



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS



CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

Selección de portainjertos de aguacate para
tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* (Rands)

PETRA ANDRADE HOYOS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

Montecillo, Texcoco, Edo. de México

2012

La presente tesis titulada: **Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* (Rands)**, realizada por la alumna: **Petra Andrade Hoyos**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR:



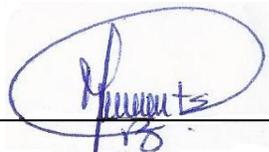
DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES

ASESOR:



DR. ALFREDO LÓPEZ JIMÉNEZ

ASESOR:



DRA. MARÍA DE LA CRUZ ESPÍNDOLA BARQUERA

ASESOR:



DR. EDUARDO MOLINA GAYOSSO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2012

Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands

Andrade Hoyos Petra, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN GENERAL

A nivel mundial, el intento por controlar la pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* ha tenido un éxito limitado. La identificación de portainjertos resistentes es una opción para que prospere el cultivo de aguacate en condiciones de presión de inóculo con *P. cinnamomi*. En plantas de aguacate raza Mexicana de 1 a 2 años y en etapa de plántula, responden a la infección por el oomicete *P. cinnamomi*. Esta respuesta se debe a la variación genética basada en la supervivencia, y a la implicación de la formación de tilosas y depósito de fenoles como mecanismos de defensa histológica, así como la capacidad totipotencial después de la inoculación con el oomicete. Con el objetivo de seleccionar portainjertos de aguacate tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* en condiciones de temperaturas controladas se inocularon genotipos de la raza Mexicana: Atlixco, Tepeyanco y Tepetl, y los portainjertos comerciales Thomas y Duke-7 con 250 mL/planta de suspensión micelial de *P. cinnamomi* (a temperaturas de 17 y 28 °C). El sustrato utilizado para la siembra consistió de una mezcla de peat moss[®], suelo agrícola y agrolita[®] (2:2:1) previamente esterilizado, durante el experimento la humedad en el suelo fue de 90%. Posteriormente, se realizó un estudio de histopatología seleccionando raíces de plantas con marchitez, muertas y asintomáticas para la realización de cortes histopatológicos. Atlixco y Tepeyanco se consideran genotipos con resistencia promisorio por mostrar consistentemente más de 90% de plantas asintomáticas en las dos temperaturas, mientras que los portainjertos Thomas, Duke-7 y Tepetl presentaron resistencia intermedia. En los resultados de histopatología, el contenido de micelio en el xilema de plantas muertas de Duke-7, Thomas y Tepetl mantenidas

previamente a 17 °C no mostró diferencias significativas; sin embargo, a 28 °C el contenido de micelio en Duke-7 fue significativo. En plantas con marchitez, la presencia de micelio en Tepetl fue abundante a 17 °C, por lo que se considera susceptible al patógeno. Mientras que a 28 °C los genotipos Tepetl y Atlixco mostraron bajo contenido micelial y por lo tanto se consideran tolerantes-resistentes. En plantas con síntomas de marchitez y asintomáticas, la formación de tilosas y la asociación de compuestos fenólicos contribuyeron a la defensa frente al oomicete. Los genotipos Tepeyanco, Atlixco y Tepetl mostraron resistencia al activar oportunamente sus mecanismos de defensa. En la prueba de resistencia en plántulas se inocularon los genotipos de Atlixco, Tepeyanco, Tepetl, Toliman, segregante de Colín V-33 y Thomas con un aislamiento virulento de *P. cinnamomi*. Al inocular los genotipos de aguacate a edad temprana (5 cm de altura), es posible detectar resistencia al oomicete en los genotipos de aguacate evaluados, la población de Atlixco es una fuente importante de resistencia al presentar mayor número de nuevos brotes y plántulas asintomáticas aún en etapas avanzadas de crecimiento (15 a 20 cm de altura). Los genotipos Toliman, Tepetl y Thomas en etapa juvenil son considerados susceptibles. Con los resultados obtenidos en la formación de nuevos brotes después de la inoculación los genotipos Atlixco y Tepeyanco se consideran promisorios para resistencia tanto a la marchitez del aguacatero como al cancro causado por *P. cinnamomi*.

Palabras clave: *P. cinnamomi*, *Persea americana* Mill., pudrición de raíz, cancro, mecanismos de defensa, tilosas, fenoles.

**Avocado rootstock selection for tolerance-resistance
to *Phytophthora cinnamomi* (Rands)**

Andrade Hoyos Petra, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2012

GENERAL SUMMARY

Worldwide, the attempt to control root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* has had limited success. Identifying resistant rootstock is an option for avocado crops to grow prosperous under pressure conditions of *P. cinnamomi* inoculum. Mexican avocado plants, 1 to 2 years of age, in the plantlet stage, respond to infection by *P. cinnamomi* oomycete. This response is due to the genetic variation based on survival and to the implication of the formation of tyloses and phenol deposits as histological defense mechanisms, as well as the totipotential capacity after inoculation with the oomycete. In order to select the avocado rootstock resistant-tolerant to *P. cinnamomi*, the following Mexican genotypes: Atlixco, Tepeyanco, and Tepetl along with the commercial rootstock Thomas and Duke-7 were inoculated with 250 ml/plant with a mycelial suspension of *P. cinnamomi* at (17 and 28 °C). The substrate used for planting was a mixture of peat moss™, agricultural soil, and agrolite™ (2:2:1), all previously sterilized. During the experiment, soil humidity was 90%. Later, a histopathological study was done by selecting roots from wilting, dead, and asymptomatic plants for histopathological cuts. Atlixco and Tepeyanco are genotypes considered with promising resistance since they consistently showed more than 90% asymptomatic plants at both temperatures. On the other hand, Thomas, Duke-7, and

Tepetl rootstock showed an intermediate resistance. In the histopathological results, the mycelia content in the plant xylem of dead Duke-7, Thomas, and Tepetl plants, previously kept at 17 °C showed no significant differences; however, at 28 °C, the mycelia content in Duke-7 was significant. In wilting plants, the presence of mycelia in Tepetl was abundant at 17 °C, and therefore it is considered susceptible to the pathogen. At 28 °C, the Tepetl and Atlixco genotypes showed a low mycelia content, and therefore are considered as resistant-tolerant. In wilting and asymptomatic plants, tylose formation and the association of phenol compounds contributed to the defense against the oomycete. The Tepeyanco, Atlixco, and Tepetl genotypes showed resistance by opportunely activating their defense mechanisms. In the resistance test with plantlets, the Atlixco, Tepeyanco, Tepetl, Toliman, Colin V-33 segregate and Thomas genotypes were inoculated with a virulent isolation of *P. cinnamomi*. When the avocado genotypes are inoculated at an early age (5 cm height), it is possible to detect resistance to the oomycete in the evaluated avocado genotypes. The Atlixco population is an important source of resistance given that it has the greatest number of new asymptomatic shoots and plantlets, even in advanced growth stages (15 to 20 cm height). The Toliman, Tepetl and Thomas genotypes at the juvenile stage are considered as susceptible. With the results obtained on the formation of new shoots after inoculation, the Atlixco and Tepeyanco genotypes are considered as promising with regard to resistance both to wilting of the orchard and the canker caused by *P. cinnamomi*.

Keywords: *P. cinnamomi*, *Persea americana* Mill, root rot, canker, defense mechanisms, tyloses, phenols.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación, número de beca: 1084024.

Al Colegio de Postgraduados por el financiamiento otorgado para el establecimiento y operación de los fondos para la investigación científica y desarrollo tecnológico del centro público Colegio de Postgraduados, a través del Fideicomiso número: 167304.

A la Fundación Salvador Sánchez Colín, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México S.C. (CICTAMEX) por las facilidades brindadas durante el desarrollo de la de investigación.

Al Dr. Carlos De León, con profunda gratitud por su dirección en esta investigación, por brindarme la libertad para desarrollarme como estudiante fuera y dentro del Colegio de Postgraduados.

A mis asesores: Dra. Ma. de la Cruz Espíndola-Barquera, Dr. Dionicio Alvarado-Rosales, Dr. Alfredo López-Jiménez, Dr. Roberto García-Espinosa y Dr. Eduardo Molina-Gayosso, por contribuir en mi formación profesional.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce por sus aportaciones en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al M en C. Jorge Valdés Carrasco por su colaboración en la ilustración de este trabajo de investigación.

Al Dr. Eduardo Molina Gayosso por todas las charlas prolongadas que contribuyeron a mi profesión, porque cuando dudaba durante este trayecto me cuestionabas y guiabas filosóficamente en el fascinante mundo de la ciencia y de la vida, gracias por tus críticas de retroalimentación y por la confianza que difundiste en mi.

A la Dra. Hilda Silva Rojas por su apoyo incondicional y por sus consejos para desarrollarme en el mundo de la ciencia.

Al Dr. Roney Solano Vidal, agradezco todos sus consejos para superar los retos de profesionales.

A la Dra. María del Pilar Rodríguez G. por escuchar mis ideas y compartirme sus valiosas experiencias.

A la Dra. María de Jesús Yáñez M. por contribuir en mi formación profesional y facilitarme en todo momento información valiosa, del fascinante mundo de los hongos fitopatógenos.

Al M en C. Hebert Jair Barrales Cureño por tus sugerencias y apoyo.

Dr. José Alberto Urrieta V. por sus acertadas sugerencias en los análisis estadísticos.

A mis amigos: Juliana, Citlaly, Alfricia, Santa, Claudia, Catalina, Isabel, Mary G., Dolores, Ninfa, Eduardo, José A., Jorge, Manuel, Ernesto, Benjamín, Filo, Lupita, Susi y a la hermosa niña Araceli Urrieta, por su apoyo y por brindar a mi vida momentos de felicidad.

Al señor Roberto Romero por su amistad y apoyo en el laboratorio, también a su esposa Rosi por su ánimo en esos momentos difíciles.

A los señores: Hugo, Ángel, Ricardo, Magdaleno, Hugo, Mario y Juanito, gracias por su amistad y apoyo.

A todos aquellos que sin querer he omitido.

Dedicatorias

A Dios por permitirme existir y darme fortaleza para levantarme y seguir.

A mis padres

Alfonso Andrade Castillo, por tu apoyo incondicional.

Con especial amor a **Juana Hoyos Secundino**[†]

Gracias por hacerme el ser humano que hoy soy, gracias por compartir todas las aventuras y muchas que quizás no pudiste compartirme.

A mi tía Elfega HS.[†] por el gran amor de madre, gracias.

Amiga mía Angélica Ordoñez Xahuentla[†], donde te encuentres, gracias por compartir tus grandes sueños y por tu ayuda en momentos tan difíciles de mi vida.

Al Dr. Roberto García Espinosa[†], infinitamente gracias, por compartirme su filosofía en “la trama de la vida” y por enseñarme que “todo camino debe tener corazón”.

A mis hermanos: Judith, Juanita, Alfonso, Rosita y David, con gratitud por su amor y apoyo incondicional, son motivo para alcanzar todas mis metas.

A mis sobrinos: Juno, Haziél y Martín.

A [†]Alberto PL. por tu paciencia, amor, espera y apoyo incondicional.

A la Fortaleza de Dios y la Maravilla de Vivir...

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	iii
CONTENIDO.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	16
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos	22
REVISIÓN DE LITERATURA	23
Centro de origen del aguacate.....	23
Importancia económica del aguacate.....	24
Importancia económica de <i>P. cinnamomi</i>	25
Características morfológicas de <i>P. cinnamomi</i>	26
Sintomatología	29
Mecanismos de defensa de la planta al ataque del patógeno	31
¿Tolerancia o resistencia?	33
Portainjertos de aguacate resistentes a <i>P. cinnamomi</i>	34
LITERATURA CITADA.....	38
CAPITULO I. Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a <i>P. cinnamomi</i> Rands. usando temperaturas controladas.....	43
1.1. RESUMEN	43
1.2. ABSTRACT	44
1.3. INTRODUCCIÓN	45
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1.4.1. Recolección del material vegetal.....	47
1.4.2. Recolección de raíces con síntomas para aislamiento de <i>P. cinnamomi</i>	47

1.4.3. Medición del crecimiento radial del micelio en función de diferentes temperaturas	48
1.4.4. Incremento de inóculo	48
1.4.5. Selección de portainjertos tolerantes-resistentes a <i>P. cinnamomi</i> en dos temperaturas	49
1.4.6. Pruebas de patogenicidad	50
1.4.7. Caracterización morfológica y molecular	50
1.4.8. Análisis de datos	51
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
1.5.1. Crecimiento micelial radial <i>in vitro</i> de <i>P. cinnamomi</i> a diferentes temperaturas	51
1.5.2. Prueba de patogenicidad	54
1.5.3. Descripción morfológica.....	54
1.5.4. Mortalidad de genotipos	55
1.5.5. Genotipos con síntomas de marchitamiento.....	56
1.5.6. Genotipos asintomáticos	57
1.6. CONCLUSIONES	59
1.7. LITERATURA CITADA	60
CAPITULO II. Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante <i>P. cinnamomi</i>.....	63
2.1. RESUMEN.....	63
2.2. ABSTRACT	64
2.3. INTRODUCCIÓN	65
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
2.4.1. Muestreo de raíces y preparación de las muestras histopatológicas	67
2.4.2. Tinción safranina-verde rápido	68
2.4.3. Evaluación de variables histológicas.....	68
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
2.5.1. Presencia de micelio en genotipos muertos	70
2.5.2. Presencia de micelio en genotipos con síntomas de marchitez	70

2.5.3. Presencia de micelio en genotipos asintomáticos.....	73
2.5.4. Presencia de tilosas en genotipos muertos	75
2.5.5. Presencia de tilosas en genotipos con síntomas de marchitez.....	76
2.5.6. Presencia de tilosas en genotipos asintomáticos.....	76
2.5.7. Compuestos fenólicos en genotipos muertos	77
2.5.8. Compuestos fenólicos en genotipos con síntomas de marchitez	79
2.5.9. Compuestos fenólicos en genotipos asintomáticos.....	79
2.6. CONCLUSIONES	81
2.7. LITERATURA CITADA	82
CAPITULO III. Totipotencialidad en plántulas de aguacate en la resistencia a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	86
3.1. RESUMEN.....	86
CHAPTER III. Totipotency in avocado seedling in the resistance to <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	87
3.2. ABSTRACT	87
3.3. INTRODUCCIÓN	88
3.4. MATERIALES Y METODOS.....	90
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
3.6. CONCLUSIONES	105
3.7. LITERATURA CITADA.....	106

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

Cuadro 1. Incidencia causada por <i>P. cinnamomi</i> a dos temperaturas en la selección para resistencia de portainjertos de aguacate.....	57
--	----

CAPITULO II

Cuadro 1. Presencia de micelio de <i>P. cinnamomi</i> en raíces de genotipos de aguacate muertos, con síntomas de marchitez y asintomáticos a dos temperaturas.....	72
---	----

Cuadro 2. Presencia de tilosas en el xilema de genotipos de aguacate muertos, con marchitez y asintomáticos cultivados a dos temperaturas.....	75
--	----

Cuadro 3. Presencia de compuestos fenólicos en células radicales de genotipos de aguacate muertos, con marchitez y asintomáticos inoculados con <i>Phytophthora cinnamomi</i> a dos temperaturas.....	78
---	----

CAPITULO III

Cuadro 1. Ensayo 1. Sintomatología en plántulas de aguacate con 5 cm de altura inoculadas con <i>P. cinnamomi</i> para seleccionar resistencia.....	94
---	----

Cuadro 2. Ensayo 1. Sintomatología en plántulas de aguacate con 15 a 20 cm de altura inoculadas con <i>P. cinnamomi</i> para seleccionar resistencia.....	97
---	----

Cuadro 3. Ensayo 1. Inoculación de plántulas de aguacate de 5 cm de altura para inducir la totipotencialidad.....	98.
---	-----

Cuadro 4. Ensayo 1. Reinoculación de plántulas a 15 a 20 cm de altura para estimular la totipotencialidad.....	101
--	-----

Cuadro 5. Ensayo 2. Sintomatología en plántulas de aguacate de 5 cm de altura para resistencia a <i>P. cinnamomi</i>	103
--	-----

Cuadro 6. Ensayo 2. Inoculación de plantas de aguacate con 5 cm de altura para estimular la totipotencialidad.....	104
--	-----

LISTA DE FIGURAS

REVISIÓN DE LITERATURA

- Figura 1. Ciclo de infección de *Phytophthora cinnamomi* en raíces de aguacate. Tomado de Andrade *et al.* (2012)..... 28
- Figura 2. Microfotografía (40X) tubo germinativo de una zoospora enquistada de *P. cinnamomi* penetrando en una célula de raíz en aguacate, g) tubo germinativo y h) célula del hospedante..... 29
- Figura 3. Sintomatología por *P. cinnamomi* A) pudrición de raíces, B) cancro del tallo en plántula, C) exudaciones acuosas y D) cancro del tronco de aguacate..... 30
- Figura 4. Formación de tilosas como mecanismos de defensa a *P. cinnamomi* en portainjerto de aguacate..... 32
- Figura 5. Cortes longitudinales de raíz de plantas de aguacate previamente inoculadas con *P. cinnamomi* con acumulación de polifenoles (en color rojo)..... 33

CAPITULO I

- Figura 1. Crecimiento de *P. cinnamomi* en medio líquido jugo-V8..... 48
- Figura 2. crecimiento micelial radial de *P. cinnamomi* en temperaturas de 17, 28 y 34 °C..... 53
- Figura 3. *P. cinnamomi* A) germinación de clamidosporas, B) clamidosporas, C) esporangios y D) hinchamientos hifales..... 54

CAPITULO II

- Figura 1. Micrografías de corte longitudinal de raíz tomadas a 40X con microscopio de luz. Las flechas indican: A) Genotipo de Atlixco, raza Mexicana, con crecimiento del micelio intercelular, B) Genotipo de Tepeyanco, raza Mexicana, con micelio intracelular, C) Portainjerto Thomas asintomático a 28 °C con presencia de tilosas maduras, D) Genotipo de Atlixco asintomático a 28 °C con presencia de tilosas inmaduras..... 74

CAPITULO III

Figura 1. Cultivo del aislamiento CPO-PCU de <i>P. cinnamomi</i> en medio líquido jugo-V8®	91
Figura 2. A) Cancro en plántulas de aguacate causado por <i>P. cinnamomi</i> (inoculadas de 15 a 20 de altura), B) exudaciones acuosas, C) Cancro con coloraciones de café claro a oscuras D) plántulas con necrosis y constricción del tallo (inoculadas a 5 cm de altura).....	96
Figura 3. Totipotencialidad en plántulas de Atlixco y Tepeyanco con 5 cm de altura, 10 días después de la inoculación con <i>P. cinnamomi</i>.....	100

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio selectivo PARPH V8-agar.....	109
Anexo 2. Características de siembra de aguacate y requerimientos del crecimiento de <i>P. cinnamomi</i>.....	109
Anexo 3. Características morfológicas de <i>P. cinnamomi</i>.....	110
Anexo 4. Preparación de colorantes para tinción histopatológica de raíces de aguacate: safranina en metil celosolve.....	110
Anexo 5. Preparación de colorantes para tinción histopatológica de raíces de aguacate: Verde rápido en metil-celosolve.....	110

INTRODUCCIÓN GENERAL

México ocupa el primer lugar en producción y exportación de aguacate a nivel mundial. En el 2010, se obtuvo una producción de 1 107, 140 toneladas seguido por Chile, Republica Dominicana, Indonesia, Colombia y Perú (FAOSTAT 2012). Entre los problemas que afectan la producción de aguacate destacan la pudrición de raíces y el cancro del tronco causado por *Phytophthora cinnamomi* Rands.

P. cinnamomi es un patógeno que infecta la raíz, que puede atacar a más de 1000 especies de plantas causando la enfermedad de marchitez. Este oomicete, presente en el suelo, es el más estudiado en California, Hawaii, regiones tropicales de América, Islas Canarias España, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, que se caracteriza por causar la muerte súbita de los árboles de castaño, abeto, roble, aguacate, encino, piña y plantas de ecosistemas naturales (Zentmyer *et al.* 1961, Kliejunas *et al.* 1976, Zentmyer 1985, Brasier *et al.* 1993, Hernández 1999, Alvarado *et al.* 2008 y Pegg *et al.* 2008).

En México, la tristeza del aguacatero causada por *P. cinnamomi* es considerada una de las enfermedades más importante y devastadora. Este patógeno presente en el suelo provocó la desaparición de regiones aguacateras como la de Querétaro (Téliz *et al.* 1989). Para 1994, la tristeza del aguacatero ya había causado la declinación de 100 mil árboles en Michoacán (Vidales *et al.* 1994). Actualmente,

este oomicete se encuentra en toda la franja aguacatera de Michoacán, Puebla, Morelos, Nayarit y Veracruz (Téliz *et al.* 2007).

Este oomicete causa diferentes tipos de lesiones y puede también atacar diferentes partes en algunos hospedantes. En aguacate, este patógeno invade el tronco, causando el cáncer o cancro del tronco, como el que ocasionalmente se desarrolla en California. Sin embargo, se ha encontrado que algunos patrones con resistencia a la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi* son susceptibles al cancro del tronco causada por *P. citrícola*. Por otra parte, en México, según Ceja *et al.* (2000) el cancro del tronco lo atribuyen a *P. heveae*, *P. cinnamomi* y *P. parasítica*. Hasta la fecha, según lo reportado por Pegg *et al.* (2008), sólo han encontrado a *P. cinnamomi* como responsable del cancro en Nueva Zelanda y Australia, pero Zentmyer (1980) menciona que el cancro del aguacate es causado por *P. cinnamomi* Rands y es más común en los trópicos de América.

Uno de los enfoques más significativos y potencialmente eficaces para el control de los patógenos del suelo es el uso de la resistencia genética. Esto es especialmente cierto, sobre todo en la búsqueda de resistencia para la obtención de portainjertos de aguacate (Zentmyer 1980). La utilización y el origen de portainjertos de aguacate no tuvieron mayor importancia, ya que los viveristas buscaban cualquier tipo de semilla disponible. En Michoacán, los portainjertos se encuentran disponibles a partir de semilla de árboles fuertes y sanos. A inicios de 1940, en California, EEUU., se descubrió que *P. cinnamomi* causaba pudrición de las raíces del aguacate,

estimulando así la búsqueda de portainjertos tolerantes al patógeno (Zentmyer 1961 y Pegg *et al.* 2008). En 1952, Zentmyer, visitó diferentes áreas en México y el Caribe en búsqueda de patrones de aguacate resistentes a la pudrición de raíces originada por *P. cinnamomi*. El Dr. J. Galindo, fitopatólogo del Colegio de Postgraduados de México, colaboró especialmente en la colecta realizada en Atlixco, Puebla. Los materiales colectados se sembraron en campos experimentales de California EEUU., y estas colecciones de semillas y esquejes presentaron cierto nivel de tolerancia encontrándose árboles con características similares al portainjerto Duke, un genotipo llevado como semilla a California. Desde 1977, Duke-7 se propaga vegetativamente para mantener su nivel de resistencia en regiones aguacateras de California. Originalmente, este portainjerto fue seleccionado en condiciones ambientales de California (Zentmyer 1961 y Kremer *et al.* 2007). Actualmente, este portainjerto es distribuido comercialmente en regiones aguacateras del continente Europeo pero ha declinado en su resistencia al oomicete debido a su inadaptabilidad en la interacción genotipo-ambiente y a la presión de inóculo de *P. cinnamomi* (Kremer *et al.* 2007).

Por tal motivo, en los últimos años se han realizado investigaciones en la identificación y desarrollo de nuevos patrones resistentes particularmente en California, Sudáfrica, Israel y las Islas Canarias. En los 80's inició el programa de manejo integrado del aguacate dirigido por el Colegio de Postgraduados, Méx., desafortunadamente este programa finalizó en 1997. Posteriormente, el Dr. Samuel Salazar (investigador del INIFAP) continuó evaluando los genotipos de aguacate para tolerancia a estrés biótico y abiótico (Bellon *et al.* 2009).

La elección de un portainjerto resistente a la pudrición de raíz causada por *P. cinnamomi* se ha realizado sin alcanzar pleno éxito, por lo que debe ser una prioridad para el manejo integrado de éste patógeno. Pero las actividades que se realizan para el control de la enfermedad indican que México no está suficientemente preparado en esta línea de investigación para hacer frente a la tristeza del aguacatero. En últimas fechas, las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de resistencia genética, aún cuando la mayoría se enfocan al mejoramiento de la productividad y características agronómicas para cubrir la demanda que exige el mercado. Sin embargo, desde el punto de vista de portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* existe preocupación por la falta de resultados contundentes que hagan frente a la enfermedad de la pudrición de la raíz del aguacate.

La mayoría de los árboles de aguacate en México están injertados sobre portainjertos de semilla procedente de árboles de polinización libre cubriendo una superficie aproximada de 123 000 403 ha en donde los viveristas colectan y siembran las semillas para portainjertos. Actualmente, en las plantaciones sólo se utiliza la raza Mexicana, debido a que los híbridos considerados como resistentes a *P. cinnamomi* no se adaptan a las condiciones edáficas y climáticas de la franja aguacatera de México (Newett *et al.* 2002, Salazar *et al.* 2004 y Bellon *et al.* 2009) lo que sugiere una variación genética significativa en los huertos. A partir de esta variabilidad genética se puede encontrar resistencia al oomicete para sustituir el portainjertos de semilla a portainjertos clonados y superar el problema de la variabilidad genética.

Así, la presente investigación se encaminó a la selección de portainjertos de aguacate de raza Mexicana procedentes de semillas para tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi*. Para la identificación de portainjertos promisorios se evaluaron dos métodos de selección en plantas de 1 a 2 años de edad, seleccionados en condiciones de presión de inóculo y usando temperaturas controladas. Otro método de selección para resistencia a *P. cinnamomi* se realizó en plántulas de aguacate de 5 cm y 15 a 20 cm de altura inoculadas bajo presión de inóculo.

Es importante señalar que ante el ataque de este patógeno se muestran mecanismos de respuesta que desarrolla la planta para resistir a la invasión sistémica. El estudio de la resistencia en plantas a enfermedades con origen en el suelo, frecuentemente se evalúa a nivel macroscópico, seleccionando plantas con apariencia sana o sobrevivientes a la presión de inóculo sin considerar los mecanismos de resistencia histológica ante un patógeno.

En el caso de las enfermedades vasculares, las plantas reaccionan en presencia de los patógenos produciendo estructuras y sustancias químicas que interfieren en el desarrollo del mismo. Los factores de resistencia estructural son inducidos para formar barreras y limitar al patógeno en una región del xilema por medio de estructuras conocidas como tilosas, las cuales tienen la finalidad de evitar el crecimiento del patógeno dentro del tejido de la raíz. De igual manera, dentro de estos mecanismos de defensa, se producen compuestos fenólicos alrededor de las células los cuales actúan de forma pasiva reforzando la pared celular e inhibiendo el

crecimiento de hifas (Nyerges *et al.* 1975, Scalbert 1991, Schlosser 1994 y Vleeshouwers *et al.* 2000). En este estudio, la selección de portainjertos tolerantes-resistentes a la pudrición de raíz y la relación con el estudio de mecanismos de defensa histológica a *P. cinnamomi* se han considerado como una prioridad en la selección de portainjertos tolerantes-resistentes a la marchitez del aguacate.

OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar portainjertos de aguacate procedentes de semillas raza Mexicana para tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* en condiciones de presión de inóculo y temperaturas controladas.

Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento micelial radial de *P. cinnamomi in vitro* en 3 temperaturas para determinar el mejor crecimiento del patógeno y asegurar la infección de raíces.
2. Identificar la presencia de micelio de *P. cinnamomi* en el xilema de la raíz y la importancia de la implicación de tilosas y depósito de fenoles como mecanismos de defensa histológica en portainjertos de aguacate.
3. Seleccionar para resistencia en plántulas inoculadas de 5 cm y 15 a 20 cm de altura, con el propósito de observar los mecanismos de defensa en plántula en la obtención de portainjertos resistentes a *P. cinnamomi*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Centro de origen del aguacate

El centro de origen del aguacate es América. Su nombre etimológico deriva del náhuatl Ahuaca Cuahuitl: ahuatl (testículo) y cuahuitl (árbol) “árbol de testículos”. El subgénero *Persea* predomina desde la parte central de México, Guatemala y hasta Centroamérica. Estudios arqueológicos indican haber encontrado fósiles de semilla en el Valle de Tehuacán en la cueva de Coxcatlán, Pue., en donde el aguacate era consumido por los nativos desde 10 000 a. C. Su cultivo se inició posiblemente hace 6 000 años (Storey *et al.* 1986, Schieber *et al.* 1992, Smith 1996 y Sánchez 1999).

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

En el Códice Florentino escrito por Sahagún (1549), citado por Garibay en 1979, se mencionan tres tipos de aguacate *aoacatl*, *tlacacoloacatl* y *quiloacatl*, los que de acuerdo con sus descripciones posiblemente representaban las tres razas

mencionadas anteriormente, cada una con características morfológicas y fisiológicas diferentes (Barrientos *et al.* 2000).

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

Importancia económica del aguacate

Entre los frutales de importancia económica en México, el aguacate (*Persea americana*) ocupa el primer lugar de producción y exportación a nivel mundial con una superficie sembrada de 123 000 403 ha en 28 estados del país, siendo el principal exportador de aguacate en el mundo al aportar 35.9% del volumen mundial. En la actualidad Estados Unidos es el principal consumidor de aguacate mexicano, en donde aproximadamente 75% de las importaciones de este fruto provienen de México. Las exportaciones totales del país son de aproximadamente del 60%, México es altamente competitivo en las exportaciones y esta tendencia parece sostenerse en los próximos años (FAOSTAT 2012).

La apertura del mercado estadounidense al aguacate mexicano ha permitido incrementar las exportaciones con los beneficios económicos que trae respecto al fortalecimiento de la generación de empleos, así como la baja proporción de

producción destinada a exportación indica que existe potencial para incursionar en diferentes mercados. Además de fortalecer la presencia en el mercado estadounidense, es importante fortalecer la presencia en los mercados europeos, lo cual permitiría diversificar el riesgo económico que surge de concentrar la producción en un sólo mercado (Torres 2009).

Importancia económica de *P. cinnamomi*

La incidencia de la marchitez del aguacate causada por *Phytophthora cinnamomi* se describió por primera vez en 1927, en Puerto Rico. Actualmente, este pseudohongo se puede encontrar como agente causal de la pudrición de las raíces del aguacate en casi todas las áreas aguacateras del mundo incluyendo Australia, Nueva Zelanda, África, Israel, España, Marruecos, Estados Unidos, México, así como, varios países de América y el Caribe donde se cultiva este frutal (Zentmyer 1980, Zentmyer 1985, Erwin *et al.* 1996 y Pegg *et al.* 2008).

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

Características morfológicas de *P. cinnamomi*

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

Reino: *Chromista*

Phylum: *Oomycota*

Clase: *Oomycetes*

Orden: *Peronosporales*

Familia: *Peronosporaceae*

Género: *Phytophthora*

Especie: *cinnamomi*

El estado sexual de *P. cinnamomi* se forma cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se aparean. Estos se producen en medio agar-jugoV8[®] pero no en agar-lima. 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 de 35 µm.

El retrocruzamiento de los dos tipos de compatibilidad produce micelio que se caracteriza por tener abundantes hinchamientos hifales o vesículas hinchadas. La temperatura máxima de crecimiento colonial es cerca de 33°C (Erwin *et al.* 1996 y Gallegly *et al.* 2008). 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 85X35 µm, que se forman en extractos de suelo no esterilizado. Los dos caracteres de diagnóstico de los estados asexuales son la abundancia de hifas coraloides y los agrupamientos en forma de racimos de clamidosporas.

Las clamidosporas son las estructuras reproductivas asexuales de *P. cinnamomi*, que se pueden distinguir de hinchamientos hifales por presentar estructuras esféricas con paredes delgadas o gruesas. Éstas son estructuras latentes que aseguran la sobrevivencia de este oomicete.

Ciclo biológico de *P. cinnamomi*

La pudrición de raíces por *Phytophthora cinnamomi* es una enfermedad importante porque sobrevive por varios años en raíces y suelo en forma de clamidosporas, aún en ausencia de plantas hospedantes. La autoinfección de las raíces es un sistema dinámico cuando la temperatura en el suelo se incrementa de 24 a 28 °C y existe humedad excesiva por efectos de riegos pesados, lluvia abundante, inundación o cuando hay mal drenaje. Las clamidosporas germinan y dan origen a hifas del hongo que se conoce como micelio, reiniciando el ciclo de infección. El micelio origina clamidosporas y otras estructuras especializadas (esporangios) que contienen zoosporas (Figura 1).

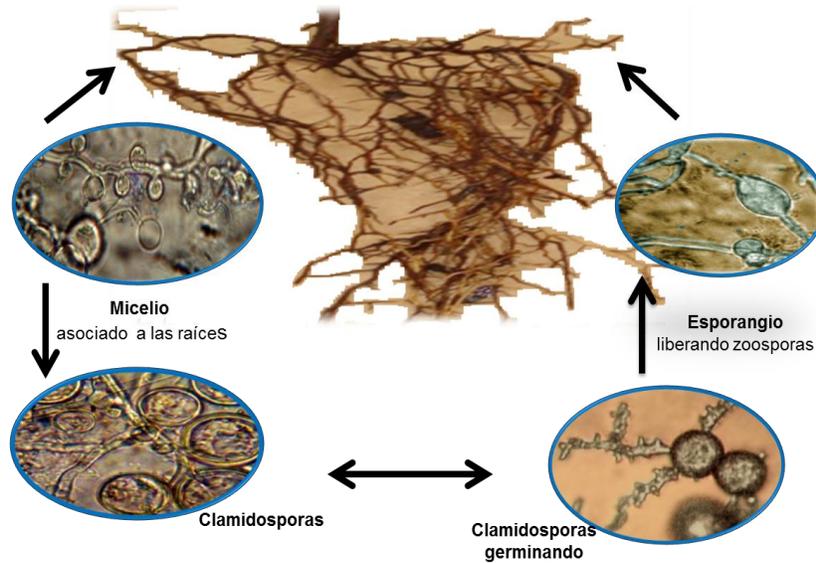


Figura 1. Ciclo de infección de *Phytophthora cinnamomi* en raíces de aguacate. Tomado de Andrade *et al.* (2012).

Las zoosporas son las estructuras que constituyen el inóculo primario y secundario del hongo, causando nuevas infecciones de las raíces. Estas zoosporas tienen movimiento propio y se desplazan con agilidad sobre la superficie del agua, pueden nadar cortas distancias en el suelo con alta humedad, se pueden transportar a grandes distancias en el agua de riego o por las lluvias. Además, esta forma de dispersión le permite llegar a las raíces jóvenes enquistándose (Figura 2) en minutos y horas. El avance de la infección pudre gran volumen de raíces y las plantas desarrollan los síntomas de la enfermedad conocida en México como la tristeza del aguacatero que cuando logra infectar la base del tronco el árbol de aguacate desarrolla la enfermedad del cancro (Zentmyer 1980, Coffey 1991 y Téliz *et al.* 2007).

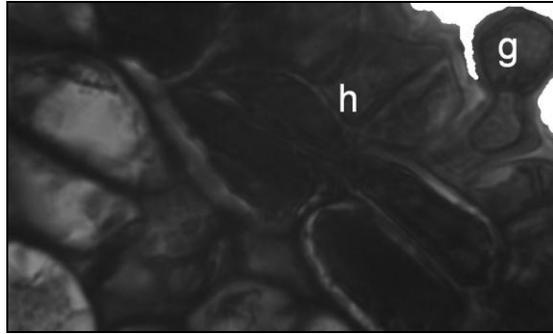


Figura 2. Microfotografía (40X) tubo germinativo de una zoospora enquistada de *P. cinnamomi* penetrando en una célula de raíz en aguacate, **g)** tubo germinativo y **h)** célula del hospedante.

Sintomatología

P. cinnamomi causa varios tipos de lesiones en diferentes hospedantes y también puede llegar a invadir más de una parte del mismo hospedante. En aguacate, primero invade las raíces absorbentes (1 a 3 mm de diámetro), provocando pudrición de color marrón a negro, con poca progresión en raíces más desarrolladas. Por lo que el primer síndrome en árboles infectados es un marchitamiento de la planta por pudrición de las raíces conocida como la tristeza del aguacatero (Zentmyer 1985), debido a que disminuye la absorción de agua y nutrientes, induciendo también clorosis general, que finalmente causa la defoliación. Estos síntomas se presentan en cualquier etapa biológica de la planta. Al perder la vigorosidad el árbol infectado produce gran cantidad de frutos pequeños que son generalmente abortados antes de su madurez y finalmente el árbol muere (Zentmyer 1985 y Téliz *et al.* 2007).



Figura 3. Sintomatología por *P. cinnamomi* **A)** pudrición de raíces, **B)** cancro del tallo en plántula, **C)** exudaciones acuosas y **D)** cancro del tronco de aguacate.

Este patógeno también invade la base del tronco y se desarrollan síntomas de cancro del tronco que llega a alcanzar de uno a dos metros de altura y que se caracteriza por presentar coloraciones de café claro a oscuras debajo de la corteza y exudaciones acuosas acompañadas en algunas ocasiones de gomosis (Figura 3 A, B, C y D) y polvo blanco en la superficie del tronco. En plántulas de aguacate, *P. cinnamomi* produce necrosis y constricción del tallo (Zentmyer 1980, Ceja *et al.* 2000). En 1959, se observaron por primera vez en California, síntomas de cancro en árboles de macadamia y aguacate. En 1960 se comprobó que el agente causal del cancro en estos árboles era ocasionado por *P. cinnamomi* (Zentmyer *et al.* 1961 y Zentmyer 1980). Huguenin *et al.* (1975) reportaron grandes pérdidas a causa del cancro del tronco en Camerún. En Michoacán, Méx. Ceja *et al.* (2000) reportaron la incidencia de cancro en aguacate de 1 a 90%. Cuando *P. cinnamomi* infecta la base del tronco generalmente los síntomas alcanzan hasta un metro de altura y finalmente el árbol muere (Vidales 1994).

Mecanismos de defensa de la planta al ataque del patógeno

Para contrarrestar el ataque de organismos patogénicos, las plantas cuentan con una amplia gama de respuestas de defensa. Las plantas están expuestas a un gran número de microorganismos patogénicos que pueden causar enfermedades e incluso la muerte del hospedante. En respuesta a la inducción del desarrollo de la enfermedad, la planta activa sus mecanismos de defensa contra el ataque del patógeno (Niks *et al.* 2004 y Glazebrook 2005).

Los mecanismos de defensa en las plantas pueden dividirse en dos grupos: defensa pasiva que son preformados o constitutivos, y la defensa activa que son inducidas. Estos dos grupos se subdividen en defensas físicas o estructurales y defensas químicas preformadas (Tierens *et al.* 2001 y Madriz 2002).

Las plantas pueden poseer mecanismos de defensas pasivas que se encuentran presentes en la planta independientemente si es atacada o no por un patógeno. Como mecanismo de defensa pasiva se incluyen las barreras estructurales que poseen las plantas, y que constituyen un obstáculo al ingreso del patógeno. Las plantas pueden presentar una defensa pasiva o preformada si está determinada por propiedades ya existentes antes del intento de infección del patógeno (Tierens *et al.* 2001, Madriz 2002 y Vivanco *et al.* 2005).

Algunas de las estructuras de defensa pasivas preformadas incluyen a los tejidos que impiden el avance del patógeno, limitando su invasión ya sea formando

capas de corcho, geles, tilosas (Figura 4) o células lignificadas que limitan el punto de infección. El éxito de este mecanismo dependerá de la velocidad de formación (Ouellette *et al.* 1992).

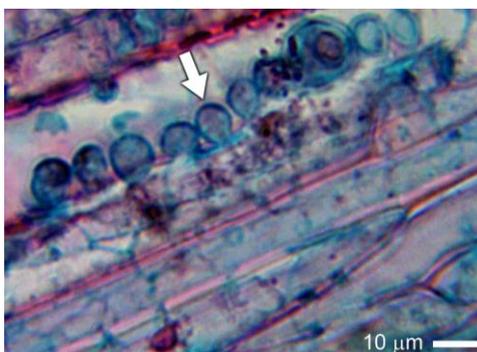


Figura 4. Formación de tilosas como mecanismos de defensa a *P. cinnamomi* en portainjerto de aguacate.

Estas estructuras, llamadas tilosas, se producen en respuesta a la infección en tejidos vasculares donde ocurre un sobre crecimiento de los cloroplastos de las células parenquimatosas adyacentes que en la mayoría de las plantas se prolongan dentro de los vasos del xilema, evitando el avance del patógeno (Cruz *et al.* 2006, Ouellette *et al.* 1992 y Agrios 2010).

Dentro de estos mecanismos de defensa también se encuentran a las barreras bioquímicas preformadas, los compuestos fenólicos, se producen alrededor de las células, estos compuestos preformados actúan de forma pasiva intracelular o extracelularmente reforzando la pared celular e inhibiendo el crecimiento de hifas de hongos invasores (Figura 5). Estos compuestos son conocidos como fitoalexinas (Nyerges *et al.* 1975, Scalbert 1991, Schlosser 1994 y Vleeshouwers *et al.* 2000).

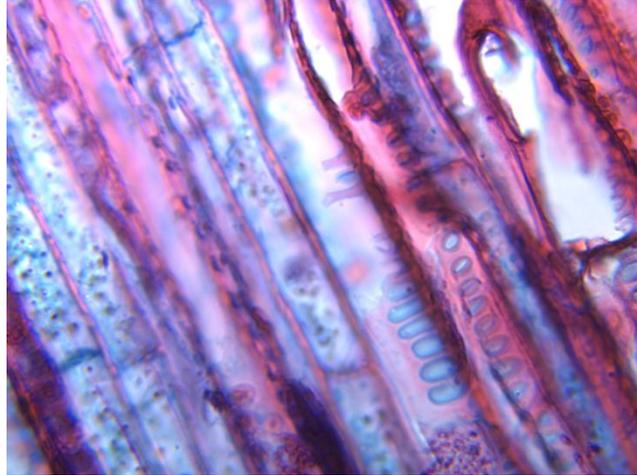


Figura 5. Cortes longitudinales de raíz de plantas de aguacate previamente inoculadas con *P. cinnamomi* con acumulación de polifenoles (en color rojo).

En vid, estas fitoalexinas son compuestos fenólicos que incluyen a taninos, ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos, actúan como resistencia pasiva. Muchos compuestos fenólicos inhiben el desarrollo de las hifas de los hongos (Nyerges 1975 y Schlosser 1994).

¿Tolerancia o resistencia?

A menudo hay confusión acerca de los términos de la tolerancia y la resistencia con respecto a enfermedades de las plantas. Sin embargo, algunos autores prefieren utilizar el término de resistencia en lugar de tolerancia.

La tolerancia se refiere a la capacidad del árbol para seguir creciendo y producir a pesar de un cierto nivel de infección por el patógeno. En otras palabras, el patógeno puede continuar desarrollándose y el hospedante no restringe las

consecuencias dañinas de la infección y el árbol se mantiene productivo. La tolerancia reduce la cantidad de daño, así que la presencia de un patógeno sobre una planta tolerante conlleva a menos daño (Niks *et al.* 2004 y Pegg *et al.* 2008).

La resistencia es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y/o desarrollo del parásito después de que éste ha iniciado o establecido el contacto íntimo (Niks *et al.* 2004, Agrios 2010). Pegg *et al.* (2008) aluden que la resistencia se produce a través del mecanismo de defensa activa del árbol, lo que restringe al patógeno por la inhibición de la infección, colonización o capacidad de reproducción (por ejemplo, la producción de clamidosporas o crecimiento de micelio). Árboles o plantas resistentes a la infección reducen la invasión del patógeno, por tanto, la infección es menos severa.

Portainjertos de aguacate resistentes a *P. cinnamomi*

Menge (1994) sugiere que a largo plazo el uso de portainjertos resistentes tiene posibilidad de éxito en el control de la tristeza del aguacate. Existen programas de selección en todo el mundo identificando patrones con un alto grado de tolerancia a *P. cinnamomi*. Pero para poder utilizar estos portainjertos resistentes, deben ser propagados clonalmente a fin de que todos tengan la misma identidad genética, que se traduce en resistencia a *P. cinnamomi*.

Durante la década de 1940, en California, EEUU., se descubrió que *P. cinnamomi* causaba pudrición de las raíces del aguacate, propiciando la búsqueda de portainjertos tolerantes al patógeno. Por tal motivo, el Dr. George Zentmyer de la Universidad de California en Riverside comenzó a seleccionar portainjertos y a realizar pruebas de resistencia a pudrición de la raíz en el año de 1952. Gracias a la colaboración del Dr. Jorge Galindo del Colegio de Postgraduados, México, se hicieron colecciones de aguacate cerca de Atlixco, Pue. Estas colecciones de semillas y esquejes presentaban cierto nivel de tolerancia y se encontraban en árboles con características similares al genotipo Duke (Zentmyer 1961). Esto incluyó material de las tierras nativas de aguacate en América Central donde supuestamente *P. cinnamomi* no se encontraba presente. Zentmyer encontró la presencia de resistencia de leve a moderada en el cultivar mexicano Duke, que fue introducido como semilla a California, EEUU., en 1912. Las plantas de semillero, tales como Duke-7, se han propagado por estacas para preservar su nivel de resistencia a *Phytophthora*. Los portainjertos clonales se han probado en California, EEUU., desde 1977 (Pegg *et al.* 2008). La Universidad de California en los Ángeles y Riverside culminaron varios trabajos relacionados con la compatibilidad vegetativa con el aguacate y la resistencia a *P. cinnamomi*, Así como, el reportar la tolerancia del portainjerto Duke-7. Existen varios portainjertos promisorios tolerantes al oomicete entre los que se encuentran Thomas, P1, Toro Canyon, D9, Barr Duke, G61, P, P3, P6, G 1008, Duke S, Duke Grace, G22 y Parida. Después de la jubilación del Dr. Zentmyer, se liberó el portainjerto G55, más tarde nombrado Martín Grande (Téliz *et al.* 2007).

En 1975, Duke-7 se convirtió en el primer portainjerto de éxito comercial tolerante a *Phytophthora*. Desde entonces, por selección y mejora se ha obtenido un gran número de variedades nuevas y prometedoras. Muchas de estas variedades han sido seleccionadas en el campo por 10 a 20 años. El propósito de este estudio fue investigar plantaciones existentes con genotipos tolerantes a *Phytophthora*, con patrones de crecimiento adecuado en suelo infestado con *Phytophthora* y evaluar su comportamiento agronómico. Además, se hizo un intento de correlacionar el rendimiento de portainjertos seleccionados con tolerancia a *Phytophthora* con diversos factores del suelo (Zentmyer 1978, Menge *et al.* 1992 y Menge 1999).

En los últimos años ha habido una considerable investigación en el desarrollo de patrones resistentes particularmente en California, EEUU, y el programa de la Unión Europea en las Islas Canarias, Israel y Sudáfrica. Estos programas continúan en la identificación periódica de nuevos patrones con mayor resistencia. Actualmente, en México existe preocupación y se enfatiza en la búsqueda de resistencia de portainjertos de aguacate contra *P. cinnamomi*. En México en la década de los 80's el Colegio de Postgraduados inició en Atlixco, Puebla, un programa de evaluación y selección de portainjertos tolerantes a *P. cinnamomi* con resultados prometedores. Sin embargo, en 1997 finalizó este programa. Afortunadamente, se logró rescatar germoplasma (Salazar-García *et al.* 2004, Barrientos 2010 y García 2010). Además del Colegio de postgraduados otras instituciones interesadas realizan investigaciones, a factores bióticos y abióticos en aguacate, como el Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, en colaboración con la Universidad Autónoma Chapingo han hecho aportaciones en esta línea de investigación. Actualmente en Nayarit, el Dr. Samuel Salazar García, investigador del INIFAP, evalúa en etapa productiva el cultivar Hass injertado con portainjertos de aguacate tolerantes a la sequía, salinidad y a la pudrición de raíces causada por *P. cinnamomi* (†Dr. López-Jiménez 2012). Sin embargo, a la fecha no existen portainjertos mexicanos liberados como cultivares resistentes que demandan las regiones de la franja aguacatera de Michoacán donde la enfermedad de la pudrición de raíces es devastadora (Bellon *et al.* 2009). También es preocupante el cancro del tronco de árboles del aguacate para lo cual se debe buscar simultáneamente resistencia a esta enfermedad atribuida a *P. cinnamomi* (Ceja *et al.* 2000).

†Comunicación personal: Dr. López-Jiménez A. 2012. Investigador del Colegio de Postgraduados, Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura.

LITERATURA CITADA

- Agrios, GN. 2010. Fitopatología. 2da. ed. Edit. Limusa. D.F., México. 856 p.
- Andrade, HP; De León, C; Espíndola, BMC; Alvarado, RD; López, JA; García, ER. 2012. Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. usando temperaturas controladas. Spanish Journal of Rural Development. 4:1-8.
- Alvarado, RD; Saavedra, RLL; Almaraz, SA. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino (*Quercus* spp.) en Tecoaapa, Guerrero, México. Agrociencia 42:565-572.
- Barrientos, PAF; López, LL. 2000. Historia y genética del aguacate. *In*: Téliz, OD; González, RH; Dromundo, R. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, Méx., p. 19-31.
- Barrientos, PAF. 2010. El aguacate. CONABIO. Biodiversitas. 88:1-7. Consultada en 2012: <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv88art1.pdf>
- Bellon, MR; Barrientos, PAF; Colunga, GMP; Perales, H; Reyes, AJA; Rosales, SR; Zizumbo, VD. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, Méx., p. 365-368.
- Bergh, BO; Ellstrand, N. 1986. Taxonomy of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 70:135-146.
- Bergh, BO. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 76:61-75.
- Birch, RJP; Whisson, CS. 2001. *Phytophthora infestans*, entra en la era de la genómica. Molecular Plant Pathol. 2:257-263.
- Brasier, CM; Sobredo, F; Ferraz, JFP. 1993: Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant Pathol. 42:140-145.

- Ceja, TLF; Téliz, OD; Osada, KS; Morales, GJL. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. en cuatro municipios del estado de Michoacan, Méx. Rev. Mexi. Fitopatol. 18:79-86.
- Coffey, MD. 1991. Strategies for integrated control of soilborne *Phytophthora* species. Cambridge Univ. Press. 447 p.
- Cruz, BM; Hernández, F; Rivas, FE. 2006. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. La Habana, Cub. Temas de Ciencia y Tecnol. 29:45-54.
- Erwin, D; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN. p. 270-271.
- FAOSTAT. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database consulted on April 2012: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Gallegly, ME; Hong, M. 2008. *Phytophthora* identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathol. Soc., MN. 158 p.
- Gallo, LI; Pérez, ZS; Siverio, DLRF. 1999. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands en patrones de aguacate de raza Antillana. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:275-277.
- García, ER. 2010. Agroecología y enfermedades de la raíz en cultivos agrícolas. 1ra. Ed. Edit. Colegio de Postgraduados. Méx.130 p.
- Garibay, KAM. 1979. Historia general de las cosas de nueva España, escrito por Fray Bernardino de Sahagún Edit. Porrúa. 1093 p.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 43: 205-227.
- Hardham, AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Mole. Plant Pathol. 6:589-604.
- Hernández, HE; Gallo, LL; Siverio, DRF. 1999. Distribución de la podredumbre de raíz producida por *Phytophthora cinnamomi* Rands. en los cultivos de aguacate de Tenerife. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:245-248.

- Huguenin, B; Boher, B; Haury, A; Laville, E. 1975. Estudio de *Phytophthora cinnamomi* del aguacatero en el Camerún. *Fruits* 30:525-533.
- Kremer, KS; Kohne, JS. 2007. 25 years of avocado rootstock development in South Africa. p. 1-7. *In: Proceedings VI World Avocado Congress 2007*. Viña del Mar, Chile.
- Kliejunas, JT; Ko, WH. 1976. Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* with ohia decline on the island of Hawaii. *Phytopathology* 66:116-121.
- Madriz OK. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica*, No. 63:22-32.
- Menge, JA; Guillemet, FB; Campbell, S; Johnson, E; Pond, E. 1992. The Performance of rootstocks tolerant to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* under field conditions in Southern California. 2nd World Avocado Cong., p. 53-59.
- Menge, JA. 1994. Strategies to control *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside CA 9:25-21.
- Menge, JA. 1999. Screening and evaluation of new rootstocks with resistance to *Phytophthora cinnamomi*. California avocado research Symposium. Calif. Avocado Soc. and Univ. of Calif., Riverside, p. 69-72.
- Newett, SDE; Crandy, JH; Balerdi, CF. 2002. Cultivars and rootstocks. *In: Whiley, AW; Schaffer, B; Wolstenholme*. Avocado: Botany, production and uses. BN. CABI Publ., p. 161-187.
- Niks, RE; Lindhout, WH. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Dept. Plant Breeding. Wageningen Univ. 216 p.
- Nyerges, P; Szabo, E; Donko, E. 1975. The role of anthocyan and phenol compounds in the resistance of grapes against *Botrytis* infection. *Acta Phytopathol. Acad. Scient. Hung.* 10:21-32.
- Ouellette, GB; Rioux, D. 1992. Anatomical and physiological aspects of resistance to dutch elm disease. p. 257-301. *In: Blanchette A, Biggs R*. Defense mechanisms of woody plants against fungi. Springer-Verlag, Berlin.

- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Coates, L; Whiley, T. 2008. *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. p. 23-25 *In*: The Hon. Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australian Rural Woman of the Year Award 2008 to Mrs Ros Smerdon. Canberra. Vol. 19, num. 2. 52 p.
- Ribeiro, O. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*, Univ. of Calif., Riverside, 417 p.
- Salazar, GS; Velasco, CJJ; Medina, TR; Gómez, AJR. 2004. Selecciones de aguacate con potencial de uso como portainjertos. I. prendimiento y crecimiento de injerto. *Rev. Fitotec. Mex.* 27:23-30.
- Sánchez, PJ. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Rev. Chapingo Serie Horticultura* 5:7-18.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30:3875-3883.
- Schieber, E; Zentmyer, GA. 1992. Archeology of the Avocado in Latin America. *Proc. 2nd World Avocado Cong., Calif. 1991.* Vol. 1: 49.
- Schlosser, E. 1994. Preformed phenols as resistance factors. *Acta Hort.* 381:615-630.
- Smith, CE. 1996. Archeological evidence for selection of avocados. *Econ. Bot.* 20:169-175.
- Storey, WB; Bergh, B; Zentmyer, GA. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70:127-143.
- Téliz, OD; Mora, G; Rodríguez, P. 1989. Manejo integrado de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) del aguacate (*Persea americana*) en Atlixco, Pue. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 7:2.
- Téliz, OD; Mora, AA. 2007. Enfermedades del aguacate. p. 171-208. *In*: Téliz, OD; Mora, AA. El aguacate y su manejo integrado, Ediciones Mundi-Prensa, Méx.

- Tierens, KFM; Thomma, BPHJ; Brouwer, M; Schmidt, J; Kistner, K; Porzel, A; Mauch-Mani, B; Cammue, BPA; Broekaert, WF. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiol.* 125: 1688-1699.
- Torres, PVH. 2009. La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Rev. de Geografía Agrícola. Univ. Autón. Chapingo*, núm. 43.
- Vidales, FJA; Morales, GJL. 1994. Guía para el cultivo del aguacate. Guía técnica núm. 5, CIPAC, INIFAP SARH. 46 p.
- Vivanco, JM; Cosio, E; Loyola, VVM; Flores, HE. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, p. 68-75.
- Vleeshouwers, GAAV; Dooijeweert, WV; Govers, F; Kamoun, S; Colon, LT. 2000. The hypersensitive response is associated with host and non host resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210:853-864.
- Waterhouse, GM. 1963. Key to the species *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycol. Inst. Kew. 92 p.
- Zentmyer, GA; Storey, WB. 1961. *Phytophthora* canker of macadamia trees. Calif. Avocado Soc. Yearbook 45: 107-109.
- Zentmyer, GA. 1978. Origin of root rot resistant rootstocks. Calif. Avocado Soc. Yearbook 62:87-89.
- Zentmyer, GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* the diseases it causes. Monograph. No. 10. The American Phytopathol. Soc. 96 p.
- Zentmyer, GA. 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 69:89-94.

CAPITULO I. Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* Rands. usando temperaturas controladas

1.1. RESUMEN

La pudrición de la raíz de aguacate causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. es, a nivel mundial, el principal problema de la producción de éste frutal. El presente estudio tuvo como propósito evaluar el crecimiento radial *in vitro* de *P. cinnamomi* en diferentes condiciones de temperatura (17, 28 y 34 °C), así como, determinar las temperaturas óptimas del crecimiento del patógeno para asegurar la infección de las raíces. Finalmente, seleccionar portainjertos de aguacate de la raza Mexicana con tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* en determinadas condiciones de temperaturas y bajo presión de inóculo. Esta selección se realizó inoculando grupos de plantas de la raza Mexicana denominadas Atlixco, Tepeyanco y Tepetl, y los porta-injertos comerciales Thomas y Duke-7 con 250 mL/planta de suspensión micelial de *P. cinnamomi* a temperaturas de 17 y 28 °C. La selección de portainjertos tolerantes-resistentes con temperatura controlada y presión de inóculo, provocó infección. Atlixco y Tepeyanco mostraron una resistencia consistente, al presentar sólo 10% de plantas con síntomas de marchitez. Estos resultados prueban que Atlixco y Tepeyanco pueden ser considerados porta-injertos promisorios resistentes a *P. cinnamomi*, debido a que la mayoría de las plantas sobrevivieron, con más de 90% de plantas asintomáticas para ambas temperaturas. Los portainjertos Thomas, Duke-7 y Tepetl presentaron una resistencia intermedia.

Palabras clave: oomicete, pudrición de raíz, tristeza del aguacatero, *P. americana* Mill.

CHAPTER I. Selecting avocado rootstocks for tolerance-resistance *P. cinnamomi* using controlled temperatures

1.2. ABSTRACT

The avocado root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. is globally the main problem limiting the production of this crop. The present study was aimed to evaluate the radial mycelial growth of this pathogen *in vitro* under controlled temperatures (17, 28 and 34 °C), as well as to determine the optimal temperatures for growth of the pathogen. Finally, select avocado rootstocks of the Mexican race with tolerance-resistance to *P. cinnamomi* under certain conditions of temperature and inoculum pressure. Selection for resistance was done by inoculating groups of plants of the Mexican race Atlixco, Tepeyanco and Tepetl, and rootstocks Thomas and Duke-7 with a mycelial suspension of 250 mL/plant of *P. cinnamomi* at temperatures of 17 to 28 °C. The selection of rootstocks tolerant-resistant with controlled temperature showed a positive interaction. Atlixco and Tepeyanco consistently, showed a high level of tolerance-resistance with only 10% of plants developing wilt symptoms. These results prove that Atlixco and Tepeyanco can be considered promising rootstocks resistant to *P. cinnamomi*, as most of the plants survived and showed over 90% of symptomless plants at both temperatures. The rootstock Thomas, Duke-7 and Tepetl showed intermediate resistance.

Key words: oomycete, root rot, wilt of avocado, *P. americana* Mill.

1.3. INTRODUCCIÓN

La pudrición de la raíz del aguacate causada por el oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands es una enfermedad con una distribución cosmopolita que afecta a más de 900 especies hospedantes. Esta enfermedad causa pérdidas económicas al reducir la producción de aguacate en los países donde se cultiva (Zentmyer 1980, Erwin y Ribeiro 1996). México es el principal productor y exportador mundial de aguacate, sin embargo, *P. cinnamomi* es un problema que limita su producción. En 1994, la tristeza (marchitez) del aguacate causó pérdidas en 100 000 árboles de aguacate en el estado de Michoacán (Vidales y Alcántar 1999). Este oomicete, presente en el suelo, ha sido, sigue siendo el más estudiado en zonas tan dispersas como California, Hawaii, México, España, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, ya que puede causar la muerte en árboles de numerosas especies, tales como, aguacate (*Persea americana* Mill.), macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche), diferentes especies de roble (*Quercus* spp.) y castaño (*Castanea sativa* Mill.), entre otros. Los síntomas iniciales de la infección son clorosis y marchitez debido a la pudrición de raíces absorbentes, lo que suele ocasionar una muerte progresiva del árbol (Zentmyer *et al.* 1961, Zentmyer 1985, Hernández *et al.* 1999 y Pegg *et al.* 2008).

En 1950, la Universidad de Riverside, en California, inició un programa de selección de portainjertos resistentes a la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*. En este programa, se obtuvieron portainjertos con una moderada resistencia a dicho patógeno: Duke-6, Duke-7, G6, D9, Toro Canyon, Martin Grande

(G755), todos ellos híbridos de aguacates criollos (Coffey 1987 y Zentmyer 1992). Aunque muchos de los cultivares seleccionados en dicho programa mostraron niveles adecuados de resistencia como portainjertos a la enfermedad, estos porta-injertos, generalmente, no se adaptan a las condiciones climáticas y edáficas de zonas productoras como la de Michoacán (Newett *et al.* 2002). Por este motivo, en México, el porta-injerto más utilizado, debido a su base genética es el aguacate criollo *Persea americana* var. *drymifolia* raza Mexicana. A la fecha, es la mejor opción debido a que presenta un nivel adecuado de tolerancia a la enfermedad y confiere una calidad agronómica óptima para la variedad Hass (Gallegos 1983 y Bellon *et al.* 2009). La selección de su semilla, se basa únicamente en su forma y tamaño, y no existe ninguna información publicada del procedimiento utilizado por los productores.

Por tanto, debido a la falta de material genético resistente a *P. cinnamomi* en México, es necesario seleccionar otro tipo de material, con características de tolerancia-resistencia al mismo, que se adapte a las condiciones agroclimáticas del país. Dado que las poblaciones del patógeno aumentan en el suelo y la gravedad de la enfermedad se intensifica en zonas con monocultivo de aguacate, resulta fundamental determinar la actividad del oomicete en suelo. Para ello, es necesario conocer la temperatura y calcular la curva de crecimiento de *P. cinnamomi* en relación a su respuesta a la temperatura edáfica en la que se desarrolla tanto el patógeno como el hospedante (Walker 1957, Cook y Baker 1983). Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar el crecimiento radial *in vitro* de *P. cinnamomi* en diferentes condiciones de temperatura (17, 28 y 34 °C), así como determinar las temperaturas

óptimas del crecimiento del patógeno para asegurar la infección de las raíces de las plantas del aguacate y finalmente, seleccionar portainjertos de aguacate de la raza Mexicana con tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* en determinadas condiciones de temperaturas y presión de inóculo.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Recolección del material vegetal

Se recolectaron semillas de aguacate de la raza Mexicana de árboles en plena producción en Atlixco, Pue. y Tepeyanco, Tlax. Se denominaron como genotipos Atlixco y Tepeyanco. Los portainjertos obtenidos de semilla Duke-7 (2 años), Thomas (1 año) y Tepetl de raza Mexicana fueron proporcionados por la Fundación Salvador Sánchez Colín, CICTAMEX S.C.

1.4.2. Recolección de raíces con síntomas para aislamiento de *P. cinnamomi*

En Matangarán, municipio de Uruapan, Mich. 19° 19' 46'' Norte y 102° 5' 40'' Oeste, en el periodo de verano se colectaron muestras de raíces (2 a 5 mm de diámetro) de árboles de aguacate con síntomas de la enfermedad. El huerto se ubica en una región que presenta condiciones climáticas semicálidas, subhúmedas con lluvias en verano y temperaturas de 12 y 28 °C. Las raíces se lavaron con agua corriente para quitar el exceso de suelo, posteriormente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 10% por 1 min., se enjuagaron con agua destilada estéril y se

seccionaron fragmentos de 2 cm de longitud. Éstos, se sembraron en V8[®]-agar[®]. Posteriormente, se adicionaron los antibióticos PARPH (Pimaricina 10 µg/L, Ampicilina 292 µg/L, Rifampicina 10 µg/L, Pentacloronitrobenzeno 0.10 g/L e Himexazol 0.25 µg/L) a *Phytophthora cinnamomi* selectivos (Anexo 1) y se incubaron a 28 °C (Jeffers *et al.* 1986 y Erwin *et al.* 1996).

1.4.3. Medición del crecimiento radial del micelio en función de diferentes temperaturas

El aislamiento de *P. cinnamomi* creció en medio de cultivo V8[®]-agar junto con los antibióticos PARPH a 28°C, se transfirió un disco de 5 mm de diámetro a cajas Petri con medio de cultivo V8[®]-agar, donde creció como aislamiento puro durante 130 h a 17, 28 y 34 °C (12 cajas Petri). Posteriormente, el crecimiento radial del micelio (en milímetros) fue medido con un Vernier.

1.4.4. Incremento de inóculo

El inóculo se aumento en matraces de 500 mL con medio líquido jugo-V8[®] (Figura 1), a partir de un aislamiento puro. Los matraces con los cultivos de *P. cinnamomi* se incubaron durante 8 días a 28 °C. Posteriormente, se licuó el micelio y se contabilizó con la cámara de Neubauer. De la solución micelial, se midió un mililitro de la suspensión micelial y se



Figura 1. Crecimiento de *P. cinnamomi* en medio líquido jugo-V8[®].

sembró en medio de cultivo V8[®]-agar para observar las unidades formadoras de colonias; finalmente, se inoculó con la suspensión micelial del patógeno.

1.4.5. Selección de portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* en dos temperaturas

Las condiciones de temperatura y humedad en el suelo aumentan las poblaciones del patógeno y la gravedad de la enfermedad se intensifica en huertos de aguacate. Para asegurar la infección en la selección de portainjertos tolerantes-resistentes se consideró la temperatura promedio del suelo en un huerto sembrado con Duke-7 injertado con el cultivar Hass que ya presentaba marchitez por *P. cinnamomi*. La temperatura del suelo se midió durante 30 días en el período de verano (agosto) con un sensor datalogger HOBO[®] colocado a 35 cm de profundidad y a un metro de distancia del tronco, obteniéndose una temperatura promedio de 17 °C. Para la selección de portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* se utilizaron temperaturas de 17 y 28 °C, siendo 28 °C la óptima para causar infección y pudrición de la raíz (Anexo 2) (Ploetz *et al.* 1994).

La inoculación de *P. cinnamomi* y la selección de plantas tolerantes-resistentes a la enfermedad se realizó siguiendo una modificación de la técnica de tanques de agua con temperatura controlada utilizada por Walker (1957), en el análisis de resistencia a marchitamiento causado por *Fusarium* spp. en cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pepino (*Cucumis sativus* L.), caupí (*Vigna unguiculata* (L) Walp.), col (*Brassica Oleracea* L), chícharo (*Pisum sativum* L.) y

cebolla (*Allium cepa* L.) por *Pyrenochaeta terrestres* Hans. Los tanques utilizados tenían 1.5 x 1.10 m con temperaturas controladas de 17 y 28 °C y circulación continua de aire para evitar anoxia y mantener la oxigenación de las raíces, las plantas de aguacate fueron sembradas en contenedores de polietileno negro, de 14 cm de diámetro y 30 cm de altura con suelo estéril (con pH de 6.1 y conductividad eléctrica de 0.63, Anexo 2) inoculado artificialmente con el oomicete.

1.4.6. Pruebas de patogenicidad

En invernadero, se inocularon 10 plantas de aguacate de 6 meses con 250 mL/planta de fragmentos de micelio con una concentración de 2.5×10^3 mL de *P. cinnamomi*. Como testigos, se utilizaron 10 plantas sin inocular a las que se aplicó agua estéril. Cuando las plantas de aguacate inoculadas mostraron síntomas de marchitamiento, el patógeno se reaisló de la raíz para realizar estudios de morfología y descripción molecular (Erwin y Ribeiro 1996; Gallegly y Hong 2008).

1.4.7. Caracterización morfológica y molecular

El oomicete se caracterizó morfológicamente mediante las claves de Erwin y Ribeiro (1996) y de Gallegly y Hong (2008). En la extracción y amplificación del ADN de *P. cinnamomi* se siguió la metodología de White *et al.* (1990). El ADN extraído se envió al Laboratorio de Semillas del Colegio de Postgraduados para su determinación molecular.

1.4.8. Análisis de datos

Los datos de crecimiento radial (en mm) del micelio de *P. cinnamomi* en cajas Petri a tres temperaturas (17, 28 y 34 °C) evaluadas durante 130 h se muestran en la Figura 2. Los datos para la selección de portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* a dos temperaturas se analizaron con un diseño de parcelas divididas (5 x 2), con 5 parcelas mayores, correspondientes a los portainjertos y 2 subparcelas, con temperaturas de 17 y 28 °C, respectivamente. Cada tratamiento constó de 10 árboles de los genotipos Atlixco, Tepeyanco, Tepetl y Thomas, en el caso del portainjerto Duke-7 se utilizaron 3 árboles injertados con la variedad Hass. Las medias se compararon aplicando la prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) v9.0 (SAS 2001).

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1. Crecimiento micelial radial *in vitro* de *P. cinnamomi* a diferentes temperaturas

La población del patógeno aumenta en el suelo y la gravedad de la enfermedad se intensifica en el monocultivo de aguacate, por tal motivo es importante determinar la actividad del oomicete en el medio edáfico. Para esto se necesita conocer la temperatura y con los datos se realizó una curva de crecimiento de *P. cinnamomi* en respuesta a la temperatura del suelo en la que se desarrolla el patógeno y el hospedante. Estas condiciones de temperatura favorecen la interacción huésped-

patógeno y propician la infección vascular y la posible selección de resistencia a enfermedades (Walker 1957; Cook y Baker 1983).

La temperatura juega un papel importante en el crecimiento del patógeno y en la pudrición de raíces de aguacate. Aislamientos del patógeno en cajas Petri con jugo V8[®]-agar más antibióticos, mostraron el mayor crecimiento de micelio a 28 °C al crecer 10 mm en 18 h y cubrir la caja Petri en 120 h mientras que a 17 °C el crecimiento micelial fue de 8.4 mm a las 18 h cubriendo el total de las cajas Petri a 130 h El crecimiento radial del micelio fue similar a 17 y 28 °C, y no se afectó el crecimiento micelial a estas dos temperaturas (Figura 2). Sin embargo, con una temperatura de 34 °C, el crecimiento del patógeno fue únicamente de 5 mm a las 48 h e incluso disminuyó a partir de las 72 h inhibiéndose por completo a las 92 h En este sentido, Zentmyer (1985) señala que a 33 °C se inhibe el desarrollo del patógeno. Los resultados obtenidos muestran que la actividad de *P. cinnamomi* está estrechamente relacionada con la temperatura.

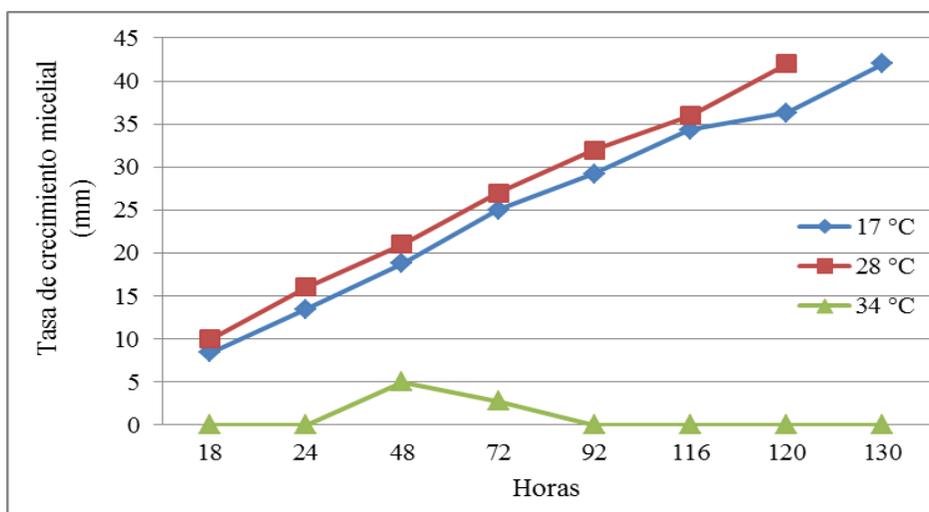


Figura 2. Crecimiento micelial radial de *P. cinnamomi* en temperaturas de 17, 28 y 34 °C.

La temperatura óptima de crecimiento de *P. cinnamomi* se encuentra entre 24 y 28 °C; sin embargo, el micelio se desarrolla entre 7.5 y 30 °C. En temperatura de 17 °C, el micelio mostró un buen desarrollo, como lo citan Hardham *et al.* (1991), quienes obtuvieron un crecimiento micelial óptimo a 17.5 y 28 °C que corresponden a las temperaturas seleccionadas en la presente investigación. En las pruebas de inactivación del desarrollo micelial del oomicete se determinó que tal inactivación ocurre a los 33 °C. El limitado crecimiento obtenido a 34 °C indicaron que estas temperaturas son las menos apropiadas para el crecimiento de *P. cinnamomi*, como se reporta en otras investigaciones que indican que el patógeno no progresa desde los 33 a 35 °C (Torres *et al.* 2006 y Zentmyer 1985).

1.5.2. Prueba de patogenicidad

Las plantas inoculadas presentaron síntomas de marchitez del aguacatero causada por *P. cinnamomi* después de 180 días de inoculadas. Para asegurar la aparición de síntomas y el incremento de la pudrición de raíces se realizaron riegos frecuentes para mantener el 90% de humedad disponible en el suelo (Coffey 1991), lo que favoreció la aparición de síntomas y muerte de plantas inoculadas de aguacate. Las plantas testigo no presentaron síntomas. El reaislamiento del patógeno a partir de plantas con síntomas de marchitamiento se observó al microscopio y correspondió a *P. cinnamomi* (Figura 3).

1.5.3. Descripción morfológica

Las características observadas del oomicete coinciden con los reportados por Gallegly (2008), Erwin *et al.* (1996). Las estructuras morfológicas de *P. cinnamomi* se caracterizan por presentar micelio cenocítico con hinchamientos hifales, abundantes clamidosporas esféricas y esporangios ovoides sin papila. También, se observaron clamidosporas germinando (Figura 3 y Anexo 3). La comparación de la

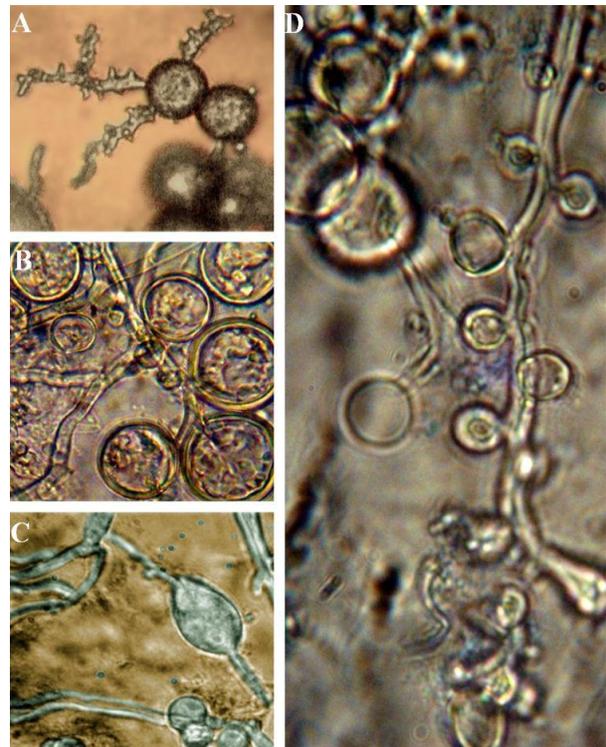


Figura 3. *P. cinnamomi* **A)** germinación de clamidosporas, **B)** clamidosporas, **C)** esporangios y **D)** hinchamientos hifales.

secuencia de nucleótidos del aislamiento con la secuencia reportada por el banco de

genes (Genbank) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) correspondió a *Phytophthora cinnamomi* con una identidad de 99%. La secuencia obtenida en este estudio se depositó en el Genbank con el número de acceso JQ266267.

1.5.4. Mortalidad de genotipos

La mortalidad de los portainjertos inoculados con *P. cinnamomi* a 17 y 18 °C varió significativamente entre los mismos ($p \leq 0.05$), detectándose valores de CV altos (Cuadro 1). Esto debido a las diferencias en el origen del material y que permite de manera preliminar seleccionar materiales resistentes o tolerantes a *P. cinnamomi*.

En los genotipos Tepetl y Thomas la mortalidad fue de 20 y 28.57%, estadísticamente similares (Cuadro 1). El porcentaje de mortalidad fue nula para Tepeyanco en las dos temperaturas, comparado con los portainjertos clonales Duke-7 y Thomas, conocidos por su resistencia a *P. cinnamomi* y que se explotan comercialmente. Zentmyer y Schieber (1987) reportan que bajo condiciones severas de infección el portainjerto Duke-7 y Thomas pueden ser afectados lo que explica su alta mortalidad y susceptibilidad al patógeno proveniente de Uruapan, Mich. A la fecha, el portainjerto Duke-7 se comporta como moderadamente tolerante. Sin embargo, en México, Duke-7 muestra susceptibilidad, independientemente de que se considere que tiene tolerancia intermedia ante *P. cinnamomi* en condiciones de California, EEUU. (Menge *et al.* 1992 y Zentmyer 1992). En el presente trabajo, el

portainjerto Thomas mostró tolerancia mientras que Duke-7 mostró un alto porcentaje de mortalidad (75%) en las dos temperaturas.

Actualmente, las plantaciones de aguacate cv. Hass en la mayor parte de México se injerta en portainjertos de semilla de la raza Mexicana, debido a la susceptibilidad de marchitez que tiene el portainjerto Duke-7 en las condiciones agroclimáticas de las regiones aguacatera de México (Newett *et al.* 2002).

1.5.5. Genotipos con síntomas de marchitamiento

En plantas inoculadas a 17 y 28 °C los síntomas de marchitamiento se presentaron a los ocho meses. La presencia de síntomas de marchitez en las plantas inoculadas para la selección de portainjertos resultó altamente significativa ($p < 0.05$) en Thomas y Duke-7, los que a 17 °C mostraron aumento porcentual en síntomas de marchitamiento, comparado con el genotipo Tepetl que presentó 20% de marchitez a 17 °C. Sin embargo, en Duke-7 a 28 °C no presentó plantas con marchitamiento debido a la elevada mortalidad. Tepetl mostró 60% de marchitamiento, mientras que Thomas mostró 42.86% de síntomas de marchitez, comparado con los genotipos Tepeyanco y Atlixco que mostraron un menor valor porcentual y por tanto pueden considerarse plantas resistentes por mostrar 10% de síntomas de marchitez a 28 °C (Cuadro 1).

Cuadro 1. Incidencia causada por *P. cinnamomi* a dos temperaturas en la selección para resistencia de portainjertos de aguacate

Genotipos	Incidencia causada por <i>P. cinnamomi</i> (%)					
	17 °C			28 °C		
	Mortalidad	Marchitamiento	Asintomáticos	Mortalidad	Marchitamiento	Asintomáticos
Duke-7	75.00 a [†]	25.00 ab	0.00 d	75.00 a	0.00 c	25.00 b
Thomas	14.29 b	57.14 a	28.60 c	28.60 b	42.86 ab	28.57 b
Tepetl	40.00 ab	20.00 b	40.00 b	20.00 b	60.00 a	20.00 b
Tepeyanco	0.00 c	0.00 c	100 a	0.00 c	10.00 b	90.0 a
Atlixco	0.00 c	0.00 c	100 a	0.00 c	10.00 b	90.0 a
DMS	44.26	39.79	55.40	35.59	52.28	27.68
CV (%)	170.43	134.05	138.7	137.06	128.10	32.44

DMS: Diferencia mínima significativa, CV: Coeficiente de variación.

[†]Valores con la misma letra dentro de cada genotipo y columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

1.5.6. Genotipos asintomáticos

En el Cuadro 1, se muestra que las plantas evaluadas de raza Mexicana Atlixco y Tepeyanco presentaron 90 y 100% de plantas asintomáticas, respectivamente, en temperaturas de 28 y 17 °C. Para ambas temperaturas, el portainjerto Thomas, conocido por su resistencia, presentó 28.6% de plantas asintomáticas y el portainjerto Tepetl presentó 20% a 28 °C y 40% a 17 °C de plantas asintomáticas, los valores porcentuales son significativos cuando se comparan con los genotipos de Tepeyanco y Atlixco. El portainjerto Duke-7 obtuvo 0% de plantas asintomáticas debido a la alta mortalidad de plantas (75%) y por mostrar 25% de sintomatología de marchitamiento éstos resultados observados se atribuyen a que provinieron de semilla y no de plantas clonadas (Cuadro 1).

Los resultados obtenidos, demostraron que las plantas de raza Mexicana Tepeyanco y Atlixco provenientes de plantas de var. *drymifolia* presentan un nivel adecuado de resistencia a *P. cinnamomi* en comparación con los portainjertos Duke-7 y Thomas seleccionados por Zentmyer (1978) a 25 °C quien menciona que estos portainjertos son resistentes al oomicete en condiciones ambientales de California (Gallegos 1983 y Menge *et al.* 1992). Dentro de las medidas de control genético para la resistencia a *P. cinnamomi*, la utilización de portainjertos tolerantes a la enfermedad juega un papel fundamental y ofrece posibilidades de éxito al complementar la resistencia genética para lograr un manejo integral de la misma (Leach *et al.* 2001). En México y, en concreto en la región aguacatera de Uruapan, Mich., el éxito en la productividad del aguacate de la variedad Hass se atribuye al uso del portainjertos de la raza Mexicana.

1.6. CONCLUSIONES

La prueba de selección de portainjertos tolerantes-resistentes con temperaturas controladas e infestación del suelo con *P. cinnamomi*, demostró que temperaturas de 17 y 28 °C son ideales para la selección de portainjertos de aguacate bajo presión de inóculo. Particularmente, las plantas de raza Mexicana Atlixco y Tepeyanco, mostraron una mayor resistencia ya que la mayoría de las plantas sobrevivieron presentando altos porcentajes de plantas asintomáticas y una baja mortalidad en las dos temperaturas. Los portainjertos Thomas, Duke-7 y Tepetl mostraron susceptibilidad.

Las temperaturas óptimas para el crecimiento radial del patógeno fueron 17 y 28 °C. Ambas, propiciaron la infección vascular en la selección de portainjertos resistentes a *P. cinnamomi*. La prueba de selección con temperaturas controladas a 17 y 28 °C bajo presión de inóculo, causó mayor incidencia de la enfermedad y permitió obtener portainjertos con tolerancia-resistencia a la marchitez del aguacate.

1.7. LITERATURA CITADA

- Bellon, MR; Barrientos, PAF; Colunga, GMP; Perales, H; Reyes, AJA; Rosales, SR; Zizumbo, VD. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en Capital natural de México, Vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, Méx., p. 365-368.
- Coffey, MD. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado an integrated approach to control in California. Plant Dis. 71:1046-1052.
- Coffey, MD. 1991. Strategies for integrated control of soilborne *Phytophthora* species. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 447 p.
- Cook, RJ; Baker, KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathol. Soc. 539 p.
- Erwin, D; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN., p. 270-271.
- Gallegly, ME; Hong, M. 2008. *Phytophthora* identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathol. Soc., MN. 158 p.
- Gallegos, ER. 1983. Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacán. Univ. Autón. Chapingo. Grupo Edit. Gaceta, S.A. Chapingo, Méx. 317 p.
- Hardham, AR; Gubler, F; Duniec, J; Elliott, J. 1991. A review of methods for the production and use of monoclonal antibodies to study zoosporic plant pathogens. J. Microsc. 162:305-318.
- Hernández, HE; Gallo, LL; Siverio, DRF. 1999. Distribución de la podredumbre de raíz producida por *Phytophthora cinnamomi* Rands. en los cultivos de aguacate de Tenerife. Rev. Chapingo Serie Horticultura 5:245-248.
- Jeffers, NS; Martin, JB. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Dis. 70:1038-1043.
- Leach, E; Vera, CM; Bai, J; Leung, H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of diseases resistance genes, Ann. Rev. Phytopathol. 39:187-224.

- Menge, JA; Guillemet, FB; Campbell, S; Johnson, E; Pond, E. 1992. The Performance of rootstocks tolerant to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* under field conditions in Southern California. 2nd World Avocado Cong., p. 53-59.
- Newett, SDE; Crandy, JH; Balerdi, CF. 2002. Cultivars and rootstocks. *In*: Whiley, AW; Schaffer, B; Wolstenholme. Avocado: Botany, production and uses. BN. Eds CABI Publ., p. 161-187.
- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Coates, L; Whiley, T. 2008. *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. p. 52. *In*: The Hon. Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australian Rural Woman of the Year Award 2008 to Mrs Ros Smerdon. Canberra. Vol. 19, num. 2.
- Ploetz, RC; Zentmyer, GA; Nishijima, WT; Rohrbach, KG; Ohr, HD. 1994. Compendium of tropical fruit diseases. Am. Phytopathol. Soc.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User guide. Release 9.0. North Carolina, USA. 1289 p.
- Torres, AE; Rodríguez, MMC; Torres, VLM; Suárez de la Cámara, MA. 2006. ¿Qué papel juega el hongo *Phytophthora cinnamomi* en el desarrollo de la regeneración natural y las repoblaciones de encina y alcornoque?. Bol. Inf. CIDEU 1:53-63.
- Vidales, FJA; Alcántar, RJJ. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands) del aguacate (*Persea americana* Mill.). Rev. Chapingo, Serie Horticultura 5:255-259.
- Walker, JCH. 1957. Plant Pathology. 2nd. Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. USA. 707 p.
- White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p 315-322. *In*: Innis, MA; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ. PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Eds. Academic Press, Inc., New York.
- Zentmyer, GA; Storey, WB. 1961. *Phytophthora* canker of macadamia trees. Calif. Avocado Soc. Yearbook 45: 107-109.

Zentmyer, GA. 1978. Origin of root rot resistant rootstocks. Calif. Avocado Soc. Yearbook 62:87-89.

Zentmyer, GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* the diseases it causes. Monograph. No. 10. The American Phytopathol. Soc.

Zentmyer, GA. 1985. Origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 69: 89-94.

Zentmyer, GA; Schieber, E. 1987. The search for resistance to *Phytophthora* root rot in Latin America. S. Afr. Avocado Growers Assoc. Yearbook 10:109-110.

Zentmyer, GA. 1992. *The Avocado Quarterly*, Res. Gazette 21:3-17.

CAPITULO II. Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante *P. cinnamomi*

2.1. RESUMEN

El estudio de la resistencia en plantas a enfermedades de la raíz frecuentemente se evalúa a nivel macroscópico, seleccionando plantas con apariencia sana o sobrevivientes a patógenos, sin considerar los mecanismos de resistencia histológica ante patógenos de la raíz, como es el caso de *Phytophthora cinnamomi* causante de la marchitez del aguacate. Los objetivos de este trabajo fueron identificar la presencia de micelio *P. cinnamomi* en el xilema de la raíz y la implicación de la formación de tilosas y depósito de fenoles como mecanismos de defensa histológica en plantas de aguacate. Se observó la presencia de hifas en xilema, formación de tilosas y acumulación de fenoles en raíces provenientes de plantas muertas, con síntomas de marchitez y asintomáticas de los portainjertos comerciales Duke-7 y Thomas, y de los genotipos Tepetl, Atlixco y Tepeyanco, previamente inoculadas en condiciones de temperatura controlada en el suelo (17 y 28 °C). El contenido de micelio en el xilema de plantas muertas de Duke-7, Thomas y Tepetl a 17°C no mostró diferencias significativas; sin embargo, a 28 °C el contenido de micelio en Duke-7 fue altamente significativo ($p \leq 0.05$). En plantas con marchitez, la presencia de micelio fue abundante a 17 °C en Tepetl, por lo que se considera susceptible al patógeno. Atlixco mostró bajo contenido micelial similar al obtenido a 28 °C y se consideran tolerantes a *P. cinnamomi*. En plantas con síntomas de marchitez y asintomáticas, la formación de tilosas y la asociación de compuestos fenólicos contribuyeron a la defensa al oomicete. Tepeyanco, Atlixco y Tepetl mostraron resistencia al activar oportunamente sus mecanismos de defensa.

Palabras clave: *P. cinnamomi*, defensa histológica, fenoles, tilosas, raíz, *P. americana* Mill.

CHAPTER II. Defense mechanisms in avocado rootstocks to *P. cinnamomi* *Rands*

2.2. ABSTRACT

The study of plant resistance, to root diseases, often is normally evaluated at macroscopic level, selecting healthy looking plants or surviving plants to pathogens, however, also should be considered the histological mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi*. The objectives of this study were to identify the presence of mycelium of *P. cinnamomi* in the root xylem, formation of tyloses, and deposition of phenols as histological defense mechanisms in avocado of genotypes, Duke-7, Thomas, Atlixco and Tepeyanco. Seedlings of these were inoculated in controlled soil temperature tank at 17 and 28 °C histopathological observations showed the presence of hyphae in root xylem, formation of tyloses, and accumulation of phenols in roots of dead plants, with wilting symptoms asymptomatic genotypes of Tepetl, Atlixco and Tepeyanco, previously inoculated with controlled soil temperature at 17 and 28 °C were inoculated. The contents of mycelium in the root xylem of dead plants of Duke-7, Thomas and Tepetl at 17 °C showed no significant difference, however, at 28 °C the contents of mycelium in Duke-7 was highly significant ($p \leq 0.05$). In plants with wilting symptoms, the presence of mycelium at 17 °C was greater in Tepetl, and therefore it is considered susceptible. Tepetl and Atlixco showed similar mycelial contents at 28 °C and were considered tolerant to *P. cinnamomi*. In plants with wilt symptoms and asymptomatic, the formation of tyloses and the association of phenolic compounds contributed to the defense against the oomycete. Tepeyanco, Atlixco and Tepetl showed tolerance-resistance by opportunely activating their defense mechanisms.

Keywords: *P. cinnamomi*, defense histological, phenols, tyloses, root, *P. America* Mill.

2.3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como “tristeza del aguacatero” es causada por el oomicete *Phytophthora cinnamomi*. El control de esta enfermedad se basa generalmente en estudios epidemiológicos y manejo integrado del cultivo de aguacate. En varios países como EEUU, Sudáfrica, España, Israel y recientemente en México la prioridad ha sido la búsqueda y selección de portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi*; para lo que se requiere de una búsqueda de germoplasma de aguacate con resistencia a la enfermedad (Zentmyer *et al.* 1987, Vidales *et al.* 1999, Gallo 1992, Gallo *et al.* 1999 y Téliz *et al.* 2007).

El estudio de la resistencia en plantas a enfermedades de la raíz, frecuentemente se evalúa a nivel macroscópico, seleccionando plantas con apariencia sana o sobrevivientes a la presión de inóculo sin considerar los mecanismos de resistencia histológica ante un patógeno. En el caso de las enfermedades que afectan el sistema vascular de las plantas, estas reaccionan en presencia de esos patógenos produciendo estructuras y sustancias químicas que tratan de interferir en el desarrollo del mismo. Los factores de resistencia estructural son inducidos para formar barreras y limitar al patógeno en una región del xilema por medio de estructuras conocidas como tilosas, gomas y geles, las cuales tienen la finalidad de evitar el crecimiento del patógeno dentro del tejido de la raíz (Ouellette *et al.* 1992, Del Rio *et al.* 2002 y

Hobbes 2004). La incorporación de ésta resistencia en el cultivo de aguacate probablemente sea la estrategia más efectiva a largo plazo.

En 1912, Petri observó en el cultivo de vid la presencia de tilosas como mecanismos de defensa a la enfermedad. La formación de tilosas se debe a cambios producidos en la pared celular. De igual manera, dentro de estos mecanismos de defensa, se producen compuestos fenólicos llamados fitoanticipinas (ácidos cinámicos, flavonoides, isoflavonoides, deoxiantocianinas, estilbenos, cumarinas, cromonas) alrededor de las células los cuales actúan de forma pasiva reforzando la pared celular e inhibiendo el crecimiento de hifas (Nyerges *et al.* 1975, Scalbert 1991, Schlosser 1994 y Vleeshouwers *et al.* 2000).

La selección de portainjertos tolerantes-resistentes a la pudrición de raíz y su relación con el estudio de mecanismos de defensa histológica a *P. cinnamomi* no ha sido una prioridad en el cultivo de aguacate. En estudios histológicos en otras especies, como en el caso de la papa afectada por *Fusarium oxysporum*, alfalfa por *Verticillium albo-atrum*, olmo por *verticillium*, en vid afectada por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium inflatipes* y en el cultivo de chile con *Phytophthora capsici* y *Fusarium sp.*, se ha observado que estas especies tienen la capacidad de reaccionar desarrollando mecanismos de defensa como la formación de tilosas y síntesis de compuestos fenólicos para detener el avance del patógeno, y al final algunas plantas muestran susceptibilidad al patógeno debido a que este supera

estas barreras de defensa producidas por la planta (Sepulveda *et al.* 1979, Grant *et al.* 1984, Vleeshouwvers *et al.* 2000, Nicks *et al.* 2004 y Cruz *et al.* 2006). Así, el objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de micelio de *P. cinnamomi* en el xilema de la raíz y la implicación en la formación de tilosas y depósito de fenoles como mecanismos de defensa histológica en portainjertos de aguacate.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Muestreo de raíces y preparación de las muestras histopatológicas

El muestreo de raíces se realizó en portainjertos comerciales Duke-7 y Thomas, y en los genotipos Tepetl, Tepeyanco y Atlixco de raza Mexicana inoculados y mantenidos a temperaturas de 17 y 28°C como se describe en Andrade *et al.* 2012. Se tomaron muestras al azar de raíces adventicias con síntomas de pudrición de una planta muerta, dos plantas con síntomas de marchitez y 2 plantas asintomáticas. Posteriormente, para la realización de los cortes histológicos, de cada genotipo inoculado y sin inocular, las raíces colectadas se lavaron con agua destilada y se cortaron segmentos de 1 cm de longitud. Las muestras colectadas se colocaron en solución FAA (formaldehído: 100 mL, ácido acético glacial: 50 mL, etanol: 500 mL y agua destilada: 350 mL) durante 24 h. Las raíces de aguacate fijadas en FAA se lavaron con agua y se colocaron para deshidratar en etanol a 50, 70, 96 y 100%. Posteriormente, se transfirieron a diluciones 3:1, 1:1 y 1:3 de alcohol-xileno y xileno a

100% durante 72 h. Posteriormente, las muestras de raíces se retiraron y embebieron en parafina fundida (Paraplast SIGMA[®]) por 24 h a ± 60 °C (López *et al.* 2005) en un procesador automático. Finalmente, las muestras de raíces se extrajeron del procesador, se vertió parafina fundida en cubos de papel (1 cm de ancho por 1.5 cm de largo) para embeber el tejido radical y se dejó enfriar hasta solidificarse. Los cubos con el tejido se montaron en cubos de madera y se procedió a realizar cortes de 15 μ de grosor con un micrótopo rotatorio (Spencer 820[®]). Los cortes se suspendieron en agua con grenetina a 55 °C y se montaron en portaobjetos para secar a temperatura ambiente.

2.4.2. Tinción safranina-verde rápido

La parafina se removió de los portaobjetos colocándolos en estufa a 50 °C por 20 min. Posteriormente, los cortes se pasaron por tres cambios de xileno por tres minutos cada uno y se hidrataron en 2 cambios de alcohol a 96 y 100%. Al final, las muestras se tiñeron con la técnica de doble safranina y verde rápido Fast Green FCF (Anexo 4 y 5) (López *et al.* 2005). Las muestras se montaron en resina sintética (SIGMA[®]) y se observaron al microscopio de luz a 40X (VE-B6 Velab[®]) para identificar la presencia de micelio, tilosas y depósito de compuestos fenólicos en los tejidos radicales.

2.4.3. Evaluación de variables histológicas

La presencia de micelio, tilosas y depósito de compuestos fenólicos de color rojizo con paredes lignificadas se determinó visualmente. Para la evaluación microscópica de los cortes histológicos se consideraron 10 portaobjetos de cinco genotipos que presentaron plantas muertas, con síntomas de marchitez y plantas asintomáticas

inoculadas con *P. cinnamomi* y sin inocular con temperaturas de 17 y 28 °C. Para éstos, se revisaron 5 cortes de cada uno de los 10 portaobjetos (correspondiente a 10 repeticiones) y se observaron 5 campos con el objetivo 40X (250 observaciones). Los datos se analizaron como un diseño factorial (5X2) en donde el nivel 5 correspondió a los 5 genotipos y el 2 a las temperaturas de 17 y 28 °C. Las medias se compararon con la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$) y se utilizó el paquete computacional SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0 (SAS Institute, 2001).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cortes histológicos de raíces de los genotipos de aguacate previamente infectados con el oomicete *P. cinnamomi*, causo infección y activación de mecanismos de defensa. Se detecto la presencia de micelio de *P. cinnamomi*, tilosas y depósito de compuestos fenólicos en plantas muertas, con síntomas de marchitez y plantas asintomáticas a 17 y 28 °C (Cuadro 1, 2 y 3), se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) con un coeficiente de variación elevado, indicativo de la variabilidad genética de los genotipos. En portainjertos testigo (sin inocular) a temperaturas de 17 y 28 °C no se detectó la presencia de micelio, tilosas ni compuestos fenólicos.

2.5.1. Presencia de micelio en genotipos muertos

En plantas muertas de los portainjertos Duke-7, y Thomas, y el genotipo Tepetl mantenidas a 17 °C, el contenido de micelio en el xilema de raíces alimenticias (1 a 4 mm. de diámetro aproximadamente) no mostró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$). Sin embargo, a 28 °C Tepetl y Thomas tuvieron bajo porcentaje de micelio en el xilema en comparación con Duke-7 que presentó mayor contenido de micelio (13.92%), esto sugiere que la cantidad de micelio en el xilema de raíces de los portainjertos muertos está relacionado con la infección del oomicete y sobre todo por la incapacidad de las plantas para superar el efecto de invasión del micelio, la infección supero las barreras estructurales de defensa (Cuadro 1).

La temperatura y alta humedad del suelo en las que se mantuvieron las plantas fueron determinantes para que el oomicete causara infección y se facilitara el establecimiento, colonización y progreso del patógeno en el sistema radical y finalmente culminara en la muerte de plantas susceptibles. El micelio logró penetrar las células adyacentes al xilema hasta llegar al xilema y células parenquimatosas, superando las barreras estructurales de resistencia, presentándose síntomas de marchitamiento y por último la muerte de las plantas (Grant *et al.* 1984 y Agrios 2010).

2.5.2. Presencia de micelio en genotipos con síntomas de marchitez

En Tepetl, la presencia de micelio en el xilema de las plantas en condiciones de temperatura en el suelo a 17 °C fue abundante (19.04%) en comparación con Thomas

y Duke-7 (3.12 y 5.76%), el cual se considera susceptible histológicamente al observarse mayor colonización de las hifas de *P. cinnamomi* a nivel microscópico. Sin embargo, a 28 °C presentó 7.92% de micelio en el xilema. Este efecto del patógeno en el hospedante sugiere que puede considerarse como un portainjerto tolerante. El alto y bajo contenido de micelio en el xilema en el genotipo Tepetl a 17 y 28 °C posiblemente se debe a la variabilidad genética que resulta generalmente en susceptibilidad y cierta tolerancia al impedir la invasión vascular por este patógeno.

Cuando el portainjerto Thomas presentó síntomas de marchitamiento mostró menor desarrollo micelial (3.12%) en el xilema a 17 °C; sin embargo, a 28 °C Thomas mostró mayor desarrollo micelial (15.12%) en comparación con los genotipos Tepetl, Tepeyanco y Atlixco. Sin embargo, el genotipo Tepeyanco presentó el menor contenido de micelio en el xilema (Cuadro 1), lo que sugiere que el alto o bajo porcentaje de micelio en el xilema es capaz de causar infección de marchitez y alteraciones microscópicas en la raíz de aguacate, debido a la formación de barreras físicas y contenido de compuestos antifúngicos (tilosas y polifenoles) como defensa de la planta ante la presencia del oomicete. Por otra parte, esta respuesta se debe a la habilidad del patógeno para avanzar sistémicamente a lo largo de la raíz y a la susceptibilidad del hospedante, coincidiendo con lo observado en raíces de *Ulmus minor* Mill, *Vitis vinífera* L. y *Capsicum* sp., que mostraron diferentes niveles de susceptibilidad y tolerancia a las enfermedades sistémicas causadas por *Verticillium*

sp., *Fusarium* sp. y *Ophiostoma novo-ulmi* (Sepúlveda *et al.* 1979, Grant *et al.* 1984, Vleeshouwer *et al.* 2000 y Niks *et al.* 2004), respectivamente.

Los genotipos Tepetl y Atlixco mostraron un contenido micelial similar a 28 °C, por lo que, a nivel histológico pueden considerarse como tolerantes a *P. cinnamomi*. Sin embargo, Tepeyanco obtuvo una importante disminución porcentual de desarrollo micelial en el xilema a 28 °C, indicando que éste puede ser un portainjerto resistente al oomicete al activar sus mecanismos de defensa impidiendo el avance del patógeno (Cuadro 1). A 28 °C se detectó una mayor cantidad de micelio indicando que la raíz en esta temperatura permitió la interacción con el patógeno y causó infección del sistema radical.

Cuadro 1. Presencia de micelio de *P. cinnamomi* en raíces de genotipos de aguacate muertos, con síntomas de marchitez y asintomáticos a dos temperaturas

Genotipos	Contenido de micelio en raíz (%)					
	Muertos		Con marchitez		Asintomáticos	
	17 °C	28°C	17 °C	28 °C	17 °C	28 °C
Duke-7	9.84 a [†]	13.92 a	5.76 b	‡-	-	3.68 bc
Thomas	7.76 a	3.44 b	3.12 b	15.12 a	3.92 b	0.08 c
Tepetl	6.32 a	3.20 b	19.04 a	7.92 b	2.56 b	11.68 a
Tepeyanco	-	-	-	2.08 c	8.08 a	6.88 ab
Atlixco	-	-	-	8.40 b	5.44 ab	7.20 ab
DMS	5.62	5.58	5.44	6.60	4.84	8.17
CV (%)	106.49	110	101.27	108.06	130.12	176.72

DMS: diferencia mínima significativa, CV: coeficiente de variación

[†]Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$.

[‡]No fueron evaluados.

2.5.3. Presencia de micelio en genotipos asintomáticos

Los plantas asintomáticas de los genotipos Tepeyanco y Atlixco, de la raza Mexicana, presentaron el mayor porcentaje de desarrollo micelial en el xilema de la raíz cuando fueron seleccionados a 17 y 28 °C. De acuerdo con los resultados macroscópicos obtenidos a 28 °C, estos genotipos tuvieron resistencia al oomicete al presentar mayor número de plantas asintomáticas, ausencia de plantas muertas y solamente 10% de plantas con síntomas de marchitez (Andrade *et al.* 2012). De acuerdo con García y Fraile (1996), el daño causado por el patógeno puede resultar en una alteración microscópica sin presentar síntomas o alteraciones macroscópicas, como se observó en plantas asintomáticas de aguacate, que no desarrollaron síntomas de marchitamiento causado por *P. cinnamomi*. De acuerdo a la definición de resistencia de plantas a enfermedades, se requiere de plantas con atributos genéticos que regulen y permitan restringir el crecimiento del patógeno y, consecuentemente el desarrollo de la enfermedad en el hospedante (Nicks *et al.* 2004 y Cruz *et al.* 2006).

El portainjerto comercial Thomas y el genotipo de la selección Tepetl resultaron asintomáticos ya que presentaron poco desarrollo micelial a 17 °C. Tepetl a 28 °C tuvo el mayor contenido de micelio. En la selección para resistencia a *P. cinnamomi* a 28 °C se observó una disminución del desarrollo micelial en los portainjertos asintomáticos Thomas y Duke-7, por lo que, a nivel histológico pueden considerarse con tolerancia moderada.

Cuando se evaluaron los síntomas macroscópicos de marchitez y mortalidad en materiales de la raza Mexicana Atlixco y Tepeyanco, éstos mostraron más de 90% de plantas asintomáticas y al evaluar a nivel histopatológico se detectó el avance inter e intracelular de las hifas de *P. cinnamomi* (Figura 1 A y B). Éstos resultados sugieren que las plantas asintomáticas restringen el avance del micelio, por lo que, Tepeyanco y Atlixco de la raza Mexicana, pueden ser portainjertos promisorios debido a su capacidad de impedir la invasión y avance micelial del oomicete en el tejido de la raíz. Esto, posiblemente se debe a la activación oportuna de los mecanismos de resistencia estructural y química considerados como los más eficaces para disminuir la infección del patógeno (Ouellette *et al.* 1992 y Hobbes 2004).

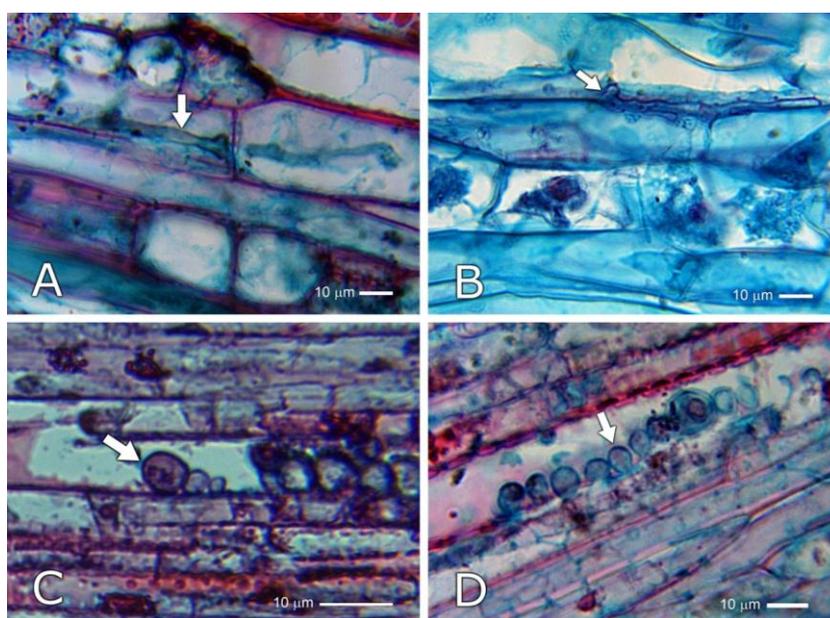


Figura 1. Micrografías de corte longitudinal de raíz tomadas a 40X con microscopio de luz. Las flechas indican: **A)** Genotipo de Atlixco, raza Mexicana, con crecimiento del micelio intercelular, **B)** Genotipo de Tepeyanco, raza Mexicana, con micelio intracelular, **C)** Portainjerto Thomas asintomático a 28 °C con presencia de tilosas maduras, **D)** Genotipo de Atlixco asintomático a 28 °C con presencia de tilosas inmaduras.

2.5.4. Presencia de tilosas en genotipos muertos

En los portainjertos muertos de Thomas y Duke-7, reportados como tolerantes a *P. cinnamomi*, se encontró mayor cantidad de tilosas en la raíz a 17 °C, mientras que a 28 °C en Tepetl y Duke-7 el porcentaje de tilosas en el xilema fue de 0%. El mayor porcentaje de tilosas se observó en Thomas con 1.12% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Presencia de tilosas en el xilema de genotipos de aguacate muertos, con marchitez y asintomáticos cultivados a dos temperaturas

Genotipos	Contenido de tilosas (%)					
	Muertos		Con marchitez		Asintomáticos	
	17 °C	28 °C	17 °C	28 °C	17 °C	28 °C
Duke-7	4.00 ab [†]	0.08 b	4.40 a	- [‡]	-	2.96 b
Thomas	4.80 a	1.12 a	0.00 b	4.00 b	1.60 b	0.56 c
Tepetl	0.08 b	0.00 b	1.44 b	2.56 b	14.72 a	13.44 a
Tepeyanco	-	-	-	13.52 a	3.76 b	2,24 b
Atlixco	-	-	-	7.52 ab	1.52 b	11.92 a
DMS	2.03	1.01	2.13	10.64	6.15	7.87
CV (%)	190.37	497.14	180.82	219.35	160.42	161.41

DMS: diferencia mínima significativa, CV: coeficiente de variación

[†]Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Duncan con $p < 0.05$.

[‡]No fueron evaluados.

El patógeno superó las estructuras de defensa penetrando las tilosas del xilema, mostrando la destrucción del tejido celular causado por la enfermedad, por lo que se deduce que las plantas son susceptibles por activar lentamente sus mecanismos de defensa contra *P. cinnamomi*. Respecto a la formación de tilosas, Dimond (1955), Misaghi *et al.* (1978) y Cruz *et al.* (2006) señalan que la sintomatología de marchitamiento se debe principalmente a que el micelio supera las barreras estructurales avanzando inter e intracelularmente, induciendo hidrólisis de la

pared celular al causar la destrucción de raíces e impedir la absorción de agua, nutrientes y finalmente la muerte de las plantas.

2.5.5. Presencia de tilosas en genotipos con síntomas de marchitez

En los portainjertos comerciales conocidos por su resistencia a síntomas de marchitamiento, Duke-7 mostró un elevado porcentaje (4.40%) de tilosas en el xilema a 17 °C, mientras que Thomas presentó 0% de tilosas. El genotipo Tepetl a 17 y 28 °C presentó entre 1.44 y 2.56% de tilosas en comparación con Thomas que presentó entre 0 y 4% a 17 y 28 °C, respectivamente. El porcentaje más elevado de tilosas a 28 °C lo obtuvieron la raza Mexicana de Atlixco y Tepeyanco (Cuadro 2) genotipos que pueden ser considerados como resistentes a la marchitez causada por *P. cinnamomi*. Aparentemente, las tilosas son producidas para limitar la invasión del micelio, de aquí que no todas las variedades tienen la capacidad de producir una o más tilosas como mecanismo de defensa para impedir el avance del micelio. Estas tilosas se forman debido a los cambios producidos en la pared celular, al penetrar el patógeno a través de las células del xilema de la raíz, enviando señales de bloqueo celular a las demás células para impedir el paso del micelio (Sepúlveda *et al.* 1979 y Grant *et al.* 1984).

2.5.6. Presencia de tilosas en genotipos asintomáticos

La presencia de tilosas en los genotipos de aguacate asintomáticos fue estadísticamente diferente (Cuadro 2). El genotipo Tepetl presentó mayor porcentaje de tilosas a 17 y 28 °C, mientras que Atlixco presentó mayor contenido de tilosas en el

xilema a 28 °C (Figura 1 D). La menor formación de tilosas en el xilema a 17 °C la presentaron Thomas, Atlixco y Tepeyanco y el porcentaje más bajo se observó en Thomas a 28 °C (Figura 1 C). Cruz *et al.* (2006) señalan que en algunas variedades, las tilosas se forman cuando el patógeno se encuentra en raíces jóvenes y tienen la función de obstruir el paso del patógeno, bloqueando su avance y permitiendo que las plantas permanezcan libres del patógeno, a lo cual se atribuye la tolerancia-resistencia de los genotipos de Tepeyanco y Atlixco.

2.5.7. Compuestos fenólicos en genotipos muertos

En los cortes histológicos, otra característica observada como mecanismo de defensa química en genotipos muertos frente a la infección causada por *P. cinnamomi* fue la acumulación de compuestos fenólicos de color rojo. El depósito de compuestos fenólicos más elevado se presentó en Tepetl y Thomas (70.32 y 62.08%) a 17 °C, mayores que en Duke-7 (37.44%). Los porcentajes más bajos de contenido de fenoles a 28 °C se presentaron en los portainjertos comerciales Duke-7 y Thomas en comparación con el genotipo Tepetl en la que se observó una mayor cantidad de depósito de compuestos fenólicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Presencia de compuestos fenólicos en células de raíces en genotipos de aguacate muertos, con marchitez y asintomáticos inoculados con *Phytophthora cinnamomi* a dos temperaturas

Genotipos	Contenido de fenoles en raíz (%)					
	Muertos		Con marchitez		Asintomáticos	
	17 °C	28°C	17 °C	28 °C	17 °C	28 °C
Duke-7	37.44 b [†]	34.24 c	42.88 b	- [‡]	-	44.40 c
Thomas	62.08 a	59.92 b	51.12 b	58.48 b	41.52 b	89.20 a
Tepetl	70.32 a	73.60 a	67.68 a	56.16 b	71.36 a	57.00 b
Tepeyanco	-	-	-	83.92 a	71.92 a	34.96 c
Atlixco	-	-	-	47.28 b	18.40 c	58.40 b
DMS	15.18	14.89	17.40	16.60	19.38	16.87
CV (%)	39.84	33.92	46.95	33.16	48.36	37.91

DMS: diferencia mínima significativa, CV: coeficiente de variación

[†]Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Duncan con $p < 0.05$. [‡]No fueron evaluados.

El incremento de compuestos fenólicos es un mecanismo de respuesta ante la presencia de micelio (Cruz *et al.* 2006). El depósito de estos fenoles está estrechamente relacionado con la defensa histológica frente a la severidad de la infección y supervivencia de la planta ante la invasión del patógeno en plantas muertas (Del Río *et al.* 2002). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la mayor acumulación de compuestos fenólicos en células colapsadas en ambas temperaturas. Asimismo, se observaron depósitos de compuestos fenólicos en el xilema y una reducida presencia de micelio en células adyacentes al xilema (información no presentada). Los compuestos fenólicos encontrados por Bekker *et al.* (2007) en raíces de árboles de aguacate infectados con *P. cinnamomi* fueron el ácido 3,4-hidroxibenzoico y el ácido vanilínico, compuestos que al contacto con el patógeno funcionan como barreras físicas y confieren a la pared celular cierta resistencia a la penetración de *P. cinnamomi*.

2.5.8. Compuestos fenólicos en genotipos con síntomas de marchitez

En la cuantificación del depósito de fenoles en plantas con síntomas de marchitez, Tepetl mostró el porcentaje de contenido más alto a 17 °C (67.68%) y el más bajo contenido lo tuvieron los portainjertos Thomas y Duke-7 (procedentes de semilla en segregación). El contenido de fenoles fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en Tepeyanco (83.92%) a 28 °C (Cuadro 3). En Atlixco, Tepetl y Thomas a 28 °C, el contenido de compuestos fenólicos fue entre 47.28 y 58.48%. La presencia de compuestos fenólicos inhibió el desarrollo del patógeno, indicando que la planta se encuentra activando sus mecanismos de defensa asociados a la severidad de la infección causada por el oomicete *P. cinnamomi* (Talboys 1958, Nyerges *et al.* 1975, Oullette *et al.* 1992, Schlosser 1994). La presencia de compuestos fenólicos está asociada a la resistencia a éste patógeno, lo que se ha probado *in vitro* y demostrado que la presencia de polifenoles tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del oomiceto (Candela *et al.* 1995, Fernández *et al.* 1997, Vidhyasekaran 2008).

2.5.9. Compuestos fenólicos en genotipos asintomáticos

El mayor contenido de compuestos fenólicos se presentó en los genotipos Tepeyanco y Tepetl a 17 °C y en el portainjerto Thomas a 28 °C. Sin embargo, el genotipo Atlixco a 17 °C presentó 18.40% de fenoles en la raíz y Tepeyanco a 28 °C tuvo el porcentaje más bajo de éstos compuestos fenólicos. Las plantas asintomáticas tuvieron resistencia al activar sus mecanismos de defensa química. Los compuestos fenólicos actúan como inhibidores bioquímicos producidos en respuesta al daño ocasionado por

P. cinnamomi. Estos resultados muestran que la temperatura no es un factor determinante en la presencia de fenoles en la raíz. La resistencia de la planta está relacionada con el depósito de fenoles, ya que la acumulación rápida y temprana de compuestos fenólicos en el sitio de infección es una respuesta de defensa. Esta respuesta de acumulación de fenoles antifúngicos generalmente se producen en mayor cantidad en el momento de la infección (De Ascensao *et al.* 2000). Estas barreras químicas forman bandas en las células con compuestos fenólicos antifúngicos que refuerzan la pared celular brindándole resistencia (Oullette *et al.* 1992 y Cruz *et al.* 2006). Lo anterior explica el porqué algunas plantas son asintomáticas tras la inoculación de *P. cinnamomi*.

2.6. CONCLUSIONES

La cantidad de micelio en el xilema de genotipos de aguacate muertos se debió a su susceptibilidad que culmina con la muerte sin importar la temperatura. Los porcentajes más altos de presencia de micelio en el xilema se observó en Tepetl y el portainjerto comercial Thomas cuando presentaron síntomas de marchitez a 17 y 28 °C, lo que indica que permiten el establecimiento y desarrollo del patógeno dentro de la raíz. A nivel histológico, las plantas de las selecciones Tepeyanco y Atlixco, raza Mexicana, son genotipos resistentes por presentar síntomas de marchitez a 28 °C, las tilosas fueron suficientes para impedir el desarrollo de *P. cinnamomi* y mostrar mayor porcentaje de plantas asintomáticas macroscópicamente aún con presencia de micelio en el xilema.

Los portainjertos Thomas a 17 °C y Duke-7 a 28 °C se consideran tolerantes por mostrar porcentaje similar de tilosas en plantas con síntomas de marchitez. En los genotipos asintomáticos de las selecciones de Tepetl y Tepeyanco tuvieron un aumento porcentual en la presencia de micelio en el xilema a 17 y 28 °C. Estos genotipos son considerados resistentes por estar en contacto íntimo con *P. cinnamomi* a pesar de que no presentaron síntomas macroscópicos. Las selecciones de la raza Mexicana de Tepeyanco, Atlixco y Tepetl mostraron resistencia al activar oportunamente sus mecanismos de defensa histológica estructural y química.

2.7. LITERATURA CITADA

- Andrade, HP; De León, C; Espíndola, BMC; Alvarado, RD; López, JA; García, ER. 2012. Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. usando temperaturas controladas. Spanish J. of Rural Development. 4:1-8.
- Agrios, GN. Fitopatología. 2010. 2da. ed. Edit. Limusa. D.F., México. 856 p.
- Bekker, T; Aveling, T; Kaiser, C; Labuschagne, N; Regnier, T. 2007. Accumulation of total phenolics due to silicon application in roots of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi*. Sixth World Avocado Cong. Villa del Mar, Chile., p. 1-11.
- Candela, ME; Alcazar, MD; Espín, A; Egea, C; Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *capsicum annum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathol. 44:116-123.
- Cruz, BM; Hernández, F; Rivas, FE. 2006. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. La Habana, Cuba. Temas de Ciencia y Tecnol. 29:45-54.
- De Ascensao, AR; Dubery, IA. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Phytochem. 63:679-686.

- Del Río, JA; González, A; Fuster, MD; Botía, JM; Gómez, P; Frías, V; Ortuño, A. 2002. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathol. Medit.* 40:S394–S399.
- Dimond, AE. 1955. Pathogenesis in the wilt diseases. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6:329-350.
- Fernández, PS; Liddell, CM. 1997. Resistance of *capsicum annum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathol.* 87:529.
- Gallo, LL. 1992. Update of Canary Island research on West Indian avocado rootstocks tolerant/resistance to *Phytophthora* root rot. *Proc. of second world avocado Cong.* p.105-110.
- Gallo, LL; Pérez, ZS; Siverio, DRF. 1999. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en patrones de aguacate de raza antillana. *Rev. Chapingo, Serie Hortic.* 5:275-277.
- García, AF; Fraile, A. 1996. *Patología vegetal.* Edit. Phytoma. Soc. Española Fitopatol. 25 p.
- Grant, BR; Byrt, PN. 1984. Root temperature effects on the growth of *Phytophthora cinnamomi* in the roots of *eucalyptus marginata* y *E. calophylla*. *Phytopathology.* 74:179-184.

- Hobbes, M. 2004. Induced resistance for the control of Dutch elm disease. Invest. Agrar. Sist. Recur. For. 13:185-196.
- López, CML; Márquez, GJ; Murguia, SG. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. 2a Ed. Las prensas de ciencias. Fac. Ciencias, UNAM. Méx. 178 p.
- Misaghi, IJ; Devay, JE; Duniway, JM. 1978. Relationship between occlusions of xylem elements and disease symptoms in leaves of cotton plants infected with *Verticillium dahlia*. Can. J. Bot. 56:339-342.
- Niks, RE; Lindhout, WH. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Dept. Plant Breeding. Wageningen Univ. 216 p.
- Nyerges, P; Szabo, E; Donko, E. 1975. The role of anthocyan and phenol compounds in the resistance of grapes against *Botrytis* infection. Acta Phytopathol. Acad. Scient. Hung. 10:21-32.
- Ouellette, GB; Rioux, D. 1992. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch Elm Disease. In Blanchette, A; Biggs, R. Defense Mechanisms of woody plants against fungi. Edits. Springer-Verlag, Berlin., p. 257-310.
- Petri, L. 1912. Observations on grapevine wood alterations following wounding. Speriment. Agr. Italiane 45:501-547.
- SAS Institute, Inc. 2001. SAS/STAT User guide. Release 9.0. ed. North Carolina, USA. 1289 p.

- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30:3875-3883.
- Schlosser, E. 1994. Preformed phenols as resistance factors. *Acta Hort.* 381:615-630.
- Sepúlveda, RP; Álvarez, AM; Botti, GC; Valenzuela, BJ; Sepúlveda, RG. 1979. Estudio morfoanatómico del amarillamiento de la vid (*Vitis vinifera* L.). *Agric. Téc. Chile* 39:95-102.
- Talboys, PW. 1958. Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Rev. Appl. Micol.* 37: 673.
- Téliz, OD; Mora, AJA. 2007. El manejo integral parcial del aguacate. In Téliz, OD; Mora, A. El aguacate y su manejo integral. 2a. ed. (Eds.). Editorial Mundi-Prensa, Méx. D. F., p. 287-306.
- Vidales, FJA; Alcántar, RJJ. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands) del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Rev. Chapingo, Serie Hortic.* 5:255-259.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plant and crops. Molecular biology and host defense mechanisms. 2nd. ed. CRC Press. Florida, USA. 509 p.
- Vleeshouwers, GAAV; Dooijeweert, WV; Govers, F; Kamoun, S; Colon, LT. 2000. The hypersensitive response is associated with host and non host resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210:853-864.
- Zentmyer, GA; Schieber, E. 1987. The search for resistance to *Phytophthora* root rot in Latin America. *South African Avocado Growers Assoc. Yearbook* 10:109-110.

CAPITULO III. Totipotencialidad en plántulas de aguacate como expresión de resistencia a *Phytophthora cinnamomi*

3.1. RESUMEN

La identificación de resistencia en plántulas de aguacate criollo raza Mexicana, responden de forma natural a la infección por *P. cinnamomi*. Esta respuesta se debe a la variación genética basada en la supervivencia y en la capacidad totipotencial después de la inoculación con el oomicete. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar resistencia en plántulas para inducir totipotencialidad después de la inoculación “formación de nuevas plántulas”. En la selección de plántulas de aguacate para resistencia se realizaron dos ensayos, en el primer ensayo se inocularon plántulas de seis genotipos de aguacate Atlixco, Tepeyanco, Tepetl, Toliman, Colín V-33 y Thomas (233 de 5 cm y 338 plántulas de 15 a 20 cm de altura) con un aislamiento virulento de *P. cinnamomi*, en el segundo ensayo se inocularon solamente plántulas de los genotipos Tepeyanco y Atlixco (160 plántulas de 5 cm de altura). La inoculación de plántulas en etapas avanzadas de crecimiento (15 a 20 cm de altura) y en etapa juvenil (5 cm de altura) permite detectar resistencia a *P. cinnamomi*. La población de plántulas Atlixco es fuente importante de resistencia debido a que tuvo mayor número de nuevos brotes de plántulas totipotenciales y plántulas asintomáticas. Los genotipos Toliman, Tepetl y Thomas en etapa juvenil son considerados susceptibles. Colín V-33 puede ser portainjerto tolerante-resistente a *P. cinnamomi*. Atlixco y Tepeyanco son considerados resistentes-tolerantes al marchitamiento del aguacatero y al cancro producido por *P. cinnamomi*.

Palabras clave: *Persea americana* Mill, oomicete, regeneración de brotes, tristeza del aguacatero, cancro.

CHAPTER III. Totipotency in avocado seedling as an expression of resistance to *Phytophthora cinnamomi* Rands

3.2. ABSTRACT

The identification of resistance in seedlings of native Mexican race avocado, naturally respond to infection by the oomycete *P. cinnamomi*. This response is due to genetic variation based on the survival and totipotential capability after inoculation with the oomycete. The aim of this work was to induce resistance in seedlings after inoculation and totipotential "formation of new seedlings." In selecting for resistance avocado seedlings were of six genotypes of avocado Atlixco, Tepeyanco, Tepetl, Toliman, Colín V-33 and Thomas (233 seedlings of 5 cm height and 338 seedlings of 15-20 cm height) two trials, were seedlings inoculated with a virulent isolate of *P. cinnamomi*, in the second trial only seedlings of genotypes Tepeyanco and Atlixco (160 seedlings of 5 cm height). Were inoculated seedlings in advanced stages of growth (15 to 20 cm height) and juvenile stage (5 cm height) to detect resistance to *P. cinnamomi*. Atlixco seedling population is an important source of resistance as it had the largest number of new shoots of seedlings and totipotent asymptomatic seedlings. The seedlings genotypes Toliman, Tepetl and Thomas are considered susceptible. Colín V-33 can be classified as tolerant-resistant rootstocks to *P. cinnamomi*. Atlixco and Tepeyanco are considered tolerant- resistant avocado wilt and canker caused by *P. cinnamomi*.

Keywords: *Persea americana* Mill., oomycete, shoot regeneration, sadness of avocado, canker.

3.3. INTRODUCCIÓN

El oomicete *Phytophthora cinnamomi* causa la pudrición de la raíz y es la enfermedad más destructiva e importante del aguacate en todo el mundo (Zentmyer, 1980, Erwin *et al.* 1996). En México, una de las principales limitantes en la producción de aguacate es la pudrición de raíces producida por este patógeno. En 1994, esta enfermedad causó la muerte de cien mil árboles de aguacate *Persea americana* variedad Hass en Uruapan, Mich., disminuyendo la producción con pérdidas económicas para los productores por más de 32 millones de pesos (Vidales *et al.* 1999 y Newett *et al.* 2002). Este oomicete, también ocasiona 90% de incidencia de canchros en el tronco del aguacate, reduciendo la producción y superficie cultivada en la región de Michoacán (Zentmyer 1980 y Ceja *et al.* 2000).

La marchitez del aguacate causada por *P. cinnamomi* se describió por primera vez en Puerto Rico, en 1927, y actualmente se puede encontrar en casi todas las áreas productoras del mundo (Zentmyer 1980, Zentmyer 1985, Erwin *et al.* 1996, Pegg *et al.* 2008). Este patógeno invade la base del tronco en donde se desarrolla como un cancro que llega a alcanzar de 1 a 2 m de altura, y que se caracteriza por presentar coloraciones de café claro a oscuras y exudaciones acuosas (Zentmyer 1980 y Ceja *et al.* 2000). En 1959, en California EEUU., se observaron por primera vez síntomas de cancro en árboles de macadamia (*Macadamia integrifolia* y *Macadamia tetraphylla*) y aguacate. En 1960, se comprobó que el agente causal del

cancro en estos árboles es ocasionado por *P. cinnamomi* (Zentmeyer *et al.* 1961 y Zentmeyer 1980).

El oomicete sobrevive por largos períodos en el suelo, incluso sin el hospedante, por lo que, una vez establecido en una región determinada, su erradicación es difícil. Las medidas de control para este fitopatógeno son la aplicación de fungicidas Ridomil® (metalaxil) y prácticas culturales. Sin embargo, los intentos de control de esta enfermedad presenta algunas limitaciones, el uso de portainjertos tolerantes-resistentes es la alternativa más efectiva para el control de la enfermedad (Pegg *et al.* 2008).

En un principio el origen de los portainjertos de aguacate no era de importancia para los viveristas quienes buscaban cualquier tipo de semilla disponible. Actualmente, Pegg *et al.* (2008) mencionan que en Michoacán, Méx. los portainjertos se obtienen a partir de semilla de árboles fuertes y sanos. Por otra parte, a inicios de 1940 en California, E.U.A. se determinó que *P. cinnamomi* Rands causaba pudrición de las raíces del aguacate, propiciando la investigación tendiente a la búsqueda de portainjertos tolerantes a éste oomicete. En 1960, Zentmyer colectó semillas de aguacate de varias regiones de México y el Caribe, y las colecciones más importantes fueron las provenientes de Atlixco, Puebla, región conocida por su gran variación genética (Anderson 1950). Estas colecciones de semillas y esquejes presentaban cierto nivel de tolerancia a la enfermedad (Zentmyer 1961). En México, el éxito de la

producción de aguacate Hass se debe a que se encuentra injertado sobre el material criollo de la raza Mexicana var. *drymifolia*.

Zentmyer *et al.* (1994) propuso la selección y desarrollo de portainjertos resistentes como el mejor método para el control de *P. cinnamomi*. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue seleccionar portainjertos resistentes a *P. cinnamomi* a partir de plántulas de 5 cm y de 15 a 20 cm de altura provenientes de semillas de la raza Mexicana (var. *drymifolia*), e identificar resistencia por medio de brotes totipotenciales después de la inoculación. La resistencia en plántulas criollas de aguacate raza Mexicana responden de forma natural a la infección de *P. cinnamomi*. Esta respuesta de resistencia en genotipos criollos se debe a la fuente de riqueza genética basada en la supervivencia y en la capacidad de generación de nuevos brotes después de la infección causada por el oomicete.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

La selección de resistencia en plántulas de aguacate se llevó a cabo en dos ensayos, en el primero se utilizaron de 90 a 148 semillas de la raza Mexicana, colectadas de árboles en producción en Atlixco, Pue. y Tepeyanco, Tlax. Éstos genotipos se denominaron como Atlixco y Tepeyanco. El portainjerto comercial Thomas (20) y los genotipos Tepetl (20), Toliman (20) y Colín V-33 (51), provenientes de semilla, fueron

proporcionados por la Fundación Salvador Sánchez Colín, CICTAMEX S.C. ubicada en Coatepec Harinas, Estado de Méx. (altitud de 2, 260 msnm, latitud de 18° 48' 08'' y longitud de 99° 42' 56'').

Como fuente de inóculo se utilizó el aislamiento de *P. cinnamomi* CPO-PCU (por sus siglas de registro en el Genbank: Colegio de Postgraduados-*Phytophthora cinnamomi* de Uruapan, número de acceso al Genbank JQ266267) muy virulento, aislado de Uruapan, Michoacán, Méx. El oomicete se reactivó en medio agar jugo-V8® a 28°C durante 8 días. Posteriormente, se transfirieron 10 rodajas del medio de cultivo de 5 mm de diámetro a matraces de 500 mL con medio líquido jugo-V8® (Figura 1) y se incubó a 28 °C. Diez días después de incubación y multiplicación del oomicete, se procedió a cuantificar el número de fragmentos de micelio por mililitro con un hematocitómetro Neubauer.



Figura 1. Cultivo del aislamiento CPO-PCU de *P. cinnamomi* en medio líquido jugo-V8®.

Las semillas se sembraron en macetas de plástico (capacidad de 1 L) con peat moss[®], suelo agrícola y agrolita[®] (2:2:1) previamente esterilizados por 4 h a 15 lb de presión durante 2 días consecutivos. Previo a la inoculación de los genotipos de aguacate, se hicieron cuatro orificios de 3 cm de profundidad en el suelo circundante a la raíz de plántulas de 5 cm y de 15 a 20 cm de altura en donde se depositaron 200 mL de la suspensión de micelio de *P. cinnamomi* (2.5×10^3 mL), durante el experimento la humedad del suelo se mantuvo a 90%. Las observaciones se realizaron ocho días después de la inoculación, donde se evaluó el número de plántulas muertas, número de plantas con desarrollo de cancro y plántulas asintomáticas así como el porcentaje de plántulas que mostraban rebrotes totipotenciales, en 1959 Reinert utilizó este término refiriéndose a las plantas que tienen la capacidad de rebrotar y formar plantas completas (CIAT 1999 y Martínez-Gómez *et al.* 2004).

En el segundo ensayo, se inocularon 160 plántulas de Tepeyanco y Atlixco de 5 cm de altura. La tolerancia-resistencia se determinó contabilizando el número de plántulas muertas, aquellos con síntomas de cancro y las plántulas asintomáticas. Simultáneamente, se registró la frecuencia de brotes nuevos después de la muerte de la primera plántula. Con el propósito de evitar escape a la infección los nuevos brotes se reinocularon con 200 mL del concentrado micelial de *P. cinnamomi* (2.5×10^3 mL). Posteriormente, en los brotes nuevos se registró el porcentaje de mortalidad causada por *P. cinnamomi* y el número de plántulas asintomáticas.

Los datos del número de plántulas muertas, con cancro, asintomáticas y el número de brotes nuevos entre genotipos se analizaron con la prueba de χ^2 (Herrera *et al.* 2005). Los datos fueron analizados utilizando el software SAS[®] V. 9.0 para Windows (SAS Institute 2002).

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros síntomas de la enfermedad se presentaron de 10 a 20 días después de la inoculación. Estos se caracterizaron por una marchitez en la parte aérea, pudrición de raíces, clorosis general y pérdida de turgencia. Estos síntomas pueden presentarse en cualquier etapa biológica de la planta, desde plántula hasta árboles en producción (Zentmyer 1985 y Téliz *et al.* 2007). Otro síntoma observado frecuentemente fue el desarrollo de cancro en el tallo que se caracterizó por presentar coloraciones de café claro a oscuras y exudaciones acuosas (Zentmyer 1980 y Ceja *et al.* 2000). Esta sintomatología generalmente provoca la muerte de las plántulas de aguacate. La variación genética de los genotipos evaluados en plántulas asintomáticas permitirá obtener portainjertos promisorios tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* (Cuadro 1).

La prueba de χ^2 mostró que existen diferencias altamente significativas entre los genotipos evaluados, donde los genotipos Atlixco y Tepeyanco de la raza Mexicana, al inocularse en su etapa de desarrollo de 5 cm de altura con *P.*

cinnamomi, presentaron mayor número de plantas con cancro (21 y 8), mientras que las selecciones Tepeyanco, Atlixco y Colín V-33 resultaron en un mayor número de plantas muertas (60, 38 y 21) y altos porcentajes de mortalidad que oscilaron entre 40 y 90% (Cuadro 1). Sin embargo, en los genotipos Tepetl, Toliman y Thomas hubo muerte total de plantas, aun cuando el número de plantas evaluadas fue variable en cada genotipo de aguacate (Cuadro 1).

Los genotipos Tepeyanco y Atlixco de raza Mexicana presentaron mayor número de plantas asintomáticas (22 y 31) y mostraron mejor tolerancia-resistencia ante la infección de *P. cinnamomi*. El portainjerto Thomas en árbol adulto es considerado como resistente al oomicete (Menge 1999), pero en la etapa de plántula es susceptible (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ensayo 1. Sintomatología en plántulas de aguacate con 5 cm de altura inoculadas con *P. cinnamomi* para selección de resistencia

Genotipos	Número de plántulas inoculadas	Cancro		Mortalidad		Asintomáticas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Atlixco	90	21 [†]	23.33	38	42.22	31	34.44
Colín V-33	23	0	0.00	21	91.30	2	8.78
Thomas	10	0	0.00	10	100	0	0.00
Toliman	10	0	0.00	10	100	0	0.00
Tepetl	10	0	0.00	10	100	0	0.00
Tepeyanco	90	8	8.89	60	66.67	22	24.44
		$\chi^2 = 43.09$ p < 0.001		$\chi^2 = 18.36$ p < 0.0025		$\chi^2 = 18.0037$ p < 0.0029	

[†] χ^2 con p < 0.001).

En los genotipos de aguacate inoculados en etapa de plántula de 15-20 cm de altura, las pruebas de χ^2 ($p < 0.001$) mostraron diferencias estadísticas significativas en los diferentes síntomas causados por *P. cinnamomi*. Las selecciones Tepeyanco y Atlixco, tuvieron mayor número de plántulas con cancro y mortalidad en comparación con Thomas, Toliman, Tepetl y Colín V-33, que tuvieron menor valor porcentual de plantas con cancro (Cuadro 2).

Los síntomas del cancro del tallo en plántulas se observaron a los 10 y 25 días de inoculados mostrando una necrosis en la epidermis del tallo desde su base de la plántula y hasta 1 cm de longitud arriba de la base. En el tallo, la necrosis se extendió de 15 a 20 cm a los 90 días (Figura 2) cuando las plántulas mostraron síntomas de cancro en la epidermis del tallo, posteriormente se observó marchitez y finalmente murieron. Estos síntomas coinciden con las observaciones realizadas por Ceja *et al.* (2000). Desde 1959, se determinó por primera vez en California, EEUU., que *P. cinnamomi* era el agente causal del cancro en árboles de macadamia (*Macadamia integrifolia*) y aguacate (*Persea americana*) (Zentmyer *et al.* 1961 y Zentmyer 1980).

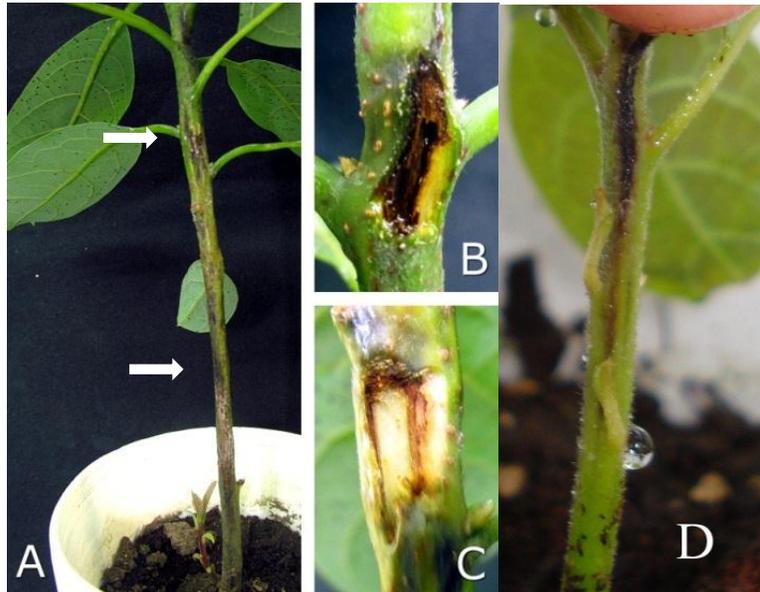


Figura 2. **A)** Cancro en plántulas de aguacate causado por *P. cinnamomi* (inoculadas de 15 a 20 de altura), **B)** exudaciones acuosas, **C)** Cancro con coloraciones de café claro a oscuras **D)** plántulas con necrosis y constricción del tallo (inoculadas a 5 cm de altura)

Los genotipos Tepeyanco, Atlixco, Colín V-33, Toliman y Tepetl presentaron mayor mortalidad de plántulas en comparación con Thomas (Cuadro 2). Entre los genotipos se encontraron 99 y 62 plántulas de los genotipos Tepeyanco y Atlixco como tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi*, al mostrar mayor cantidad de plántulas asintomáticas. Thomas se considera tolerante cuando presentó 6 (60%) plantas asintomáticas. Las selecciones de Colín V-33, Tepetl y Toliman se consideran susceptibles al presentar 1 y 4 respectivamente, plantas asintomáticas debido a que la mayor población de plántulas se distribuyó en síntomas de cancro y mortalidad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ensayo 1. Sintomatología en plántulas de aguacate con 15 a 20 cm de altura inoculadas con *P. cinnamomi* para seleccionar resistencia

Genotipos	Número de plántulas inoculadas	Frecuencia de infección por <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de 15 a 20 cm de altura					
		Cancro		Mortalidad		Asintomáticas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Atlixco	132	38 [†]	28.79	32	24.44	62	46.97
Colín V-33	28	4	14.29	19	67.86	4	14.29
Tepetl	10	4	40.00	5	50.00	1	10.00
Tepeyanco	148	13	8.78	36	24.32	99	66.89
Thomas	10	1	10.00	3	30.00	6	60.00
Toliman	10	3	30.00	6	60.00	1	10.00
		$\chi^2 = 23.1463$ p<.0003		$\chi^2 = 29.7182$ p<.0001		$\chi^2 = 44.6981$ p<.0001	

[†] χ^2 con p<0.001.

En genotipos de aguacate inoculados a edad temprana (5 cm de altura) es posible encontrar resistencia a *P. cinnamomi*, debido a que se pueden detectar diferencias entre los genotipos de aguacate evaluados. Los genotipos Atlixco y Tepeyanco mostraron ser fuente importante de resistencia ya que presentaron mayor número de plantas sanas (asintomáticas) que no tuvieron ningún síntoma provocado por el oomicete (Cuadro 1 y 2) en etapa de plántulas (5 cm de altura) y aún en etapa más avanzada de crecimiento (15 a 20 cm de altura).

Los materiales evaluados para resistencia en plántulas inoculadas con *P. cinnamomi* emitieron brotes nuevos tras morir el primer brote, fenómeno biológico que se conoce como totipotencialidad (CIAT 1991). En el Cuadro 3 se muestra el número de rebrotes que se producen después de la inoculación con el oomicete. Las plántulas de 5 cm de altura en los genotipos de Colín V-33, Tepetl, Tepeyanco y Atlixco

presentaron valores porcentuales similares. A pesar de provenir de una población genéticamente variable de plantas la prueba de χ^2 ($p < 0.05$) no mostró diferencias estadísticas significativas entre los genotipos de aguacate para la generación de nuevas plántulas. Sin embargo, Thomas y Toliman no formaron nuevos brotes de plántulas después de la inoculación con *P. cinnamomi*. La ausencia de nuevos brotes se debe a la incapacidad y baja frecuencia genética del carácter.

Cuadro 3. Ensayo 1. Inoculación de plántulas de aguacate de 5 cm de altura para inducir la totipotencialidad

Frecuencia totipotencial e infección <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de 5 cm de altura							
Genotipos	Número de plántulas inoculadas	Nuevos brotes		Mortalidad		Asintomáticas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Atlixco	90	12 [†]	13.33	2	16.67	10	83.33
Colín V-33	23	4	17.39	1	25.00	3	75.00
Tepetl	10	2	20.00	2	100	0	0.00
Tepeyanco	90	15	16.67	5	33.33	10	66.67
Thomas	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Toliman	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00
		$\chi^2 = 4.29$ $p < 0.5081$		$\chi^2 = 5.77$ $p < 0.1231$		$\chi^2 = 5.77$ $p < 0.1231$	

[†] χ^2 con $p < 0.001$.

El genotipo Atlixco presentó bajo porcentaje de mortalidad (Cuadro 3), mientras que Colín V-33 y Tepeyanco mostraron 25 y 33.33% de muerte, respectivamente, mientras que Tepetl presentó 100% de mortalidad después de 10 días de la inoculación. Los genotipos Atlixco y Tepeyanco se consideran resistentes a *P. cinnamomi*, al mostrar el porcentaje más alto de rebrotes asintomáticos (equivalente a

10 nuevos brotes) en comparación con el genotipo Colín V-33 que sólo tuvo 3 brotes de plántulas asintomáticas (Cuadro 3).

La inoculación en plántulas de 5 cm de altura estimuló la totipotencialidad (capacidad de rebrotación) En la Figura 3 se muestra la muerte de la primera plántula tras la inoculación con *P. cinnamomi* y la formación del nuevo brote con el desarrollo de una raíz principal y raíces adventicias vigorosas. La capacidad de regenerar nuevas raíces en estos genotipos es una respuesta de resistencia genética basada en la supervivencia y capacidad totipotencial. Esta variación genética se puede observar cuando las plántulas o portainjertos provienen principalmente de semillas de raza Mexicana. Por lo anterior, la mayoría de los árboles de aguacate en Australia y México están injertados sobre portainjertos de semillas procedentes de árboles de polinización libre, que provee la posibilidad de que exista una variación genética en sus huertos para la selección de resistencia a *P. cinnamomi*. Pegg *et al.* (2008) mencionan que los portainjertos australianos sobreviven y prosperan en condiciones de alta presión de inóculo debido a la capacidad de los portainjertos para regenerar rápidamente nuevas raíces.



Figura 3. Totipotencialidad en plántulas de Atlixco y Tepeyanco con 5 cm de altura, 10 días después de la inoculación con *P. cinnamomi*.

Los resultados obtenidos en los estudios de la formación de nuevos brotes tras la inoculación sugieren que Tepeyanco, Atlixco y Colín V-33 pueden considerarse como tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi*. Este fitopatógeno, de acuerdo a la observación en plántulas, podría ser el responsable de provocar mutaciones naturales al inocular en plántulas y provocar la muerte de estas, posteriormente algunas tienen la capacidad regenerar brotes nuevos de plántulas con raíces vigorosas. Aún se desconocen los mecanismos involucrados en la resistencia a la infección de *P. cinnamomi* en plántula de aguacate. Una explicación podría corresponder con los estudios realizados por Ehrenberg *et al.* (1956) quienes mencionan que otras sustancias químicas producidas por hongos pueden llegar raramente a provocar mutaciones; sin embargo, pueden aumentar la proporción de las mutaciones génicas

visibles. Tal es el caso del hongo *Clitocybe nebularis* que aumenta la frecuencia de las mutaciones visibles.

En 1993, Yasseen utilizó bencil adenina y tidiazurón (citocininas) en semillas de aguacate para inducir más de un brote, fenómeno llamado brotes múltiples. Valteur *et al.*, (2011) mencionan la utilización de radiación gamma para inducir policaulismo en semillas a utilizar en la propagación clonal de portainjertos tolerantes a *P. cinnamomi*. Sin embargo, estos trabajos no implican la obtención de portainjertos resistentes a este patógeno ya que las semillas no han sido expuestas a la infección del oomicete.

En la inoculación de plántulas de 15 a 20 cm de altura, χ^2 ($p < 0.05$) no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los genotipos que emitieron nuevas plántulas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ensayo 1. Reinoculación de plántulas a 15 a 20 cm de altura para estimular la totipotencialidad

Frecuencia totipotencial e infección <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de 15 a 20 cm de altura							
Genotipos	Número de plántulas inoculadas	Nuevos brotes		Mortalidad		Asintomáticas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Atlixco	132	8 [†]	6.06	3	37.50	5	62.50
Colín V-33	28	5	17.85	2	40.00	3	60.00
Tepetl	10	3	30.00	1	33.33	2	66.67
Tepeyanco	148	8	5.40	3	37.50	5	62.50
Thomas	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Tolimán	10	1	10.00	0	0.00	1	100
		$\chi^2 = 14.03$ $p < 0.015$		$\chi^2 = 0.62$ $p < 0.960$		$\chi^2 = 0.621$ $p < 0.960$	

[†] χ^2 con $p < 0.001$.

En los brotes reinoculados, el porcentaje de mortalidad fue superior en Colín V-33, Atlixco, Tepeyanco y Tepetl (entre 30 y 40%), se incrementó el porcentaje de plántulas asintomáticas. Los resultados indican que los genotipos Colín V-33, Tepeyanco, Atlixco y Tepetl tienen comportamiento tolerante-resistente a *P. cinnamomi* (Cuadro 4) y pueden utilizarse en zonas productivas de aguacate. Entre los genotipos estudiados Tepeyanco y Atlixco han sido seleccionados por su resistencia a la infección en inoculación de plántulas en la etapa de 5 cm de altura y por producir nuevos brotes con mayor número de plántulas asintomáticas después de la reinoculación.

Segundo ensayo

Con la finalidad de propiciar la estimulación de nuevos brotes y poder obtener individuos que muestran esta capacidad de resistencia promisorio a *P. cinnamomi*, se evaluó un segundo ensayo utilizando plántulas de los genotipos Tepeyanco y Atlixco, posiblemente tienen mayor variabilidad genética por este carácter formación de nuevos brotes.

Las plántulas reinoculadas de 5 cm de altura no mostraron diferencias significativas a la infección entre ambos genotipos, los cuales presentaron número similar de plántulas (40 y 45) con síntomas de cancro. Sin embargo, Atlixco mostró mayor número (81) y porcentaje de plántulas muertas (50.63%) en comparación con Tepeyanco que presentó 27 plántulas muertas (Cuadro 5). En los resultados

obtenidos en plántulas asintomáticas, Tepeyanco tuvo mayor frecuencia de plántulas resistentes (93 que correspondió a 58.13%), mientras que Atlixco tuvo menos número de plántulas sin presencia de síntomas (34 correspondiente a 21.15%).

En la prueba para resistencia en plántulas a la marchitez del aguacatero, se está llevando a cabo simultáneamente un método de selección para resistencia a cancro del tronco, ya que recientemente esta enfermedad en la región de Michoacán alcanzó incidencia de 90% (Ceja *et al.* 2000). Por tanto es de suma importancia contar con portainjertos resistentes no sólo a la marchitez del aguacatero sino también al cancro del tronco.

Cuadro 5. Ensayo 2. Sintomatología en plántulas de aguacate de 5 cm de altura para resistencia a *P. cinnamomi*

Genotipos	Número de plántulas inoculadas	Frecuencia de infección por <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de 5 cm de altura					
		Cancro		Mortalidad		Asintomáticas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Atlixco	160	45 [†]	28.13	81	50.63	34	21.15
Tepeyanco	160	40	25.00	27	16.88	93	58.13
		$\chi^2 = 0.400$ p < 0.5268		$\chi^2 = 40.75$ p < 0.0001		$\chi^2 = 45.44$ P < 0.0001	

[†] χ^2 con p < 0.001.

La estimulación de rebrotes inducidos por la inoculación de los genotipos Atlixco y Tepeyanco fue de 13 y 11 que correspondió a 8.13 y 53.85%, respectivamente, rebrotes de plántulas de una población de 160 plántulas inoculadas (Cuadro 6). La frecuencia de plántulas totipotenciales fue baja debido a que en la

naturaleza ocurre al azar y en bajas frecuencias. Para aumentar la frecuencia de nuevos brotes de ejes embrionarios de aguacate se utiliza la inducción por hormonas de crecimiento (citocininas) (Mohamed *et al.* 1993 y Keightley *et al.* 2009). La reinoculación asegura la infección por *P. cinnamomi* en los nuevos brotes, lo cual fue posible comprobar en esta investigación, debido a que no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el número de plántulas de los genotipos Atlixco y Tepeyanco. Además, el número de plántulas asintomáticas en Atlixco y Tepeyanco no fue significativo, pudiéndose considerar que ambos genotipos son resistentes al cancro y la marchitez del aguacatero (Cuadro 6).

Cuadro 6. Ensayo 2. Inoculación de plantas de aguacate con 5 cm de altura para estimular la totipotencialidad

Genotipos	Número de plántulas inoculadas	Frecuencia totipotencial e infección <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de 5 cm de altura					
		Nuevos brotes		Mortalidad		Asintomáticas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Atlixco	160	13 [†]	8.13	7	53.85	6	46.15
Tepeyanco	160	11	6.88	6	54.55	5	45.45
		$\chi^2 = 0.1802$ $p \leq 0.671$		$\chi^2 = 0.0012$ $p > 0.972$		$\chi^2 = 0.0012$ $p > 0.972$	

[†] χ^2 con $p \leq 0.001$.

3.6. CONCLUSIONES

La inoculación de plántulas (5 cm de altura) permite detectar resistencia a *P. cinnamomi*. La población de plántulas Atlixco es fuente importante de resistencia debido a que tuvo mayor número de nuevos brotes y plántulas sanas (asintomáticas) aún en etapas avanzadas de crecimiento (15 a 20 cm de altura). Asimismo, Atlixco y Tepeyanco se consideran resistentes a la pudrición de raíces del aguacate y al cancro producido por *P. cinnamomi* porque tuvieron el mayor número de plántulas asintomáticas.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la formación de nuevos brotes tras la inoculación, Tepeyanco, Atlixco y Colín V-33 mostraron ser portainjertos tolerantes-resistentes a *P. cinnamomi* en etapas tempranas de crecimiento. Estos resultados muestran nuevas perspectivas para profundizar en los mecanismos de formación de rebrotes como reacción para defensa en plántulas de aguacate raza Mexicana contra la infección causada para *P. cinnamomi*.

3.7. LITERATURA CITADA

- Anderson, E. 1950. Variation in avocado at the rodiles plantation. *Ceiba* 1:50-55.
- Ceja, TLF; Téliz, OD; Osada, KS; Morales, GJL. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. en cuatro municipios del estado de Michoacan, Méx. *Rev. Mex. Fitopatol.* 18:79-86.
- CIAT. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, WM; Mroginski, LA. Eds. Cali, Colombia. 970 p. (En línea) Consultado 10 jun. 2012. http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo6.pdf.
- Ehrenberg, LA; Gustafsson; D. von Wettstein. 1956. Studies on the mutation process in plants. Regularities and intentional control. Wagenningen Chromosome Conf. In: Brauer, HO. *Fitogenética aplicada*. 1987. Mutaciones Cap. 16. Edit. Limusa. 514 p.
- Erwin, D; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN. p. 270-271.
- FAOSTAT. 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (In line) Database consulted 28 April 2012: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Herrera, HJG; Barreras, SA. 2005. Manual de procedimientos (Aplicación del Programa SAS) Análisis estadístico de experimentos pecuarios. 2 ed. Colegio de Postgraduados, México. 215 p.
- Keightley, PD; Halligan, DL. 2009. Analysis and implications of mutational variation. *Genetica* 136: 359-369.

- Martínez-Gómez, P; Sánchez-Pérez, R; Dicenta F; Gradziel, TM. 2004. Caracterización de embriones múltiples en almendro. *In*: Laurens, F; Evans, k. (eds). XI th Eucarpia Symp. On Fruit Breed and Genetics. Acta Hort. 663:819-822.
- Menge, JA. 1999. Screening and Evaluation of New Rootstocks with resistance to *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Research Symposium. Calif. Avocado Soc. Univ. Calif., Riverside. p. 69-72.
- Mohamed-Yasseen, Y. 1993. In Vitro propagation of avocado (*Persea americana* Mill.). Calif. Avocado Soc. Yearbook. 77:107-111.
- Newett, SDE; Crandy, JH; Balerdi, CF. 2002. Cultivars and rootstocks. *In*: Whiley, AW; Schaffer, B; Wolstenholme. Avocado: Botany, production and uses. BN. Eds. CABI Publ., p. 161-187.
- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Coates, L; Whiley, T. 2008. *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. *In*: The Hon. Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australian Rural Woman of the Year Award 2008 to Mrs Ros Smerdon. Canberra. Vol. 19, num. 2. 52 p.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User guide. Release 9.0. North Carolina, USA. 1289 p.
- Téliz, OD; Mora, AA. 2007. Enfermedades del aguacate. p. 171-208. *In*: Téliz, OD; Mora, AA. El aguacate y su manejo integrado, Edit. Mundi-Prensa, Méx.

- Valteur, A; Cantuarias, AT; Ferrari, L. 2011. Use of gamma-ray irradiation on seeds of different avocado cultivars for propagation purposes. VII World Avocado Congress. Cairns, Australia. p. 55.
- Vidales, FJA; Morales, GJL. 1999. Guía para el cultivo del aguacate. Guía técnica núm. 5, CIPAC, INIFAP, SARH. 46 p.
- Yasseen, YM. 1999. *In Vitro* Propagation of Avocado (*Persea americana* Mill.). Calif. avocado Soc. yearbook 77: 107-111.
- Zentmyer, GA; Storey, WB. 1961. *Phytophthora* canker of macadamia trees. Calif. Avocado Soc. Yearbook 45: 107-109.
- Zentmyer, GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* the diseases it causes. Monograph. No. 10. The American Phytopathol. Soc. 96 p.
- Zentmyer, GA. 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 69:89-94.
- Zentmyer, GA; Menge, J; Ohr, H. 1994. Compedium of tropical fruit diseases. *In*: Ploetz, RC; Zentmyer, GA; Nishijima, WT; Rohrbach, KG; Orh, HD. *Phytophthora* root rot. Eds. St. Paul, MN. American Phytopathol. Soc. p. 77-79.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio selectivo PARPH V8-agar

CaCO ₃ (Sigma),	3.5 g/L:	
Agar	18 g	
Jugo V8 (HERDEZ [®])	300 mL	
Agua destilada	700 mL	
		Erwin 1996.
Pentacloronitrobenceno (PCNB)	0.10 g/L	Mitchell <i>et al.</i> 1993.
Ampicilina (SIGMA [®])	0.27 g/L	
Rifampicina (SIGMA [®])	0.01 g/L	
Pimaricina (Delvocid Instant [®] natamicina).	0.02 g/L	
Himexazol		

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión por 20 minutos.

Anexo 2. Características de siembra de aguacate y requerimientos del crecimiento de *P. cinnamomi*

	Crecimiento del árbol de aguacate		Crecimiento de <i>P. cinnamomi</i>			Gallegly, 2008, Erwin <i>et al.</i> 1996, Zentmyer, 1980.
	Observado	Requerida	Mínima	Óptima	Máxima	
pH	6.1	± 6.0	3.5-5	6.5	8.0	
CE	0.63	≤ 2.0				
Temperatura			5°C	24-28°C	32-34°C	

Anexo 3. Características morfológicas de *P. cinnamomi*

Micelio	Cenocítico, coraloide (7 a 8 μm) (Con hinchamientos hifales).		
Esporangios	No papilados y no caducos con formas elipsoides a ovoides.	Elipsoides 85 X 35 μm Ovoides 60 x 34 μm	
Clamidosporas	Esféricas (Con pared gruesa o delgada).	40 μm	Gallegly, 2008, Erwin <i>et al.</i> 1996, Zentmyer, 1980.
Estructuras sexuales			
Oogonio		40 μm	
Oosporas	Pleróticas.	35 μm	
Anteridios	Anfígenos.	18 ancho x 20 μm largo	

Anexo 4. Preparación de colorantes para tinción histopatológica de raíces de aguacate: safranina en metil celosolve

Safranina O	4 g	
Metil celosolve	200 mL	
Alcohol 96%	100 mL	López, <i>et al.</i> 2005.
Agua destilada	5 mL	
Acetato de sodio	4 g	
Formol	8 mL	

Se mezcla la safranina O y el metil celosolve posteriormente se complementa con el resto de reactivos.

Anexo 5. Preparación de colorantes para tinción histopatológica de raíces de aguacate: Verde rápido en metil-celosolve

Verde rápido	0.5 g	
Alcohol absoluto	33.3 mL	
Metil-celosolve	33.3 mL	López, <i>et al.</i> 2005.
Aceite de clavo	33.3 mL	