con medio PDA suplementado con antibióticos y fungicidas (Agar Papa Dextrosa-PDA 39 g, Ampicillina 5000 µg/L, Benlate 400 µg/L, Rifampicina 200 µg/L, Penicillina 8000 µg/L, PCNB 4000 µg/L, Hymexazol 5000 µg/L, Vancomicina 5000 µg/L, Polimixina 5000 µg/L, Merteck 300 µl) (Rodríguez et al, 2013). Cada segmento de las raíces se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%. Posteriormente, los aislamientos se sometieron a un proceso de selección mediante observación de las estructuras al microscopio y se escogieron 45 aislamientos con características iguales de micelio coraloide y colonias tipo rosáceas, típicas del género *Phytophthora* (Anexo A).

Los aislamientos fueron reactivados mediante la técnica de cultivo trampa propuesta por Erwin y Ribeiro (1996), utilizando manzanas verdes maduras (Fig. 4-1); posteriormente se sembraron en medio selectivo para *Phytophthora*, PDA+ suplementado con antibióticos y fungicidas (Rodríguez et al, 2013), y se incubaron en oscuridad durante siete días a una temperatura de $\pm 26^{\circ}\text{C}$, con el propósito de continuar con la caracterización morfológica e identificación molecular de la especie *P. cinnamomi*, cada aislamiento se sembró en Agar Agua para su purificación tomando únicamente las puntas de las hifas de crecimiento del Oomyceto (Fierro, 2011).

Los cultivos puros fueron conservados en tubos Eppendorf® con agua destilada estéril, para ello se depositaron diez discos de medio PDA, de 5 mm de diámetro, colonizados por micelio de *Phytophthora*. Los tubos se sellaron con parafilm y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente.

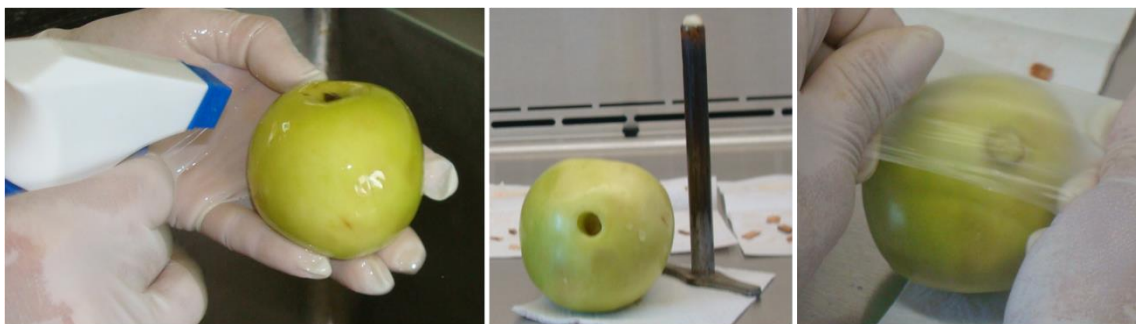


Figura 4-1: Técnica de cultivo trampa (Erwin y Ribeiro, 1996) con manzanas verdes maduras.

4.3 Caracterización morfológica

Para la identificación a nivel de género, se caracterizaron con base a la morfología macroscópica y microscópica los aislamientos obtenidos a partir de la técnica de punta de hifa o monomicelio en Agar Agua. Cada aislamiento fue transferido a medio de cultivo PDA e incubado durante siete días a $\pm 26^{\circ}\text{C}$ (Zentmyer, 1980). La identificación hay que tratar de n repetir tantode las estructuras vegetativas y reproductivas se efectuó conforme las claves morfológicas de Watherhouse (1963) y Erwin & Ribeiro (1996), observando al microscopio (10x-40x) la presencia de hifas coraloide, hinchamientos hifales, esporangios y abundantes clamidosporas (Drenth & Sendall, 2001).

4.3.1 Medición del crecimiento radial de la colonia

El crecimiento de las colonias se evaluó midiendo cada tres días con una regla graduada (en cm) y un pie de rey, a partir de la siembra en medio cultivo PDA, hasta que el crecimiento micelial de la colonia llenara la caja de Petri. Se tuvieron en cuenta las características de forma de la colonia, micelio y presencia de anillos radiales, descritas por Erwin y Ribeiro (1996). Los datos de crecimiento radial de la colonia (cm) en las cajas de petri evaluadas a los 3, 6, 9, 12 y 15 días se muestran en anexo B.

4.3.2 Producción de esporangios

La producción de esporangios se obtuvo mediante el método de inducción en medio de cultivo líquido con lavados de solución salina de Chen-Zentmyer (1970) (Drenth & Sendall, 2001). La metodología se modificó utilizando una solución compuesta por caldo de arvejas frescas, carbonato de calcio y agua destilada estéril (Georgi, 1993); esta solución de incubación se suplementó con la solución salina de Chen-Zentmyer (1970).

Para iniciar la inducción de esporangios se partió de colonias de 5-6 días de crecimiento en PDA. De las colonias se tomaron 10 discos de 5 mm de diámetro, los cuales se depositaron en cajas de Petri que contenían 5 ml de caldo de arveja y 5 ml de solución salina, y se incubaron por 48 horas a $\pm 26^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a lavar los discos de micelio con agua bidestilada estéril, realizando tres lavados sucesivos hasta que no quedaran residuos del caldo de arveja. Después de los lavados se agregó a las cajas de Petri 10 ml de solución salina Chen-Zentmyer (1970) y posteriormente se colocaron bajo lámparas de luz fluorescente blanca. Al paso de una hora se reemplazó la solución salina con solución fresca y se iniciaron tres lavados con 10 ml de solución salina a intervalos de una hora para inducir la formación de esporangios. Nuevamente las cajas de Petri se incubaron en esta solución a temperatura ambiente bajo luz fluorescente blanca por 24-36 horas. Al término de la incubación bajo luz continua se procedió a buscar en el microscopio los esporangios, que generalmente comienzan a formarse 8 horas después del primer lavado y la esporulación máxima se alcanza a las 24 y 36 horas (Zentmyer & Chen, 1969).

La identificación de esporangios se realizó con las claves de Drenth & Sendall (2001) y Erwin & Ribeiro (1996). Los esporangios de cada aislamiento se observaron al microscopio y se tomaron mediciones del largo y ancho con cámara Nikon Digital® de 7.1 Mega Pixels acoplada al microscopio óptico Nikon® de contraste de fase. Para determinar las condiciones de liberación de zoosporas y observar si se liberaban normalmente, se lavaron con agua destilada estéril las cajas de Petri que contenían los esporangios formados. La solución de esporangios se sometió a un choque térmico, el cual consistió en un enfriamiento a 5°C durante 30-60 minutos y una incubación a $\pm 26^{\circ}\text{C}$ por una hora (Zentmyer & Chen, 1969). Este estrés de temperaturas facilita la liberación de las zoosporas.

4.4 Caracterización molecular

Los aislados se identificaron empleando la técnica de ITS 1 y 4, que ha sido ampliamente usada para dilucidar relaciones filogenéticas, diferenciando entre especies (Drenth et al, 2006).

4.4.1 Extracción de ADN

Para la identificación a especie, los aislamientos de *Phytophthora* se transfirieron a medio Agar Avena (40 g de avena, 30 g de agar-agar y 1 L de agua destilada) y se incubaron durante 8 días a $\pm 26^{\circ}\text{C}$, posteriormente se cosechó el micelio para la extracción de ADN total siguiendo el protocolo de Doyle & Doyle (1990). Se maceraron 100 mg de micelio en un mortero con 500 μl de buffer de extracción (Tris 100 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 1%), el producto se depositó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se incubó a 65°C por una hora agitando periódicamente. Después se agregaron 500 μl de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) y se mezcló por inversión durante 5 minutos; a continuación la suspensión se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos y se rescató el sobrenadante en un tubo nuevo. Posteriormente, se adicionaron 500 μl de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), el tubo se mezcló por inversión durante 5 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. La fase superior se recuperó en un tubo nuevo y se adicionaron 50 μl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 800 μl de etanol absoluto frio, dejando en reposo a -20°C por dos horas. Al cabo del tiempo se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet formado, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μl de Agua/RNasa (10mg/ml). Finalmente se incubó a 37°C por una hora y se almacenó a -20°C . El ADN total obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó por medio del espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

4.4.2 Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR de las regiones ITS 1 y 4 del ADN extraído de *P. cinnamomi*, se utilizaron los cebadores PA2-CICA-P (F) y PI2-CICA-P (R) (Tabla 4-1), que han sido ampliamente utilizados para diferenciar entre especies de *Phytophthora* (Drenth et al,

2006). La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 30 µl con la siguiente formulación: 12,96 de agua desionizada, 3 µl de solución amortiguadora de buffer Taq 10X, 3 µl de MgCl² 25mM, 4.8 µl de dNTPs 5mM, 1.8 µl de cada primers 10µM, 0.24 µl de Taq ADN polimerasa a 1U y 2.5 µl de muestra de ADN (40-60 ng). Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Agilet Technologies (Mod. SureCycler 8800), con el siguiente programa: paso 1, desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; paso 2, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, paso 3, hibridación a 62°C por 45 segundos; paso 4, extensión a 72°C por 2 minutos; paso 5, 35 ciclos desde el paso 2; paso 6, extensión final a 72°C por 10 minutos; paso 7, ciclo final de 5 minutos a 20°C.

Tabla 4-1: Secuencia de cebadores de oligonucleótidos específicos del género *Phytophthora*.

Cebador	Secuencia de Oligonucleótidos (5'-3')
A2 (Forward)	ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA
I2 (Reverse)	GATATCAGGTCCAATTGAGATGC

Se tomaron 4 µl de los productos de PCR para verificar la calidad por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100 voltios durante 60 minutos, con un marcador de peso de 100 pb (Thermo Fisher Scientific) que permitió seleccionar muestras con un tamaño entre 750 y 850 pb, rango que está reportado para *Phytophthora*. Se utilizó como control negativo la mezcla del coctel sin el ADN y un aislamiento que ya había sido identificado sirvió como control positivo. Las bandas se visualizaron en un Fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS, Labnet).

4.4.3 Digestiones del fragmento amplificado

Los productos amplificados de la región ITS 1 y 4 por PCR usando el cebador directo A2 en combinación con el cebador inverso I2, fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción RsaI, MspI, TaqI (tabla 4-2), mediante la técnica PCR –RFLP, descrito por Drenth et al. (2006) y Silva et al. (2009).

Para todas las enzimas la digestión se realizó en un volumen total de 10 μ L que comprendió 2.5 μ L del producto de PCR amplificado, 6.3 μ L de agua MilliQ, 0.1 μ L enzima de restricción (MspI, RsaI, TaqI), 1 μ L Buffer RE 10X y 0.1 μ L BSA. Las muestras se centrifugaron durante 5 segundos antes de la incubación a 37°C durante 1 h y 30 minutos, seguido de 20 minutos a 65°C para MspI y RsaI, la enzima TaqI se incubó durante 1 h a 37°C con un ciclo posterior de 65°C durante 20 minutos.

El perfil de bandas se observó en un gel de poliacrilamida teñido con *GelRed* 1:1, a 160 voltios durante 70 minutos para las enzimas MspI y RsaI, y 60 minutos para la enzima TaqI. Se visualizaron en luz ultravioleta para confirmar el tamaño de las bandas de acuerdo con lo reportado por Drenth et al. (2006).

Tabla 4-2: Tamaños de las bandas (pb) esperadas de la digestión del producto de la amplificación con las enzimas de restricción MspI, RsaI y TaqI.

ENZIMA	TAMAÑOS DE BANDA ESPERADOS
MspI	339, 221, 146, 122
RsaI	377, 170, 165, 106, 10
TaqI	194, 181, 150, 90, 74, 60, 59, 12, 7

4.4.4 Secuenciación de la región ITS

Los productos de PCR –ITS, se enviaron a la compañía MacroGen (Corea del Sur), para su secuenciación directa mediante el sistema Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en un secuenciador ABI Prism 3730XL (PE Applied Biosystems), de acuerdo con lo descrito por Silva et al. (2009).

Las secuencias generadas con cada iniciador, se editaron mediante el software Mega 6 (Acceso libre) y se analizaron mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor), posteriormente se compararon las secuencias en las bases de datos moleculares (GenBank del NCBI; Phytophthora DataBase) mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Para la elaboración del dendograma se realizó el alineamiento de las secuencias con el algoritmo Clustal W de EBI.

4.5 Selección de aislamientos patogénicos de *Phytophthora cinnamomi*

Para clasificar los aislamientos más patogénicos, se utilizó la metodología de inoculación con discos de micelio en herida del tallo en plantas de aguacate descrita por Corpoica. (2009). Los aislamientos de *P. cinnamomi* crecidos en PDA se inocularon bajo condiciones de invernadero, en plantas de variedad Hass injertadas sobre patrón antillano procedentes de vivero comercial y Corpoica C.I. Palmira. A cada planta se le realizó una herida en el tallo, aproximadamente a 5 cm por encima del punto de injertación. La inoculación se llevó a cabo colocando sobre la herida un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *P. cinnamomi*, posteriormente se cubrió con cinta Parafilm el disco en la herida con el fin de mantener la humedad (Fig. 4-2). A las plantas testigo se les realizó la misma herida colocando un disco de Agar-Agua. Las plantas se distribuyeron aleatoriamente sobre estibas de madera dentro de una casa de malla negra acondicionada con cubierta de plástico para evitar lluvias, malla anti pulgón, poli sombra del 60% luz y un sistema de nebulización para mantener la humedad relativa en 90% y temperaturas entre 25 – 32°C.



Figura 4-2: Inoculación con micelio en herida al tallo (Corpoica, 2009).

4.6 Prueba de inoculación artificial en hojas

Con el objetivo de evaluar la infección de la zoosporas obtenidas mediante la metodología de inducción de esporangios (Drenth & Sendall, 2001), se desarrolló un ensayo de inoculación en discos de hojas de aguacate. Se empleó el método del disco foliar (Barreto et al, 2015; Argolo-Magalhaes et al, 2016) con una suspensión de zoosporas de los tres

aislamientos más patogénicos, determinados en el ensayo de inoculación de micelio en herida del tallo (Corpoica, 2009).

Se retiraron diez hojas jóvenes de aguacate variedad Lorena, las cuales fueron lavadas con agua de grifo para remover contaminantes. De las hojas se cortaron con un sacabocado discos de 15 mm de diámetro, posteriormente se desinfectaron con una solución de Timsen® (0.5g/1L agua) durante un minuto, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Los discos de las hojas se ubicaron en cajas de Petri con el envés hacia arriba y el haz sobre papel toalla humedecido con agua destilada estéril. Cada caja contenía 6 discos que fueron inoculados en la parte central con 20 μL de una suspensión de zoosporas a una concentración de $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ zoosporas móviles (Fig. 4-3). Al tratamiento testigo se le adicionó 20 μL de agua destilada estéril. La concentración de las suspensiones de zoosporas de cada aislamiento se calculó con la cámara Neubauer. Las cajas se cerraron para mantener una alta humedad relativa y se incubaron en oscuridad a $\pm 26^\circ\text{C}$. El desarrollo de la lesión se registró después de 5 días de incubación, teniendo en cuenta la escala de 5 puntos propuesta por Nyassé et al. (1995). Posteriormente, cada disco se sembró en medio selectivo PDA+ para comprobar que la infección se ocasionó por *P. cinnamomi*.

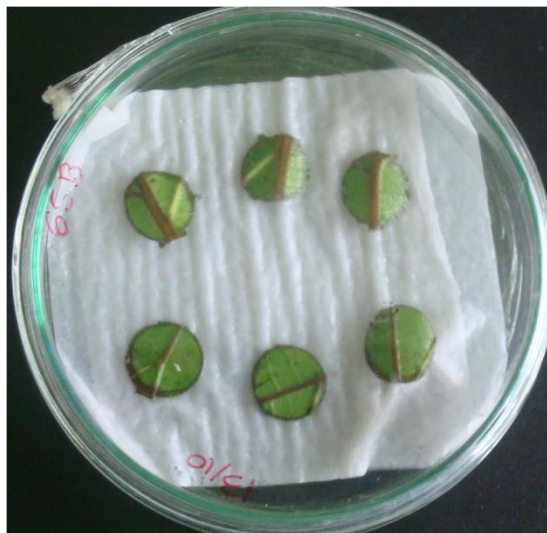


Figura 4-3: Discos inoculados con suspensión de zoosporas (Barreto et al, 2015; Argolo-Magalhaes et al, 2016)

4.7 Análisis de datos

Los datos para la selección de aislamientos patogénicos se analizaron con un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones y una planta como unidad experimental (UE). Cada tratamiento correspondía a un aislamiento. Se evaluó al avance de la lesión, midiendo el largo y ancho de las lesiones en todas las plantas inoculadas. Los valores obtenidos se multiplicaron entre sí para hallar el área de la lesión (cm²) y el ABCPE. Las evaluaciones se iniciaron a partir del día 5 después de la inoculación, tomando las mediciones cada tres días durante un total de 15 días. Los resultados obtenidos se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se analizaron por medio del programa SAS versión 9.0 (Analytical Software), con un análisis de varianza (ANOVA). Las medias se compararon con una prueba de rango múltiple Duncan ($p < 0.05$) para determinar el comportamiento de los tratamientos. El tratamiento correspondiente al testigo no fue incluido en los análisis.

5.Resultados y discusión

5.1 Establecimiento de una colección de aislamientos de *P. cinnamomi*

De las 120 muestras procesadas se obtuvieron 51 aislamientos posiblemente pertenecientes al orden de los Oomycetes. De éstos, 45 se lograron reactivar y purificar (Fig.5-1). El 37.5% de los aislamientos analizados presentaron patrones de crecimiento rosáceo y estelado con anillos radiales, característico de *Phytophthora* spp., mientras que el 62.5% correspondió a otros microorganismo, que posiblemente están asociados a la enfermedad pudrición radical. Ocho aislamientos fueron obtenidos de seis municipios del departamento del Cauca, mientras que 16 y 21 aislamientos procedían de 4 y 3 municipios de los departamentos del Valle del Cauca y Risaralda, respectivamente (ver anexo A).



Figura 5-1: Aislamiento reactivado y purificado en medio PDA.

5.2 Caracterización morfológica

Las estructuras vegetativas observadas al microscopio permitieron confirmar que de los 45 aislamientos reactivos, 34 presentaron colonias tipo rosáceo y similitud en las características microscópicas evaluadas; de estos se observó micelio cenocítico y coraloide (Fig. 5-2 A), con hinchazones hifales (Fig. 5-2 B) y abundantes clamidosporas globosas en racimos, terminales e intercalares (Fig. 5-2 C). Erwin & Ribeiro (1996) al igual que Zentmyer et al. (1980) reportan que *P. cinnamomi* produce clamidosporas esféricas ubicadas de manera terminal o intercalar y las definen como estructuras de supervivencia que pueden persistir en el suelo por largos periodos. Los demás aislamientos presentaron micelio liso sin forma coraloide, que es una característica diferencial de *Phytophthora* spp.

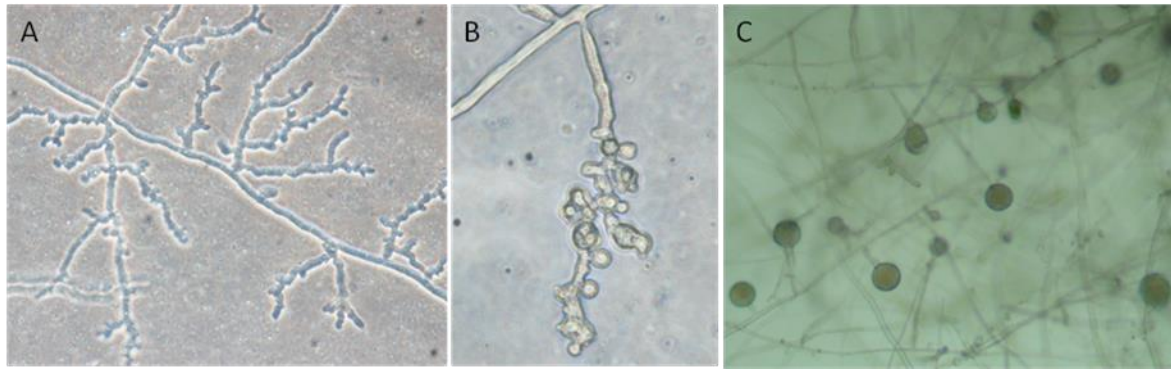


Figura 5-2: A. Micelio cenocítico y coraloide. B. Hinchazones hifales. C. Clamidosporas.40x

5.2.1 Crecimiento radial de la colonia

Se caracterizaron morfológicamente 45 aislamientos puros mediante el patrón cultural (tipo o forma de colonia). Esta característica permite iniciar con la identificación de los aislamientos y por lo tanto ir descartando los que no pertenezcan al género *Phytophthora*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las características culturales pueden resultar complejas en la identificación de *Phytophthora*, ya que pueden ser variables y dependen de la extensión de las hifas y de los anillos radiales que se formen. Erwin & Ribeiro (1996) destacan ciertos tipos de colonias típicas en los Oomycetes pertenecientes al género *Phytophthora*, entre ellas se encuentran la forma de crisantemo para *P. citricola*, forma estrellada para *P. palmivora* y forma rosáceo para *P. cinnamomi*.

Los patrones culturales obtenidos en medio PDA no presentaron gran variabilidad morfológica ni se observaron cambios en el color de las colonias, en general se desarrolló un crecimiento uniforme en los aislamientos (Anexo B). El patrón cultural tipo roseta o rosáceo, que se ilustran en la figura (5-3 A), se observó en 34 aislamientos de *Phytophthora* spp, mientras que 11 aislamientos presentaron colonias con forma de estrella (Fig. 5-3 B). La tasa de crecimiento promedio de los aislamientos fue de 0,33 (cm/día). El tiempo promedio de desarrollo de las colonias tipo rosáceo en medio PDA fue de 11.5 días al llenado total de caja de petri y el promedio de crecimiento fue de 2.4 cm por día; mientras que para las colonias en forma de estrella fue de 6,7 días y 2,8 cm/día, para el llenado de la caja y el promedio de crecimiento, respectivamente. Al tener el promedio de crecimiento y desarrollo del patrón cultural se logra identificar de una manera más sencilla los aislamientos de *Phytophthora* spp., ya que otros Oomycetes como *Pythium* tienden a crecer rápidamente en medio de cultivo.

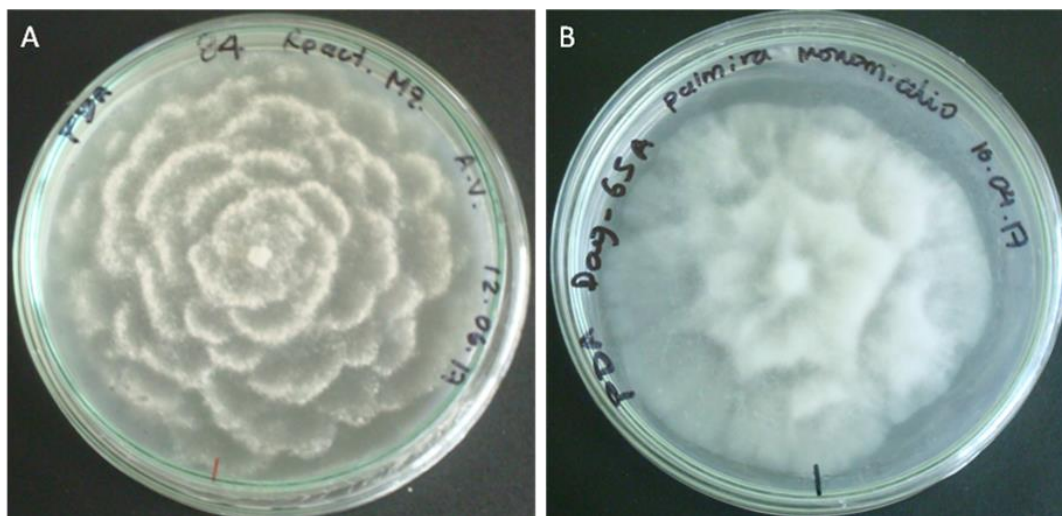


Figura 5-3: A. Aislamiento con colonia tipo rosáceo, a los 9 dds. Procedente del Valle del Cauca. B. Aislamiento con colonia tipo estrella, a los 7 dds. Procedente del Valle del Cauca

5.2.2 Producción de esporangios

En la producción de esporangios, la metodología con incubación en caldo de arveja y solución salina permitió el crecimiento amplio de micelio alrededor de los discos, por lo cual se observaron esporangios más fácilmente en los bordes. La presencia de esporangios en el caso de la especie *P. cinnamomi* sólo se puede observar en medio

líquido, normalmente suplementados con soluciones de extractos de suelo y soluciones salinas. Los lavados con solución salina favorece la formación de los esporangios, aun cuando son entre intervalos cortos (Zentmyer & Chen, 1969).

En este trabajo los esporangios se observaron a las 24 horas después de realizar el último lavado con exposición continua de luz ultravioleta blanca. Los 34 aislamientos definidos como *Phytophthora* spp. presentaron esporangios no papilados que se caracterizaron por tener forma ovoide, elongada y limoniforme (Fig. 5-4 A y B), características que concuerdan con las reportadas para *P. cinnamomi* por Erwin y Riberio (1996). El promedio del largo y ancho de 100 esporangios fue de 57.3 x 31.2 μm , el máximo fue de 81,2 x 41,0 μm y el mínimo de 42,9 x 22,8 μm (Fig. 5-5), muy parecidos a los valores reportados por Almaraz-Sánchez et al. (2016). Por su parte Erwin y Ribeiro (1996) reportaron valores de 75 x 40 μm , lo cual son medidas superiores a las obtenidas en este estudio. Los esporangios varían su tamaño y forma según las condiciones ambientales y el estado nutricional en el que se desarrollan (Ribeiro 1978). Para los 11 aislamientos que presentaron colonias con forma de estrella la metodología utilizada no favoreció el desarrollaron esporangios, posiblemente porque que estos aislamientos no concuerdan con las características morfológicas reportadas para *Phytophthora* spp.

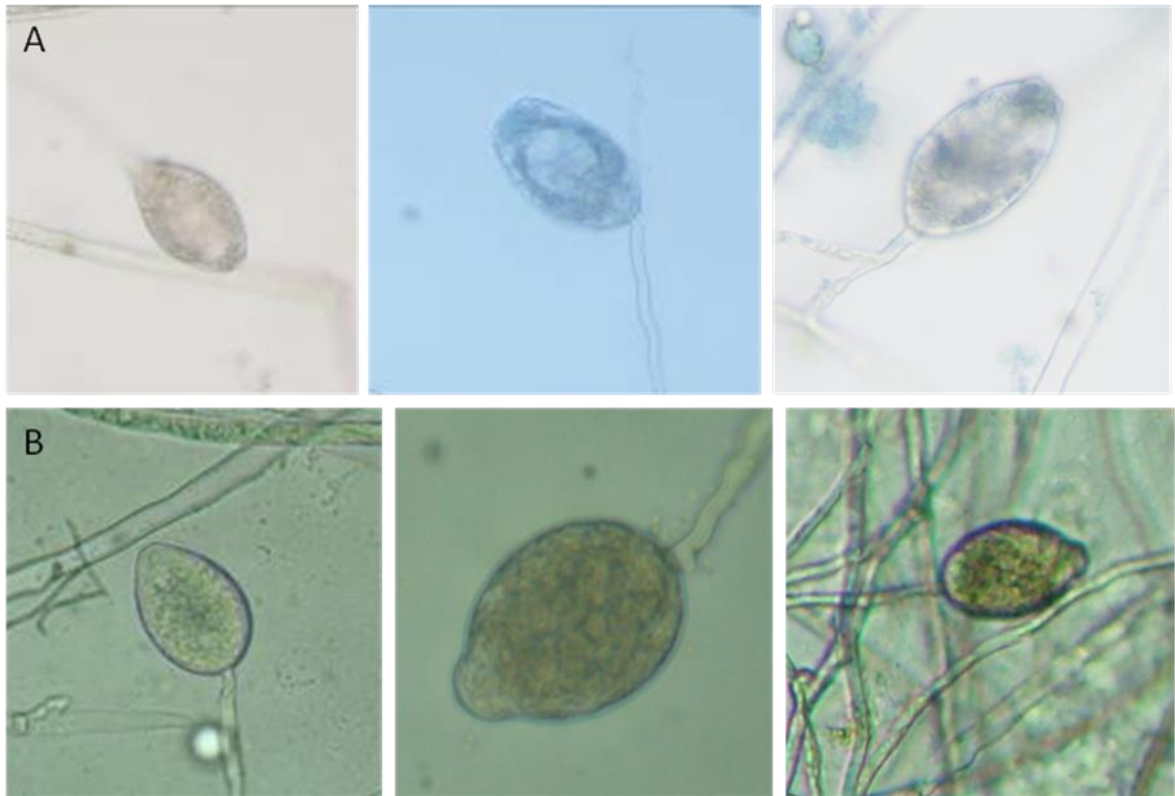


Figura 5-4: Formas de esporangios observadas en los aislamientos. A. Esporangios ovoide-elongado sin papila. B. Esporangios limoniformes sin papila. 40x.

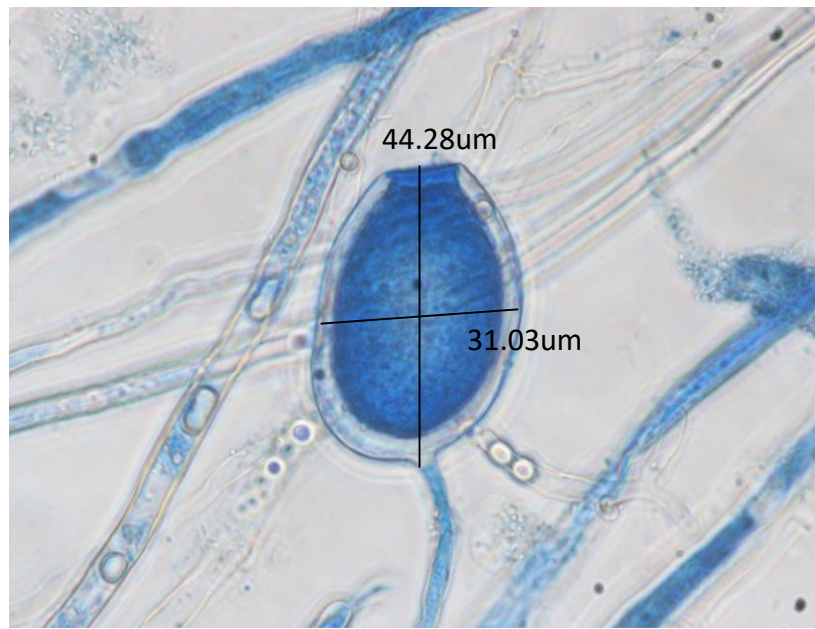


Figura 5-5: Medición de esporangio elongado no papilado. 100x.

5.3 Caracterización molecular

5.3.1 Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN empleado presentó una buena eficacia, ya que se logró obtener ADN total con buena calidad y con una concentración suficiente. Los niveles de pureza de las muestras se encontraron entre 1.5 – 1.9, que son los rangos normales de absorbancia (A260-A280). Este protocolo a diferencia de otros consume menos tiempo en cada uno de los pasos de la metodología.

5.3.2 Amplificación por PCR

Los cebadores A2 (forward) y I2 (reverse) amplificaron con eficacia la especie de *P. cinnamomi* en 34 aislamientos. Este par de cebadores no produjeron amplificación en 11 aislamientos, que posiblemente estén relacionadas con especies de *Pythium*. El uso de los cebadores ITS internos permite obtener información de secuencia completa de todas las especies *Phytophthora* y *Pythium*, sin embargo es más eficaz utilizar cebadores que sean específicos del género *Phytophthora*, en lugar de utilizar cebadores genéricos de secuenciación ITS que pueden amplificar una amplia gama de diferentes patógenos, entre ellos los Oomycetes (Drenth et al, 2006).

Los cebadores A2/I2 garantizaron que la amplificación fuera consistente con fragmentos del tamaño correcto, originando bandas visibles de aproximadamente 700 y 900 pb en un gel de agarosa con 60 ng de ADN total de *Phytophthora* (Fig. 5-6). Estos cebadores “género específicos” han sido probados en 1660 aislados de *Phytophthora* de diferentes especies y en todos los casos se ha reportado que amplifican una única banda de un tamaño entre 752 y 832 pares de bases (Drenth et al, 2006).

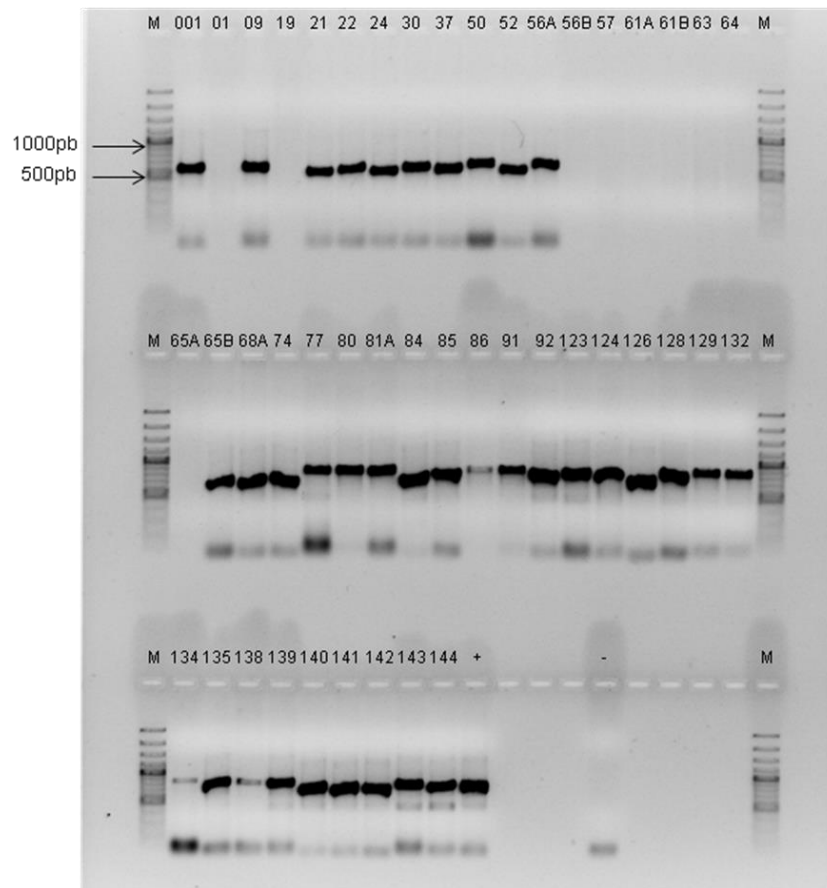


Figura 5-6: Gel de agarosa al 1.5 % a 100 voltios por 60 minutos, en cada carril se adicionó: 1.5 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb (M) y 2.5 μ l del producto amplificado más 2 μ l de azul de bromofenol+GelRed 13.3x (1 μ l de GelRed por cada 750 μ l de azul de bromofenol).

Los resultados de la PCR indican que *Phytophthora* está presente en seis aislamientos del departamento del Cauca (Tamb-09; Timb-21; Timb-22; Timb-24; Piend-30; Cajib-37), nueve aislamientos del departamento del Valle del Cauca (Ep-001; Caice-50; Caice-52; Caice-56a; Dag-65b; Dag-68a; Res-74; Res-77; Res-80) y 19 aislamientos del departamento de Risaralda (Bel – 81a; Bel – 84; Per -85; Per -86; Per - 91; Per – 92; Per-123; Per-124; Per-126; Per-128; SRC-129; SRC-132; SRC-135; SRC-139; SRC-140; SRC-141; SRC-142; SRC-143; SRC-144). Estos aislamientos se obtuvieron de muestras de raíces de árboles de aguacate.

Al comparar los aislamientos que presentaron fragmentos amplificados con las características de la morfología reportada por Erwin & Riberio (1996) y Drenth & Sendall

(2001), se define que 34 de ellos corresponden al género *Phytophthora*. Drenth et al. (2006) establecen que para lograr una detección reproducible a nivel de género, la sensibilidad de prueba está estrechamente relacionada con los cebadores utilizados, con las diluciones de ADN molde y con las condiciones de reacción optimizadas.

5.3.3 Digestiones del fragmento amplificado

La identificación de *P. cinnamomi* con las enzimas de restricción (MspI, RsaI, TaqI) usando la amplificación resultante de los cebadores “género específicos”, se logró visualizar a través del proceso de PCR-RFLP con una resolución clara en geles de poliacrilamida. Cuando se usan este tipo de geles delgados se obtienen resultados en un menor tiempo, ajustando las condiciones de corrida. La PCR-RFLP generó bandas claras y definidas en un tiempo de una hora para las tres enzimas de restricción, MspI, RsaI y TaqI.

Se produjeron sitios de restricción MspI por debajo de los reportados por Drenth et al. (2006), pero el patrón de restricción fue similar en ambos estudios (Fig. 5-7). Esto pudo originarse debido a que los aislados de *P. cinnamomi* producen diferentes perfiles de RFLP de MspI a partir de amplicones de PCR de tamaño ligeramente diferente. En el estudio desarrollado por Drenth et al. (2006), el aislado de *P. cinnamomi* utilizado tiene una amplificación PCR de un tamaño de 828 pb, mientras que los 34 aislados amplificados en este estudio estuvieron entre 700 y 800 pb. Cuando se suman los fragmentos de RFLP se obtiene un valor igual al tamaño del amplicón de PCR.

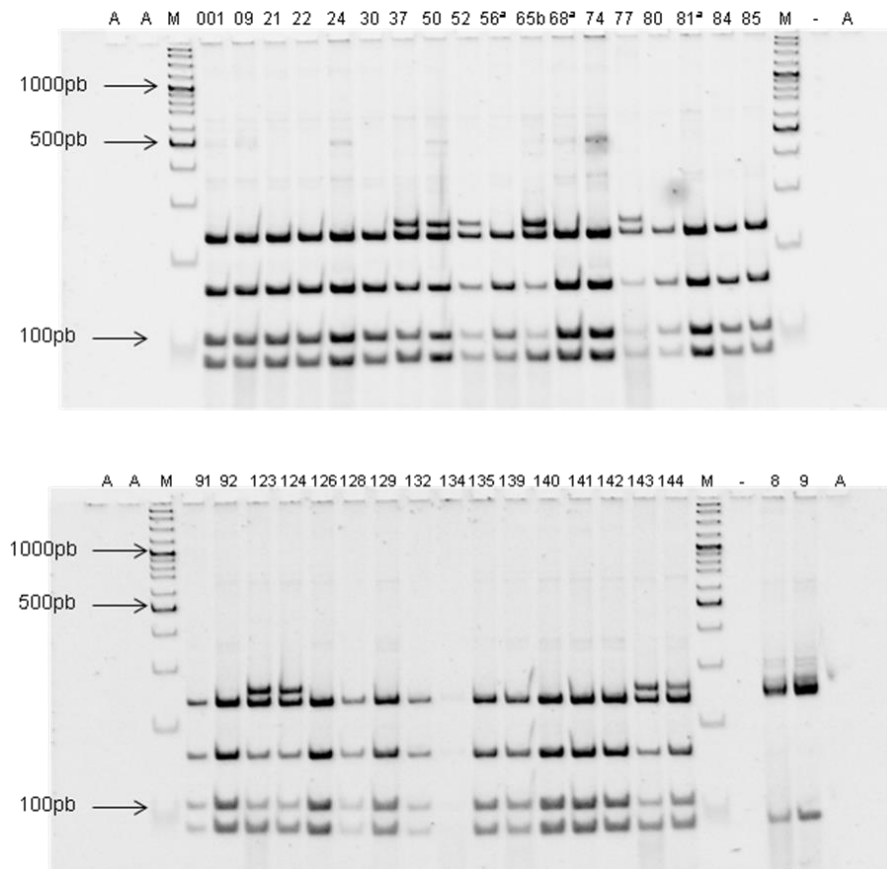


Figura 5-7: Digestión del producto amplificado A2/I2 con enzima *MspI*. Gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) teñido con *GelRed*, se corrió a 160 voltios por 70 minutos, en cada carril se adicionó: 2µl de marcador de peso molecular de 100 pb (M) y 4µl del producto digerido más 2 µl de azul de bromofenol.

Los patrones de fragmentos de restricción para la enzima *RsaI* presentaron 5 bandas que corresponden a las reportadas por Drenth et al. (2006), a excepción del aislamiento 91 que presentó bandas inespecíficas de otros tamaños (Fig. 5-8). Los tamaños de las bandas para la enzima *TaqI* estuvieron por debajo de 200 pb, lo que indica su similitud con el patrón de restricción de la accesión de *P. cinnamomi* evaluada por Drenth et al. (2006) (Fig 5-9). Con las tres enzimas se evaluaron 4 aislamientos (134, 138, 8, 9) que no presentaban similitud con las características morfológicas reportadas por Erwin & Riberio (1996) para *P. cinnamomi*. Estos aislamientos presentaron patrones de restricción diferentes a los patrones de los 34 aislamientos definidos como *P. cinnamomi*. Esta variación dentro de los Oomycetes y de las especies de *Phytophthora* se puede observar con las enzimas de restricción.

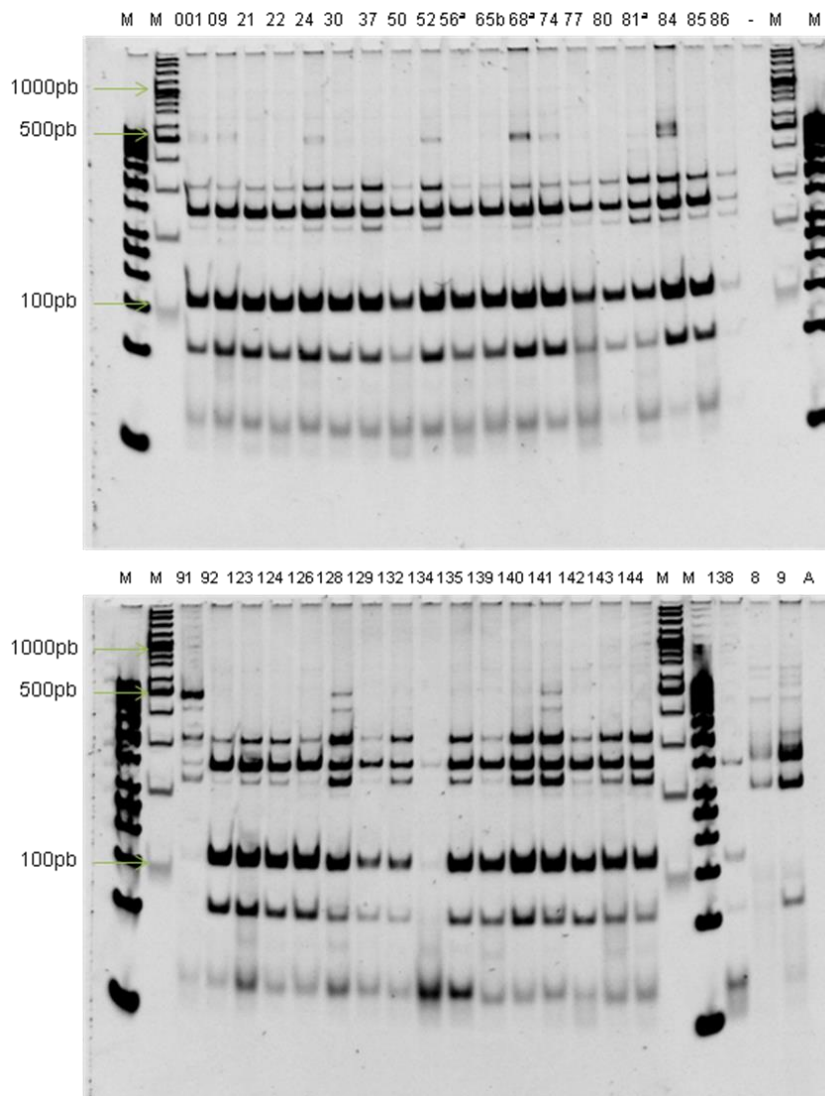


Figura 5-8: Digestión del producto amplificado A2/I2 con enzima *Rsa*I. Gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) teñido con *GelRed*, a 160 voltios-70 minutos, en cada carril se adicionó: 2µl marcador de peso molecular 100 pb (M), 1µl marcador de peso molecular 50 pb y 4µl del producto digerido más 2 µl de azul de bromofenol.

Con los patrones de PCR-RFLP se puede identificar si dentro de un solo aislado de *Phytophthora* hay perfiles de RFLP aberrantes o que dan resultados de pérdida de sitios de restricción en las amplificaciones; esto puede reconocerse cuando la suma de los fragmentos de RFLP es mayor que el tamaño del amplicón de PCR. Al organizar los patrones de acuerdo con el número de fragmentos visibles, se puede formar una clave de

identificación molecular que permite identificar rápidamente una especie. Los patrones de restricción obtenidos mediante la digestión de las enzimas se pueden comparar con patrones de aislados representativos de un gran número de especies (Drenth et al, 2006).

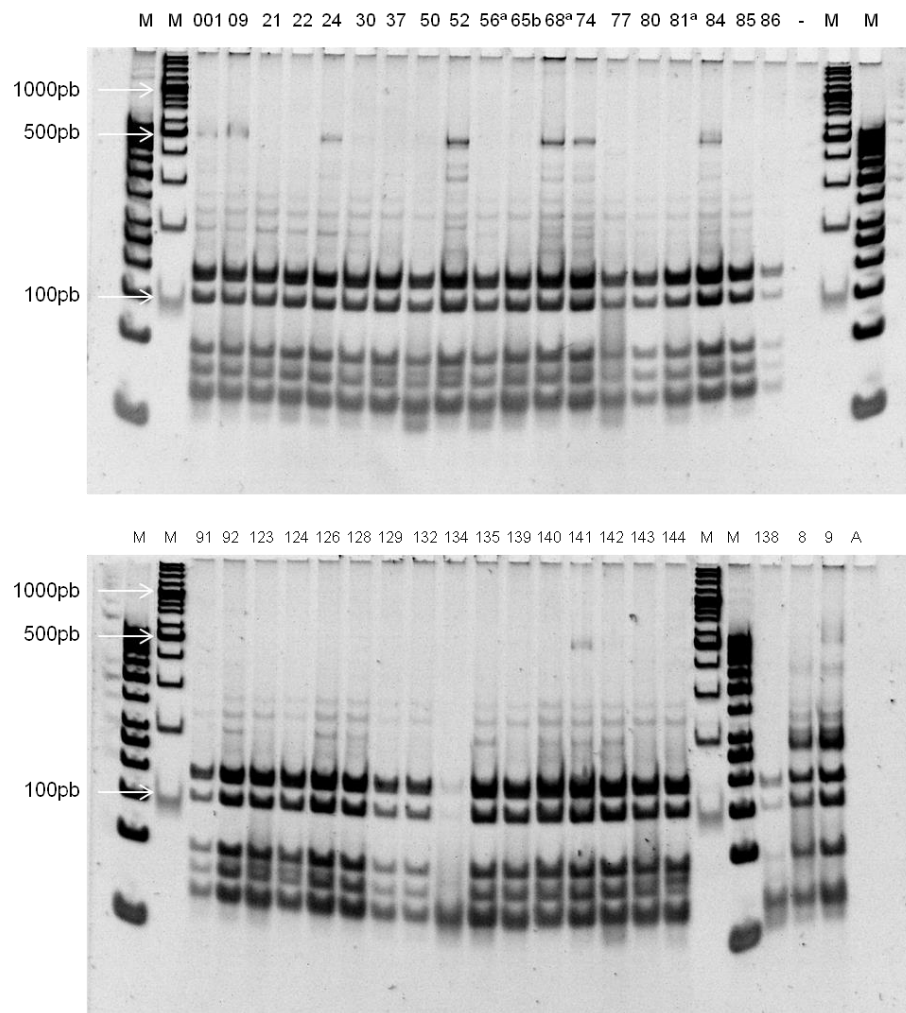


Figura 5-9: Digestión del producto amplificado A2/I2 con enzima TaqI. Gel de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) teñido con *GelRed*, a 160 voltios-60 minutos, en cada carril se adicionó: 2µl marcador de peso molecular de 100 pb (M), 1µl marcador de peso molecular de 50 pb y 4µl del producto digerido más 2 µl de azul de bromofenol.

El uso de estas tres enzimas permite distinguir algunas especies de *Phytophthora*, lo que facilita las pruebas de diagnóstico. Sin embargo, algunas especies de *Phytophthora* no

pueden distinguirse ni diferenciarse entre especies estrechamente relacionadas cuando se usa la combinación de las tres enzimas de restricción (Drenth et al, 2006; Silva et al. 2009).

5.3.4 Secuenciación de la región ITS

La secuenciación de 45 aislamientos de la misma especie reveló un porcentaje de identidad del 95%. La comparación de las secuencias homologas de *P. cinnamomi* en el GenBank confirmó la especie *P. cinnamomi*.

Los iniciadores específicos de la región ITS son ampliamente usados para amplificar el ADN de varias especies de oomycetes. Estos iniciadores permiten determinar de manera más rápida las especies de *Phytophthora*, debido a que son regiones muy conservadas (Fierro-Corrales, 2011).

Al comparar las secuencias con la base de datos de *Phytophthora* se observó que el aislamiento Src-142 tiene un porcentaje de similitud del 18% con aislados de *P. cinnamomi* provenientes de U.S.A, Polonia y China. El análisis filogenético indicó estrecha similitud en la mayoría de los aislamientos que se agruparon en un mismo clado, además se formaron clados más pequeños donde se agrupan los demás aislamientos de los departamentos del Valle del Cauca, Cauca y Risaralda (Fig. 5-10).

Foster et al. (2000) han llevado a cabo estudios de identificación y de relaciones evolutivas de aislados de *P. cinnamomi* utilizando información de secuencias ITS. Para diferenciar varias especies de *Phytophthora*, Drenth et al. (2006) utilizaron la información de secuencias de ADN y encontraron enzimas de restricción que fueron capaces de proporcionar huellas digitales de diferentes especies.

El análisis de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *Phytophthora* mediante el uso de numerosos aislamientos para cada especie, no sólo permite una evaluación precisa de las relaciones evolutivas entre especies, sino que también asegura que los ensayos de diagnóstico detectan e identifican de una manera más amplia un rango de individuos dentro de una especie (Drenth et al, 2006)

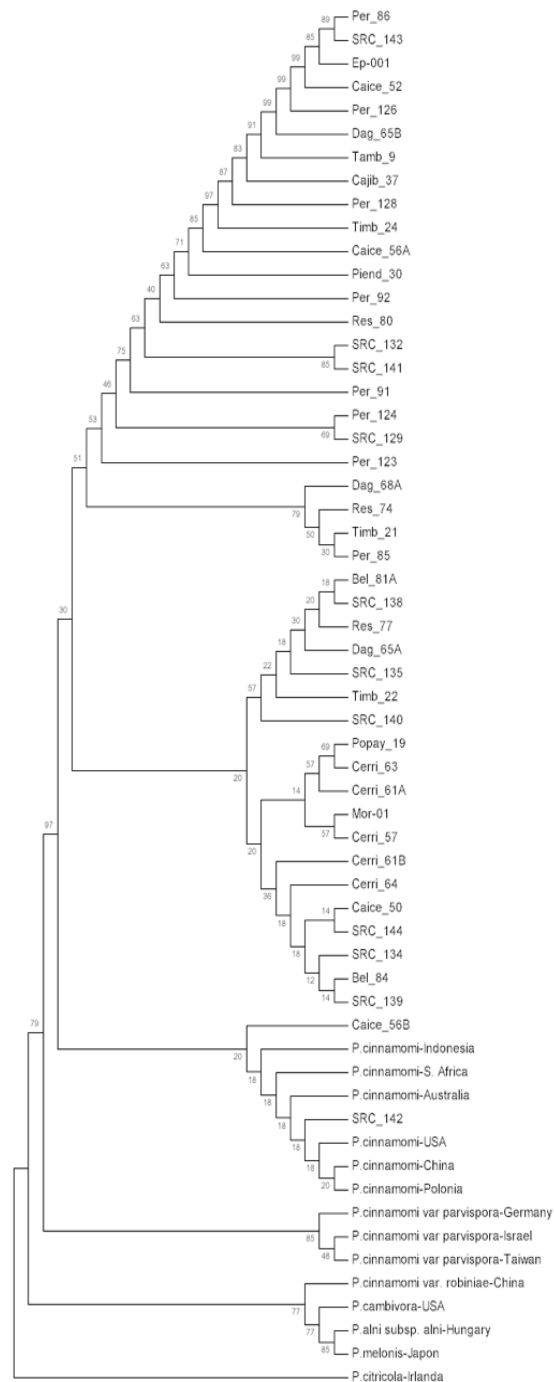


Figura 5-10: Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen ITS ADN de las amplificaciones de *P. cinnamomi*.

5.4 Selección de aislamientos patogénicos de *Phytophthora cinnamomi*

Las inoculaciones mediante el empleo de micelio en herida al tallo permitieron evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *P. cinnamomi* en las plantas de aguacate Hass e indicaron diferencias en el área de la lesión y en los síntomas presentados en la copa de las plantas. Van der Merwe et al. (1990) menciona que la utilización de micelio para realizar inoculaciones puede ser igual o más efectivo en las infecciones que las zoosporas.

Todos los aislamientos produjeron necrosis en el área de la lesión, sin embargo el tamaño fue variable entre algunos de ellos. Se presentaron plantas con necrosis en el tallo que continuaron su crecimiento, mientras que otras desarrollaron síntomas de decaimiento de hojas y copa. En las plantas testigo no se observaron lesiones, solamente presentaron oxidación en el corte de la herida (Fig. 5-11).



Figura 5-11: Avance de la lesión a los 6 ddi. A. Testigo. B. Cajib-37. C. Dag-65B. D. Tamb-09.

Los aislamientos Tamb-09 (T1), Cajib-37 (T4) y Dag-65B (T8) presentaron un desarrollo rápido de la lesión en comparación con los demás tratamientos (Fig. 5-12 A-B-C). Se obtuvieron síntomas de flacidez en hojas a los 3 y 6 primeros días después de la inoculación (ddi), presentándose muerte de la copa a los 9 ddi. El aislamiento Tamb-09 mostró una longitud de necrosis de 15 cm y muerte de la copa. Se seleccionaron estos tres

aislamientos para realizar la prueba de inoculación con zoosporas en discos de hojas y así poder determinar la capacidad infectiva de *P. cinnamomi*.

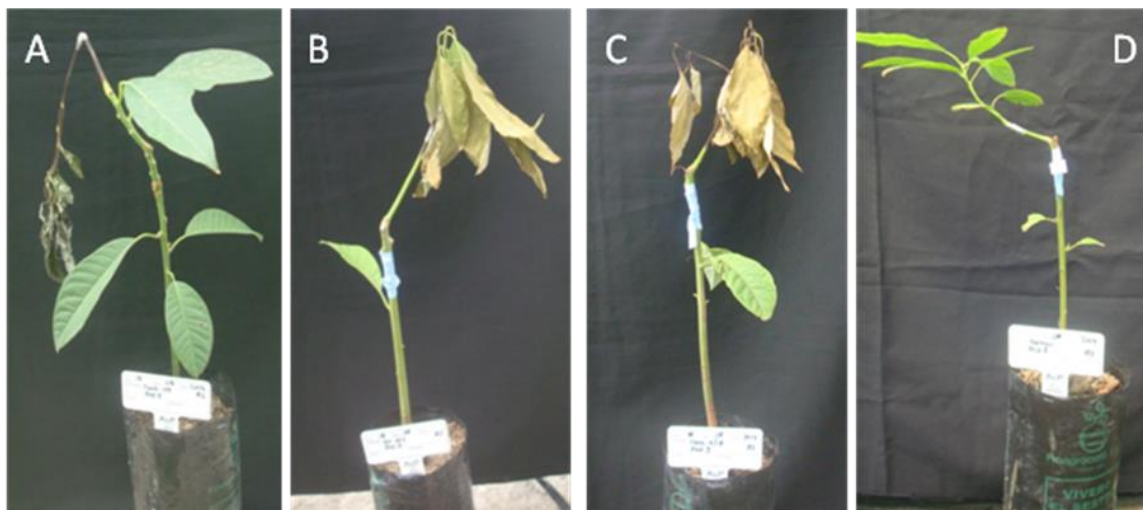


Figura 5-12: Desarrollo de la lesión. A. Tamb-09, 6 ddi. B. Cajib-37, 9 ddi. C. Dag-65B, 9 ddi. D. Testigo

Estudios de variabilidad patogénica han reportado diversos niveles de patogenicidad de aislamientos de *Phytophthora*, en los cuales se ha correlacionado positivamente la tasa de crecimiento in vitro de los aislamientos con los niveles de patogenicidad (Pérez-Jiménez, 1997). Al comparar la tasa de crecimiento de la colonia en medio de cultivo con el desarrollo de la lesión del aislamiento Tamb-09, ésta tendría una correlación positiva, debido a que su desarrollo fue de 9 días en colonizar completamente el medio PDA y en causar la muerte de la copa.

Aunque la tolerancia y la susceptibilidad se pueden distinguir por diversos métodos, la medición del desarrollo de la lesión y la colonización lineal, después de la inoculación con los aislamientos altamente patogénicos, son metodologías que han demostrado ser las más efectivas en términos de confiabilidad y simplicidad (Botha et al, 1989).

Después de realizar los postulados de Koch a partir de tejido infectado se comprueba que los aislamientos corresponden a *Phytophthora cinnamomi*. Por lo cual se demuestra la potencialidad de éstos en colonizar el tejido y en ser patogénicos.

5.5 Prueba de inoculación artificial en hojas

Las condiciones de temperaturas evaluadas (5°C / 26°C: 1h) en la metodología de inducción de esporangios y liberación de zoosporas, permitieron obtener una suspensión de zoosporas móviles (Fig. 5-13). El ensayo de inoculación artificial en disco foliar con los aislamientos más patogénicos, basado en el desarrollo de la lesión y formación de micelio, no presentó desarrollo de afección en los discos de hojas y no fue posible distinguir los cinco puntos de la escala de Nyassé et al. (1995).



Figura 5-13: Liberación de zoosporas móviles después de someter a choque térmico los esporangios de *P. cinnamomi*

La inoculación con suspensión de zoosporas de los aislamientos Cajib-37 y Dag-65B no causó afección en los discos. Solamente el aislamiento Tamb-09, catalogado como el más patogénico, produjo una leve lesión en tres discos (Fig. 5-14).

Estos resultados difieren de los informados previamente por Argolo-Magalhaes et al. (2016); quienes sugieren que el uso del método de inoculación en discos de hojas puede ser una buena alternativa para seleccionar clones resistentes a patógenos. Tuset et al. (2001) en un estudio de inoculación de *P. cinnamomi* en especies de *Quercus*, reportaron que para observar síntomas evidentes de infección se necesitan suspensiones de 100.000

zoosporas/ml. Con respecto a lo anterior, se puede atribuir que la falta de síntomas visibles en los discos es por la concentración de zoosporas utilizada.

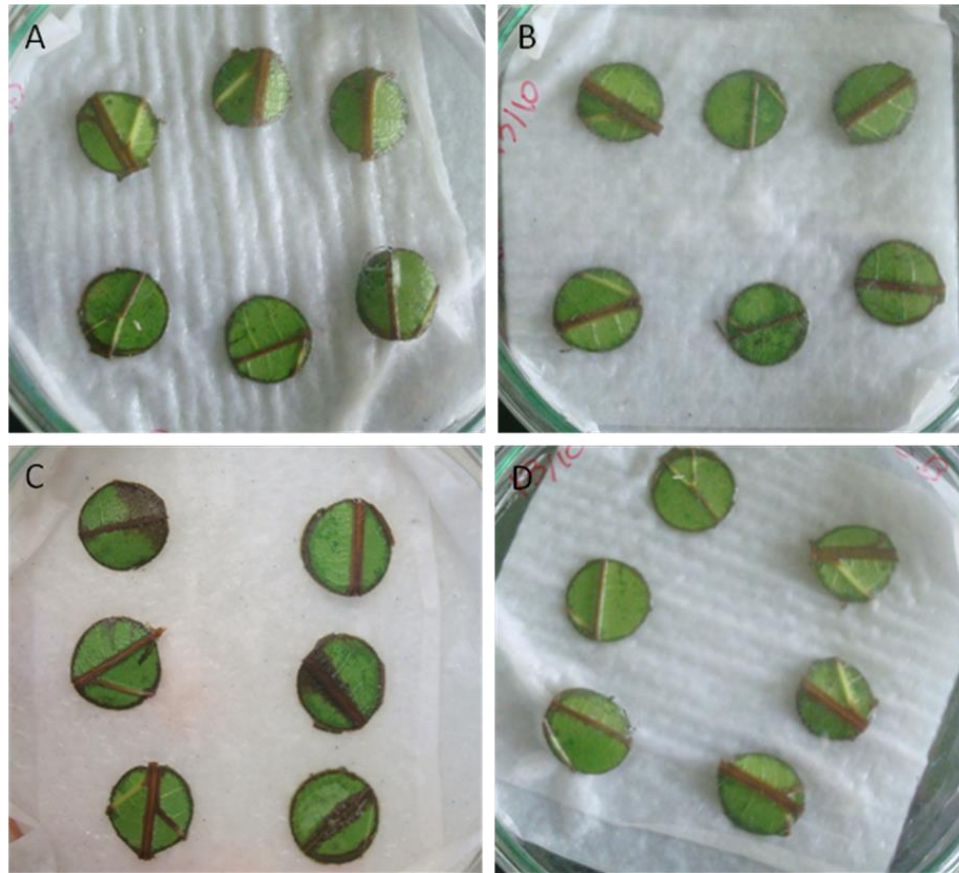


Figura 5-14: Discos inoculados con 20 μ L de una suspensión de zoosporas a 6×10^4 mL⁻¹ zoosporas móviles. A. Cajib-37. B. Dag-65B. C. Tamb-09. D. Testigo

La utilización de zoosporas de *P. cinnamomi* como fuente de inoculación garantiza un grado de infección. Sin embargo, la producción de zoosporas es un proceso largo y laborioso (Chen y Zentmyer, 1970). Van del Merve (1990) ha demostrado que el micelio de *P. cinnamomi* infecta plantas y sugiere que en estudios de evaluación de la tolerancia de plantas de aguacate, se comparen las técnicas de infección en raíces con fuentes de inoculación a partir de micelio y zoosporas de aislamientos altamente patogénicos. Por otro lado, Botha et al. (1989) afirma que la inoculación en hojas jóvenes de aguacate con *P. cinnamomi* puede ser una técnica prometedora para detectar la patogenicidad de

aislamientos y para evaluar plántulas de aguacate propagadas vegetativamente sin alterar sus raíces.

5.6 Análisis de datos

De acuerdo con la prueba de rangos múltiples Duncan, fue posible distinguir el aislamiento Tamb-09 como el más agresivo con diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) frente a los demás aislamientos (Tabla 5-2). El aislamiento Per-128 fue menos agresivo, ya que no produjo necrosamiento en la herida y se comportó muy similar a los testigos. Esta baja patogenicidad probablemente se debió al tiempo de reactivación del aislado.

Tabla 5-1: Análisis de varianza (ANOVA) para selección de aislamientos patogénicos de *Phytophthora cinnamomi*.

Fuente	GL	SC	CM	F-Valor	Pr > F
Modelo	33	6.293.964.804	190.726.206,00	6.57	<.0001
Error	68	1.975.026.667	0.29044510		
Total corregido	101	8.268.991.471			

En el análisis de varianza se encontró que existe diferencia significativa en el área de la lesión de los aislamientos, ya que todos presentaron un diferente avance en el tiempo (Tabla 5-1). En la figura (5-15), se observa el avance de la lesión producida por los tres aislamientos más patogénicos de *P. cinnamomi* y el aislamiento con menor área de lesión, comparados con el testigo absoluto.

Tabla 5-2: Prueba múltiple de medias por Duncan para selección de aislamientos patogénicos de *Phytophthora cinnamomi*.

Aislamiento	Media (cm ²)	Agrupamiento Duncan		
Tamb-09	59.367	a		
Cajib-37	56.833	b	a	
Dag-65b	55.767	b	a	c
Per-84	54.600	b	a	c
Per-85	54.267	b	a	c
Caice-52	53.667	b	d	a c
Res-77	53.300	b	d	a c
Caice-50	52.933	b	d	a c
Piend-30	52.133	b	d	a c
Bel-81a	50.000	e	b	d a c
Per-123	49.833	e	b	d a c
Res-74	48.967	e	b	d a c f
Src-143	47.067	e	b	d g c f
Ep-001	46.200	e	d	g c f
Dag-68a	46.133	e	d	g c f
Per-126	46.133	e	d	g c f
Timb-22	45.433	e	d	g c f
Timb-24	45.100	e	d	g c f
Src-144	43.100	e	h	d g f
Timb-21	40.933	e	h	g f
Per-91	40.700	e	h	g f
Res-80	40.533	e	h	g f
Per-86	40.433	e	h	g f
Src-140	39.700	e	h	g f
Per-124	39.333	e	h	g f
Per-92	38.933	h	g	f
Src-129	37.667	h	g	
Src-135	37.600	h	g	
Src-132	36.867	h	g	
Src-139	36.500	h	g	i
Src-141	34.400	h		i
Caice-56a	34.333	h		i
Src-142	32.733	h		i
Per-128	26.800			i

Letras diferentes muestran diferencias significativas según test de Duncan ($P < 0.05$).

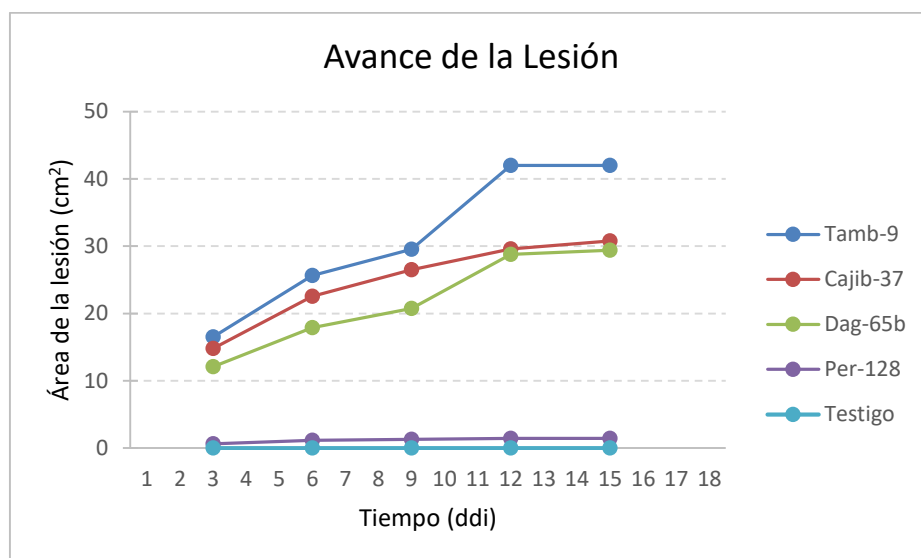


Figura 5-15: Avance de la lesión (cm) de los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* en las cinco evaluaciones.

El ABCPE en las cinco evaluaciones presentó valores de 379,4 cm en el aislamiento Tamb-09; 304,3 cm en Cajib- 37 y 264,7 cm en Dag-65b; siendo el primero, el aislamiento que presentó mayor área bajo la curva, debido a que el avance de la lesión en el tiempo fue más rápido. La menor área bajo la curva se presentó en el aislamiento Per-128 (menos agresivo) (Fig. 5-16).

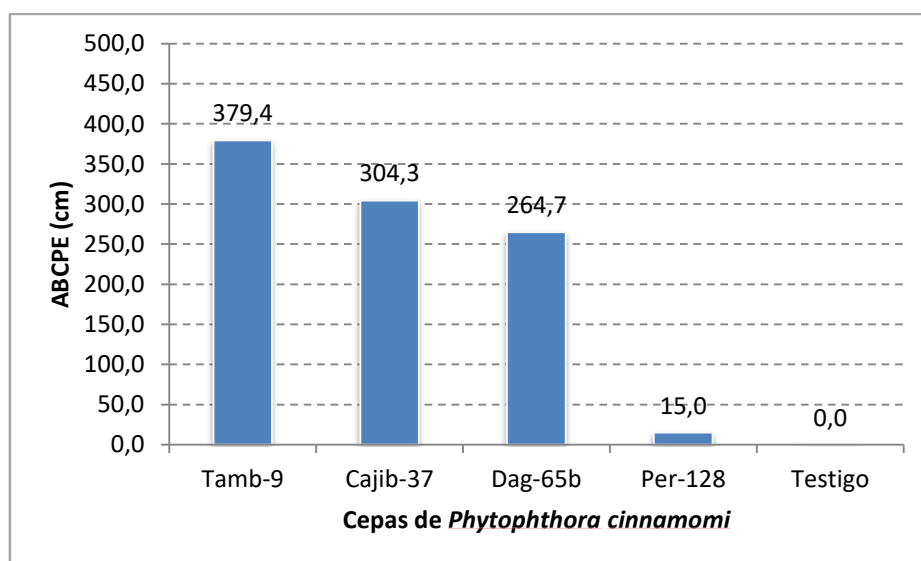


Figura 5-16: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de los aislamientos más patogénicos, el aislamiento menos agresivo y un testigo absoluto

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

De las 120 muestras de suelo y raíces se logró obtener una colección de 45 aislamientos de los departamentos del Valle del Cauca, Cauca y Risaralda, 34 identificados como *Phytophthora* y 11 de otros Oomycetos. La caracterización morfológica de los aislamientos con base en tipo de crecimiento y estructura reproductiva permitió identificarlos en primera instancia.

Se determinó el patrón de restricción referente para análisis de aislamientos de *P. cinnamomi* como una alternativa para evaluar otros aislamientos cuando no se dispone de análisis de secuencias. La caracterización molecular con la técnica de ITS1 y 4 con cebadores A2/I2 permitió la identificación a nivel de especie, confirmando que los 34 aislamientos pertenecen a *P. cinnamomi*.

La prueba de patogenicidad demostró que las 34 aislamientos de *P. cinnamomi* causaron síntomas en plantas de aguacate Hass en fase de vivero, el aislamiento Tamb-09 fue el más patogénico, mientras que el aislamiento Per-128 fue el menos patogénico. Se logró obtener una producción de zoosporas, que permitieron la inoculación artificial en discos de hojas de aguacate Lorena como una primera aproximación de un método de infección alterno.

Con este estudio se amplía la colección de aislamientos agresivos de *P. cinnamomi* de regiones productoras de aguacate en Colombia, que pueden ser utilizadas en futuros estudios para evaluación de tolerancia en materiales de aguacate

6.2 Recomendaciones

Ampliar la colección de aislamientos patogénicos de *P. cinnamomi* para la selección de patrones tolerantes a la enfermedad pudrición radical.

Se recomienda estandarizar la producción de zoosporas para usarlas en métodos de inoculación directo a la raíz y en discos de hojas de aguacate para la búsqueda de patrones tolerantes.

Evaluar los aislamientos Tamb-09, Cajib-37 y Dag-65, que fueron obtenidos como los más patogénicos en otros cultivares de aguacate y con otros métodos de inoculación.

A. Anexo: Aislamientos de *P. cinnamomi* pertenecientes al laboratorio de Fitopatología de Corpoica C.I. Palmira

Código Aislamiento	Departamento	Municipio	Vereda	Finca	Coordenadas	Altura	Estado del árbol
Ep-001	Valle del Cauca	Restrepo	El alto del oso	La bonita			Enfermo
Mor-01	Cauca	Morales	San Antonio	La Arabia	N 02°45'35,1'' / W 076°35'23,6''	1680	Sano
Tamb-09	Cauca	El Tambo	Las Piedras	Nápoles	N 02°25'53,1'' / W 076°44'58,2''	1734	Enfermo
Popay- 19	Cauca	Popayán	La Claridad	El Chaparral	N 02°27'21,5'' / W 076°34'22,8''	1899	Sano
Timb- 21	Cauca	Timbío	Urubamba	El Imperio	N 02°22'35,0'' / W 076°43'13,8''	1805	Enfermo
Timb- 22	Cauca	Timbío	Urubamba	El Imperio	N 02°22'32,9'' / W 076°43'14,6''	1822	Sano
Timb- 24	Cauca	Timbío	Urubamba	El Imperio	N 02°22'35,3'' / W 076°43'15,6''	1838	Enfermo
Piend- 30	Cauca	Piendamó	Los Tejares	La viña	N 02°38'15,4'' / W 076°30'38,0''	2072	Enfermo
Cajib- 37	Cauca	Cajibío	La Unión	La Selva	N 02°35'43,3'' / W 076°36'30,6''	1779	Enfermo
Caice - 50	Valle del Cauca	Caicedonia	La Camelia	Arauca	N 04°20'09,9'' / W 075°50'23,4''	1191	Enfermo
Caice - 52	Valle del Cauca	Caicedonia	La Camelia	Arauca	N 04°20'10,2'' / W 075°50'24,6''	1189	Sano
Caice - 56A	Valle del Cauca	Caicedonia	El Frontino	Manantiales del Frontino	N 04°17'03,3'' / W 075°50'49,5''	1826	Enfermo

Caice - 56B	Valle del Cauca	Caicedonia	El Frontino	Manantiales del Frontino	N 04°17'03,3'' / W 075°50'49,5''	1826	Enfermo
Cerri -57	Valle del Cauca	Cerrito	Guacanal	Guacanal	N 03°40'24,1'' / W 076°22'12,9''	988	Enfermo
Cerri -61A	Valle del Cauca	Cerrito	Guacanal	La Esfinge	N 03°40'13,1'' / W 076°22'12''	993	Enfermo
Cerri -61B	Valle del Cauca	Cerrito	Guacanal	La Esfinge	N 03°40'13,1'' / W 076°22'12''	993	Enfermo
Cerri -63	Valle del Cauca	Cerrito	Guacanal	La Esfinge	N 03°40'14,3'' / W 076°22'12''	991	Sano
Cerri -64	Valle del Cauca	Cerrito	Guacanal	La Esfinge	N 03°40'17,7'' / W 076°22'12''	995	Sano
Dag - 65A	Valle del Cauca	Dagua	Jiguales	La Cimarrona	N 03°36'06,7'' / W 076°40'32,3''	1230	Enfermo
Dag - 65B	Valle del Cauca	Dagua	Jiguales	La Cimarrona	N 03°36'06,7'' / W 076°40'32,3''	1230	Enfermo
Dag - 68A	Valle del Cauca	Dagua	Jiguales	La Cimarrona	N 03°36'05,8'' / W 076°40'30,8''	1226	Enfermo
Res - 74	Valle del Cauca	Restrepo	Agua Linda	La Chirrosa	N 03°50'12,4'' / W 076°30'00''	1570	Enfermo
Res - 77	Valle del Cauca	Restrepo	Alto del Oso	La Bonita	N 03°49'51,8'' / W 076°29'11,2''	1642	Enfermo
Res - 80	Valle del Cauca	Restrepo	Alto del Oso	La Bonita	N 03°49'54'' / W 076°29'08,7''	1643	Sano
Bel - 81A	Risaralda	B. de Umbría	Santa Emilia	Las Casillas	N 05°12'16,7'' / W 075°53'59,8''	1754	Enfermo
Bel - 84	Risaralda	B. de Umbría	Santa Emilia	Las Casillas	N 05°12'20,3'' / W 075°54'01,8''	1763	Sano
Per -85	Risaralda	Pereira	La Colonia	La Selva	N 04°44'45,7'' / W 075°37'50''	1834	Enfermo
Per -86	Risaralda	Pereira	La Colonia	La Selva	N 04°44'43,6'' / W 075°37'52,2''	1828	Enfermo
Per - 91	Risaralda	Pereira	La Bella	Los Alpes	N 04°45'45,9'' / W 075°38'34,9''	1814	Enfermo
Per - 92	Risaralda	Pereira	La Bella	Los Alpes	N 04°45'47,7'' / W 075°38'33''	1821	Enfermo
Per-123	Risaralda	Pereira	El Rincón	La Benedicta	N 04°45'25,2'' / W 075°38'14,8''	1825	Enfermo
Per-124	Risaralda	Pereira	El Rincón	La Benedicta	N 04°45'20,5'' / W 075°38'14,3''	1831	Enfermo
Per-126	Risaralda	Pereira	Bella Baja	Canaima	N 04°46'13,5'' / W 075°38'53,7''	1824	Enfermo
Per-128	Risaralda	Pereira	Bella Baja	Canaima	N 04°46'13,5'' / W 075°38'51,3''	1813	Sano
SRC-129	Risaralda	S. R de Cabal	Campo Alegre	El Planchón	N 04°54'37,9'' / W 075°36'01,6''	1600	Enfermo
SRC-132	Risaralda	S. R de Cabal	Campo Alegre	El Planchón	N 04°54'36,9'' / W 075°36'03,9''	1605	Sano
SRC-134	Risaralda	S. R de Cabal	Campo Alegrito	Guadalupe	N 04°54'22,8'' / W 075°36'32''	1597	Enfermo
SRC-135	Risaralda	S. R de Cabal	Campo Alegrito	Guadalupe	N 04°54'23,7'' / W 075°36'33,2''	1591	Sano
SRC-138	Risaralda	S. R de Cabal	El Manzanillo	La Esperanza	N 04°55'50'' / W 075°39'39,8''	1610	Enfermo

SRC-139	Risaralda	S. R de Cabal	El Manzanillo	La Esperanza	N 04°55'49'' / W 075°39'40,8''	1600	Sano
SRC-140	Risaralda	S. R de Cabal	El Manzanillo	La Esperanza	N 04°55'50'' / W 075°39'41,5''	1591	Enfermo
SRC-141	Risaralda	S. R de Cabal	El Silencio	Monserate	N 04°53'30,5'' / W 075°36'46,3''	1615	Enfermo
SRC-142	Risaralda	S. R de Cabal	El Silencio	Monserate	N 04°53'29,6'' / W 075°36'44,2''	1645	Enfermo
SRC-143	Risaralda	S. R de Cabal	El Silencio	Monserate	N 04°53'28,1'' / W 075°36'44,8''	1674	Sano
SRC-144	Risaralda	S. R de Cabal	El Silencio	Monserate	N 04°53'26,2'' / W 075°36'34,7''	1704	Sano

B. Anexo: Crecimiento de las colonias de la colección de aislamientos

Código aislamiento	Departamento	Municipio	Tasa de Crecimiento (cm)	Tiempo. Prom. Desarrollo (días)	Prom. Desarrollo (cm)	Patrón de colonia
Ep-001	Valle del Cauca	Restrepo	0,30	12	2,5	Rosaceo
Mor-01	Cauca	Morales	0,42	6	3,2	Estrellada
Tamb-09	Cauca	El Tambo	0,36	9	2,6	Rosaceo
Popay- 19	Cauca	Popayán	0,37	12	2,3	Estrellada
Timb- 21	Cauca	Timbío	0,40	9	3,1	Rosaceo
Timb- 22	Cauca	Timbío	0,19	12	2,8	Rosaceo
Timb- 24	Cauca	Timbío	0,77	6	3,1	Rosaceo
Piend- 30	Cauca	Piendamó	0,19	15	2,4	Rosaceo
Cajib- 37	Cauca	Cajibío	0,28	12	2,7	Rosaceo
Caice - 50	Valle del Cauca	Caicedonia	0,18	15	1,9	Rosaceo
Caice - 52	Valle del Cauca	Caicedonia	0,16	15	2,1	Rosaceo
Caice - 56A	Valle del Cauca	Caicedonia	0,20	15	1,8	Rosaceo
Caice - 56B	Valle del Cauca	Caicedonia	0,57	6	2,7	Estrellada
Cerri -57	Valle del Cauca	Cerrito	0,25	6	2,6	Estrellada
Cerri -61A	Valle del Cauca	Cerrito	0,20	5	2,8	Estrellada
Cerri -61B	Valle del Cauca	Cerrito	0,23	6	3,0	Estrellada
Cerri -63	Valle del Cauca	Cerrito	0,20	6	3,2	Estrellada
Cerri -64	Valle del Cauca	Cerrito	0,19	5	2,9	Estrellada
Dag - 65A	Valle del Cauca	Dagua	0,54	6	2,8	Estrellada
Dag - 65B	Valle del Cauca	Dagua	0,09	15	1,2	Rosaceo
Dag - 68A	Valle del Cauca	Dagua	0,43	12	2,4	Rosaceo
Res - 74	Valle del Cauca	Restrepo	0,42	9	2,8	Rosaceo
Res - 77	Valle del Cauca	Restrepo	0,15	15	1,9	Rosaceo
Res - 80	Valle del Cauca	Restrepo	0,67	6	3,0	Rosaceo
Bel - 81A	Risaralda	B. de Umbría	0,24	12	2,9	Rosaceo
Bel - 84	Risaralda	B. de Umbría	0,25	12	2,7	Rosaceo

Per -85	Risaralda	Pereira	0,23	15	1,9	Rosaceo
Per -86	Risaralda	Pereira	0,24	15	2,2	Rosaceo
Per - 91	Risaralda	Pereira	0,20	15	1,6	Rosaceo
Per - 92	Risaralda	Pereira	0,71	6	3,2	Rosaceo
Per-123	Risaralda	Pereira	0,31	12	1,8	Rosaceo
Per-124	Risaralda	Pereira	0,28	12	2,0	Rosaceo
Per-126	Risaralda	Pereira	0,67	6	3,0	Rosaceo
Per-128	Risaralda	Pereira	0,21	15	1,8	Rosaceo
SRC-129	Risaralda	S. R de Cabal	0,21	15	1,9	Rosaceo
SRC-132	Risaralda	S. R de Cabal	0,43	9	2,7	Rosaceo
SRC-134	Risaralda	S. R de Cabal	0,22	6	2,5	Estrellada
SRC-135	Risaralda	S. R de Cabal	0,42	9	2,9	Rosaceo
SRC-138	Risaralda	S. R de Cabal	0,28	9	2,8	Estrellada
SRC-139	Risaralda	S. R de Cabal	0,26	12	1,9	Rosaceo
SRC-140	Risaralda	S. R de Cabal	0,31	9	2,3	Rosaceo
SRC-141	Risaralda	S. R de Cabal	0,36	9	2,7	Rosaceo
SRC-142	Risaralda	S. R de Cabal	0,43	6	2,2	Rosaceo
SRC-143	Risaralda	S. R de Cabal	0,35	9	2,6	Rosaceo
SRC-144	Risaralda	S. R de Cabal	0,18	15	2,2	Rosaceo

Bibliografía

- Acosta-Rivera, I. Y. (2008). *Pruebas de tolerancia a Phytophthora cinnamomi Rands. en plántulas de aguacate criollo Mexicano (Persea americana Mill. var. drymifolia)*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 95 p.
- AGRONET. (2017). *El aguacate Hass avanza en la conquista de mercados mundiales de la mano de Colombia Siembra - Noticias*. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de: <http://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/El-aguacate-Hass-avanza-en-la-conquista-de-mercados-mundiales-de-la-mano-de-Colombia-Siembra---.aspx>
- Almaraz-Sánchez, A., Alvarado-Rosales, D., Leyva-Mir, G., Equihua-Martínez, A., Aranda-Ocampo, S., Hernández-Morales, J. (2016) *Pruebas de patogenicidad de Phytophthora.cinnamomi Rands en Pseudotsuga mensiezii*. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 142-157.
- Andrade-Hoyos, P. (2012). *Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a Phytophthora cinnamomi Rands*. Tesis de doctorado en ciencias con énfasis en Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México. 110 p.
- Argolo Magalhaes, D. M., Luz, E. D., Vanderlei Lopes, U., Rocha Niella, A. N., Oliveira, V. (2016). *Leaf disc method for screening Ceratocystis wilt resistance in cacao*. Trop. Plant Pathology 27 (3):209-214.
- Barreto, M. A., Santos, J. C., Correa, R. X., Luz, E. D., Marerlli, J., Souza, A. P. (2015). *Detection of genetic resistance to cocoa black pod disease caused by three Phytophthora species*. Euphytica 206: 677–687.

- Bernal, J. A. & Díaz, C. A. (2005). *Tecnología para el cultivo del aguacate*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Manual Técnico No. 5. Primera edición. Editorial Litomadrid, Medellín, p 11-78.
- Bernal, J., Díaz, C., Osorio, C., Tamayo, A., Osorio, W., Córdoba, O., Tamayo, P., Kondo, T., Carabalí, A., Varón, E., Caicedo, A., Sandoval, A., Forero, F., García, J., Londoño, M. Corpoica. (2014). *Actualización tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacate*. Medellín (Colombia). 410 p.
- Bergh, B. O., Ellstrand, N. (1986). *Taxonomy of the avocado*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 70: 135-146.
- Bergh, B. O. (1992). *The origin, nature and genetic improvement of the avocado*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 76: 61-75.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., Kang, S. (2008). *A multi-locus phylogeny for Phytophthora utilizing markers derived from complete genome sequences*. Fungal Genet. Biol. 45: 266-277.
- Botha, I., Wehner, F. C., Kotzé, J. M. (1989). *An evaluation of in vitro screening techniques for determining tolerance of avocado rootstocks to Phytophthora cinnamomi*. South African Avocado Growers Association Yearbook. 12: 60-63
- Calm. (2003). *Phytophthora cinnamomi* and disease caused by it. Volume 1 - Management Guidelines. Unpublished. Recuperado el 22 de febrero de 2017 de: https://www.dpaw.wa.gov.au/images/documents/conservation-management/pests-diseases/disease-risk-areas/Phytophthora_cinnamomi_and_disease_caused_by_it-_Vol._1_Management_Guidelines_.pdf
- Calle, C. (2017). *Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos de Phytophthora cinnamomi obtenidos de huertos de aguacate del departamento de Antioquia,*

- Colombia*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Medellín. 107 p.
- Chen, D. W., Zentmyer, G. A. (1970). *Production of sporangia by Phytophthora cinnamomi in axenic culture*. Mycologia 62: 397-402.
- Coffey, M. D. (1987). *Phytophthora Root Rot of Avocado — An Integrated Approach to Control in California*. California Avocado Society. 71: 121-137
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (2009). *Informe Final del Proyecto: Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a Phytophthora spp.*. Palmira, Valle del Cauca, pp. 40-44.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (2017). *Trabajamos para que el aguacate Hass, se convierta en el cuarto producto agrícola colombiano de exportación*. Recuperado el 22 de febrero de 2017 de: <http://www.corpoica.org.co/noticias/generales/sgr-aguacate-antioquia/>
- Dann, E. K., Ploetz, R., Coates, L. M., Pegg, K. G. (2013). *Foliar, fruit and soilborne diseases*. The Avocado: Botany, Production and Uses. Wallingford, UK: CAB International, pp 380-422.
- Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales de Colombia. (2012). *Encuesta Nacional Agropecuaria - Boletín de prensa*. Recuperado el 15 de enero de 2013 de: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/boletin_ena_2012.pdf
- Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales de Colombia (2015). *Encuesta Nacional Agropecuaria - Boletín mensual No. 40*. Recuperado el 12 de julio de 2017 de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_oct_2015.pdf

- Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales de Colombia. (2014). *Tercer Censo Nacional Agropecuario. Décima entrega de resultados*. Recuperado el 29 de julio de 2015 de: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/censo-nacional-agropecuario-2014>
- Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales de Colombia. (2016). *Encuesta Nacional Agropecuaria - Boletín técnico*. Recuperado el 01 de junio de 2016 de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2015/boletin_ena_2015.pdf
- Dolan, T. E. & Coffey, M. D. (1986). *Laboratory screening techniques for assessing resistance of four avocado rootstocks to Phytophthora cinnamomi*. Plant Dis. 70: 115-118.
- Drenth, A. & Sendall, B. (2001). *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection. Brisbane Australia, 42 p.
- Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G., Irwin, J.A. (2006). *Development of a DNA-based method for detection and identification of Phytophthora species*. Australasian Plant Pathology. 35: 147–159.
- Doyle, J. J., Doyle, J.L. (1990). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus. 12: 13-15.
- Echemendia, Y. E. (2007). *Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control*. Fao. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
- Engelbrecht, J. & Van den Berg, N. (2013). *Expression of defence-related genes against Phytophthora cinnamomi in five avocado rootstocks*. S Afr J Sci.109: 11-18
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996). *'Phytophthora diseases worldwide.'* American Phytopathological Society Press: St Paul

- Fierro Corrales, D. (2011). *Etiología y manejo de Phytophthora cinnamomi (Rands) en Aguacate en Michoacan*. Tesis de Maestría. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas campus montecillo postgrado de fitosanidad entomología y acarología. 113 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. FAOSTAT. (2017). Recuperado el 23 de agosto de 2017 de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Förster, H., Cummings, M. P., Coffey, M. D. (2000). *Phylogenetic relationships of Phytophthora species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI*. Mycological Research. 104: 1055–1061.
- Gabor, B. K. & Coffey, M. D. (1991). *Comparison of rapid methods for evaluating resistance to Phytophthora cinnamomi in Avocado Rootstocks*. Plant Dis. 75:118-120.
- Galindo, J. A. & Zentmyer, G. A. (1964). *Mating types in Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology. 54: 238-239.
- Gallegly, M. E. & Hong, C. (2008). *Phytophthora: identifying species by morphology and DNA fingerprints*. APS Press. St. Paul, Minnesota. 158 p.
- Georgi, K. I. (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*. Taller de titulación. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Chile. 99 p.
- Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. 2009. *ICA impulsa plan para erradicar 6000 árboles de aguacate en Montes de María*. Recuperado el 5 de abril de 2015 de: <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2009/ICA-impulsa-plan-para-erradicar-6000-arboles-de-ag.aspx>
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM (2010). *Boletín climatológico Mensual*. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de: <http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/climatologico-mensual>.

- Jaramillo J., Mejía A., Villamizar P., Orozco M., Arenas A. (2009). *Informe Final del Proyecto: Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a Phytophthora spp.*. Palmira, Valle del Cauca, pp. 40-44.
- Kamoun, S. et al. (2015). *Review The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology*. Molecular Plant Pathology. 16 (4): 413–434
- Kopp, L. (1996). *A taxonomic revision of the genus Persea in the western hemisphere (Perseae-Lauraceae)*. Memoirs of the New York Botanical Garden 14: 1-117.
- Lamour, K. (2013). *Phytophthora: A Global Perspective*. University of Tennessee, Knoxville, USA. 256p. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de: https://books.google.com.co/books?id=OpcbkhSE2lcC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Lara-Chávez, M.B.N., Guillén-Andrade, H., Vidales-Fernández, J. A., Gutiérrez-Contreras, M., López-Medina, J., Ángel-Palomares, M. E., Chávez-Bárcenas, T. (2007). *Caracterización de aislados de Phytophthora cinnamomi Rands de la franja aguacatera de Michoacán, México*. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate). Viña Del Mar, Chile. 12 ISBN No 978-956-17-0413-8.
- Marais, L, Menge, J, Bender, G, Faber, B. (2002). *Phytophthora root rot*. Avo Research. 2: 1-2.
- Martin, R. R., James, D., Lévesque, C. A. (2000). *Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease*. Annual Review Phytopathology. 38: 207-239.
- Martin, F. N., Tooley, P. W. (2004). *Identification of Phytophthora Isolates to Species Level Using Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of a Polymerase Chain*

- Reaction-Amplified Region of Mitochondrial DNA*. The American Phytopathological Society 94 (9): 983-991.
- Martin, F. N., Abad, G., Balci, Y., Ivors, K. (2012). *Identification and detection of Phytophthora: Reviewing our progress, identifying our needs*. Plant Disease. 96 (8): 1080-1096
- Martin, F. & Coffey, M. (2012). *Mitochondrial haplotype analysis for differentiation of isolates of Phytophthora cinnamomi*. The American Phytopathological Society. 102 (2): 229-239
- Martínez, M., López, R., Salgado, R., Raya, M., Martínez, R. (2011). *Folates and Persea americana Mill. (Avocado)*. Emirates Journal of Food and Agriculture, 23 (3): 204-213.
- Nyassé, S., Cilas, C., Hérail, C., Blaha, G. (1995). *Leaf inoculation as an early screening test cocoa (Theobroma cocoa L.) resistance to Phytophthora black pod disease*. Crop Prot 14: 657–663.
- Neilsen, M. J. (2016). *Evaluation of Phytophthora Root Rot Resistance in Avocado*. Thesis doctor. The University of Queensland. Australia.
- Newell G. (1994). *The effect of Phytophthora cinnamomi on the habitat utilization of Antechinus stuartii in a victorian forest*. Thesis for the degree of Doctor unpublished, Deakin University, Melbourne, Australia.
- Papadakis, J. (1966) *Climates of the world and their agricultural potentialities*. DAPCO, Rome, 174 p.
- Parks, D. E. (2001). *Trypano tolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection University of Dublin, Dublin*.
- Pegg, K. & Giblin, F. R. (2008). *Principles of Phytophthora root rot management in established orchards*. In. Talking Avocados Brisbane, pp 36-38.

- Pérez-Jiménez, M. (2008). *Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes*. The European Journal of Plant Science and Biotechnology. 2 (1): 1-24. ISSN 1749-0472.
- Popenoe, W. (1920). *Manual of Tropical and Subtropical Fruits*. Macmillan, London, 524p.
- Rands, R. D. (1922). *Streepkancker van kaneel, veroorzaakt door Phytophthora cinnamomi n. sp.* Mededeelingen van het Instituut voor Plantenziekten. 54 p.
- Ramírez, J. G., Castañeda, D. A., Morales, J. G. (2014). *Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia*. Revista Ceres. 61 (1): 050-061. ISSN 0034-737X.
- Ribeiro, O. (1978). *A source book of the genus Phytophthora*. University of California. Riverside. 417 p.
- Rios, D., Tafur, R. (2003). *"Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia"*. Proceedings V World Avocado Congress, pp. 143-147.
- Rodríguez, E. (2015). *Caracterización morfológica y evaluación de la resistencia de materiales criollos de aguacate Persea americana Mill. A la pudrición radical del aguacate Phytophthora cinnamomi Rands en el centro de investigación Palmira de CORPOICA*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira. 98 p
- Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M., Mayek-Pérez, N. (2009). *Infection of avocado (Persea americana Mill.) by Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc.: Biochemical and genetics aspects*. Revista Mexicana de Fitopatología. 27 (1):53-63
- Rodríguez, L., Murcia, N., Montealegre, X., Marulanda-Medina, C., Martínez, M., Caicedo A., Dimas, J. (2013). *Informe Final del Proyecto: Protocolos de infección del*

aguacate con Phytophthora cinnamomi, en desarrollo. CORPOICA. Palmira, Valle del Cauca, 30 p.

Romero, L. D. (2014). *Estudio de la asociación entre algunas propiedades físicas y químicas del suelo y el comportamiento de la pudrición radical del aguacate causada por Phytophthora cinnamomi*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Facultad de Ciencias Agrarias. Bogotá. 111 p.

Salgado, M. L. & Fucikovsky, L. (1996). *Detached or materials of the Persea spp. Genus tolerant to Phytophthora cinnamomi by electrical conductivity*. Recuperado el 12 de junio de 2017 en: http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1996/Paras_96.pdf

Sánchez-Pérez, J. (2007). *Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (Persea americana Mill. Var. drymifolia) al oomiceto Phytophthora cinnamomi Rands*. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

Schaffer, B., Wolstenholme, B., Whiley, A. (2013). *The Avocado Botany, production and uses*. CABI Publishing. 416 p.

Silva, B., Jaramillo, S., Marin, M. (2009). *Caracterización genética de aislamientos de Phytophthora infestans en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander (Colombia)*. Actual Biol 31 (90): 5-20.

Smith, C.E. (1966). *Archeological evidence for selection in avocado*. Economic Botany 20: 169-175.

SIOC – Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016). *Cadena de Aguacate, Indicadores e Instrumentos. Cifras Sectoriales*. Recuperado el 29 de abril de 2016 de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Aguacate/Documentos/002%20->

%20Cifras%20Sectoriales/002%20-%20Cifras%20Sectoriales%20-%202016%20Abril%20Aguacate.pptx.

Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., Hall, G. S. (1990). *Revised tabular key to the species of Phytophthora*, Institute of Mycology Paper 162: Agricultural Bureau of International Mycology Institute.

Storey, W.B., Bergh, B., Zentmyer, G. A. (1986). *The origin, Indigenous range, and dissemination of the avocado*. California Avocado Society Yearbook 70: 127-133.

Tamayo, P. (2007). *Enfermedades del Aguacate. Ponencia presentada en el marco del Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate - Noviembre 2006*. Politécnica No. 4. Medellín. pp. 51-70

Téliz, O. D. & Mora, A. A. (2007). *El aguacate y su manejo integrado*. Ediciones Mundi-Prensa, Méx.171-208 p.

Thompson, S. E., Levin, S., Rodriguez-Iturbe, I. (2014). *Rainfall and temperature changes have confounding impacts on Phytophthora cinnamomi occurrence risk in the southwestern USA under climate change scenarios*. Global Change Biol. 20: 1299–1312.

Tsai, H. L., Huang, L.C., Ann, P. J., Liou, R. F. (2006). *Detection of orchid Phytophthora disease by nested PCR*. Botanical Studies 47: 379-387.

Torres, J. (2007). *Morfología de esporangios de Phytophthora cinnamomi Rands de colectas obtenidas en la franja aguacatera del estado de Michoacán*. Tesis de Ingeniero Agrónomo en la Especialidad de Parasitología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán. Mexico. 52 p.

- Tuset, J. J., Cots, F., Hinarejos, C., Mia, J. L. (2001). *Suspensión de zoosporas de Phytophthora cinnamomi que causan la "seca" en cinco especies de Quercus mediterráneos*. Bol. San. Veg. Plagas. 27: 103-115.
- Tyler, B. M. (2002). *Molecular basis of recognition between Phytophthora pathogens and their hosts*. Annu. Rev. Phytopathology. 40:137-167.
- Van der Merwe, M. (1990). *An improved method to evaluate avocado rootstocks for resistance to Phytophthora cinnamomi*. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 13: 67-68.
- Vidales-Fernández. (2002). *Efecto de factores físico químicos sobre la actividad microbiana de la rizosfera del aguacatero (Persea americana Mill) para el control de Phytophthora cinnamomi (Rands)*. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Tecomán, Colima, México.
- Waterhouse, G. M. (1963). *Key to the species Phytophthora De Bary*. Mycological Papers Commonwealth Mycol. Inst. Kew. 92 p.
- Williams, L. O. (1977). *The avocados, a synopsis of the genus Persea, subg. Persea*. Economic Botany 31: 315-320.
- Wolstenholme, B. N. & Whiley, A. W (1999). *Ecophysiology of the avocado (Persea americana Mill.) tree as a basis for pre-harvest management*. Revista Chapingo Serie Horticultura. 5: 77-88.
- Yabrudy, J. (2012). *El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano*. Documento de Trabajo Sobre Economía Regional. Publicación del Banco de la República – Sucursal Cartagena. 45 p.
- Zentmyer, G. A. (1952). *Collecting avocados in Central America for disease resistance test*. Calif. Avocado Soc. Yrbk. 32: 107-111.

- Zentmyer, G. A. (1961). *Chemotaxis of zoospores for root exudates*. Science 133: 1595-1596.
- Zentmyer, G. A. & Thorn, W. A. (1967). *Hosts of Phytophthora cinnamomi*. California Avocado Society Yearbook. California. 51: 177-8.
- Zentmyer, G. A. & Chen, D. W. (1969). *Production of sporangia by Phytophthora cinnamomi in pure culture*. California Avocado Society Yearbook 53: 103-107.
- Zentmyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi and the diseases it causes*. St. Paul: The American Phytopathological Society. 10: 1-96
- Zentmyer, G. A. & Schieber, E. (1987). *The search for resistance to Phytophthora root in Latin America*. S. Afr. Avocado Grower's Assoc. Yrbk. 10: 109-110.
- Zentmyer, G. A. (1992). *Persea and Phytophthora in Latin America*. Proc. of Second World Avocado Congress. 61-66 pp.
- Zentmyer, G. A. & Mircetich, S. M. (1965). *Testing for resistance of avocado to Phytophthora in nutrient solution*. Phytopathology 55: 487- 489.