



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

VARIABILIDAD GENÉTICA Y PATÓGENICA DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDES. EN *QUERCUS SP. PERSEA AMERICANA* Y *PSEUDOTSUGA MENZIESII*.

ALEJANDRA ALMARAZ SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

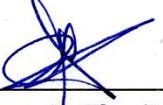
2016

La presente tesis titulada: **Variabilidad genética y patógena de *Phytophthora cinnamomi* Rands, en *Quercus* spp., *Persea americana* y *Pseudotsuga menziesii***, realizada por la alumna: **Alejandra Almaraz Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS
FITOPATOLOGÍA-FITOPATOLOGÍA

CONSEJERO: 
Dr. Dionicio Alvarado Rosales

ASESOR: 
Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR: 
Dr. Armando Equihua Martínez

ASESOR: 
Dr. Sergio Aranda Ocampo

ASESOR: 
Dr. Javier Hernández Morales

Motecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero 2016.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento durante mi programa de estudios doctorales.

Al Colegio de Postgraduados (CP), institución que me brindó su apoyo y sus instalaciones para escalar un peldaño más en mi formación académica.

A los profesores e investigadores de Fitopatología que participaron en mi formación profesional.

Al Dr. Dionicio Alvarado Rosales, por su invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación, pero sobre todo, por su amistad, paciencia, comprensión y su integridad humana.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por su apoyo incondicional, sus valiosas enseñanzas, así como por el apoyo brindado durante la realización de la presente investigación.

Al Dr. Armando Equihua Martínez por su apoyo y amistad, en todo momento y sugerencias durante la realización del trabajo de investigación.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por haber aceptado formar de mi consejo y disponibilidad y sus valiosas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al Dr. Javier Hernández Morales por su apoyo y sugerencias.

Al Dr. Salvador Ochoa Ascencio por su ayuda y aportación de aislamientos de aguacate.

Al Dr. Matteo Garbelotto por las facilidades brindadas durante mi estancia en la Universidad de Berkeley California, USA.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel por su amistad y apoyo brindado en mis estudios de postgrado

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su apoyo brindado un agradecimiento especial.

Ala Dra. María Guadalupe Carrillo Bénitez por su apoyo brindado en este trabajo de investigación en la parte molecular.

Al ing. Claudio Rivera Lozano por su amistad y apoyo de material biológico para la realización de este trabajo.

Al laboratorista Carlos Martínez por su gran apoyo y amistad brindado en todo momento.

Ala M.C. Victoria Ayala Escobar, por su amistad y apoyo.

A Verónica, Hilda, Silvia Macrina, Juan por su amable atención y apoyo en los diversos trámites realizados en el postgrado de Fitosanidad.

A mis compañeros y amigos del postgrado de Fitopatología: Luz, Silvia, Yolanda, Jenny, Carmen, Charly, Sergio, Edgar, Claudia, Magnolia, Lupita, Jaquelin y a todas las personas que directa e indirectamente contribuyeron en la realización de este trabajo y mi formación profesional, GRACIAS.

DEDICATORIA

A DIOS todo poderoso por darme la fortaleza durante este proceso y culminación de la Tesis y estar siempre conmigo en cada instante de mi vida, Mil Gracias

A mi esposo Erick con todo mi amor, por estar siempre a mi lado brindándome ayuda, comprensión y sobre todo por su amor, tiempo y esfuerzo por ser mi compañero, amigo confidente en los momentos difíciles, por tu amor y cariño en cada momento para la realización de este trabajo mil gracias

A mis hijos Gabriel y Carolina quienes son el tesoro más grande que Dios me ha dado y ser mi motor, motivación y fuerza en los momentos de flaqueza.

A mi madre Alejandra Sánchez Jiménez por el gran amor y apoyo ilimitado e incondicional que siempre me ha dado en cada momento por tener siempre sus palabras de aliento en mi vida muchas gracias mami.

A mi Padre Eliseo Almaraz Rodríguez (†) por las enseñanzas que medio en cada momento que compartimos juntos mi respeto y admiración.

A mis hermanos Victoria, Martín, José, Eleazar Beatriz, Tita y Juan por su gran cariño quienes han estado siempre al pendiente de mi ser, brindándome su apoyo incondicional por tener en ustedes a mi maestros y grandes amigos.

A toda la familia cuñadas, cuñados y sobrinos por su motivación para lograr una meta más en mi vida.

A mis compañeros y amigos quienes hicieron ligera la travesía hasta lograr la meta

¡Que Dios los bendiga a todos!

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y PATÓGENICA DE *PHYTOPHTHORA*
CINNAMOMI RANDB, EN *QUERCUS* SPP., *PERSEA AMERICANA* Y
*PSEUDOTSUGA MENZIESII***

Alejandra Almaraz Sánchez, DC.
Colegio de Postgraduados, 2016.

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi (Rands) es un microorganismo de suelo que ha causado grandes pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial, en una amplia gama de hospedantes. Es un parásito facultativo y acuático que puede vivir en el suelo por mucho tiempo causando pudrición de la raíz. El objetivo de este trabajo fue identificar morfológica, patogénica y genética de 64 aislamientos de *P. cinnamomi*, procedentes de cinco regiones de México obtenidos de tres hospedantes con síntomas de la “enfermedad de la tinta”. Los aislamientos se obtuvieron de suelo, cancro y raíz de árboles de *Quercus salicifolia*., de las regiones de El Arrayanal, Colima; Tecoaapa, Guerrero, Manantlán, Jalisco, de *Pseudotsuga menziesii* del Estado de México y de árboles de *Persea americana*, de Michoacán. La caracterización morfológica de los aislados indicó que las colonias desarrolladas sobre medio PDA presentaron un crecimiento lento, coloración blanca de consistencia algodonosa y aspecto de forma de flor camelia para los aislados de Colima, Guerrero, Jalisco y Edo. de México. La patogenicidad del agente causal se realizó tomando un aislamiento de cada una de las cinco regiones de México, siguiendo los postulados de Koch, con plantas sanas de *Quercus mexicana*, *Persea Americana* de seis meses edad y *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad. Los resultados obtenidos indicaron que los cinco aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* son capaces de causar la enfermedad en plantas. El aislamiento de la región del Arrayanal se comportó como el más virulento en los tres hospedantes. Los 64 aislamientos de *Phytophthora* fueron identificados como *Phytophthora cinnamomi* y con un 99 % de

similitud en la base de datos del GenBank del CNBI. Para conocer la variabilidad genética de los aislamientos de *P. cinnamomi* se evaluó a través de Microsatélites (SSR). Se utilizaron cinco primers: d39, e16, g10, g13 (1) y g13(4). Se agregaron 10 aislamientos de otras regiones del mundo de la colección del laboratorio de la Universidad de Berkeley California USA. La distancia genética entre los aislamientos fue calculada por el método de promedios con el programa R (versión;2.10.0). Se formaron cuatro grupos dentro del dendrograma, los aislamientos de *P. cinnamomi* de los hospedantes de *Quercus* spp., *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* de México se encontró similitud con los aislamientos de Papúa Nueva Guinea. El árbol filogenético con los aislamientos de estudio por el método de cálculo de matriz de distancias genéticas; formaron seis clados agrupando la mayoría de los aislamientos de interés con los de Papúa Nueva Guinea.

Palabras claves: *Phytophthora cinnamomi*, identificación, morfológica, molecular
Microsatélites

**PATHOGENICITY AND GENÉTIC VARIABILITY OF *PHYTOPHTHORA*
CINNAMOMI IN *QUERCUS* SPP., *PERSEA AMERICANA* AND *PSEUDOTSUGA*
*MENZIESII***

Alejandra Almaraz Sánchez, DC.
Colegiode Postgraduados, 2016.

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi (Rands) is a soil microorganism that has caused great economic and ecological losses worldwide, in a wide host range. It is a facultative and aquatic parasite that causes root rot and is able to live in soil for long periods of time. The aim of this study was to identify morphological, genetic and pathogenically 64 isolates of *P. cinnamomi* collected from five regions of Mexico, on three hosts showing symptoms of the "ink disease". The isolates were obtained from soil, root or stem cankers on the following hosts and locations: *Quercus salicifolia*, from El Arrayanal, Colima, Tecoanapa, Guerrero and Manantlan, Jalisco; *Pseudotsuga menziesii*, Estado de Mexico and *Persea americana*, Michoacan. Morphological characterization of the isolates showed that colonies developed on PDA medium displayed slow growth, white color, cottony consistency and camellia blossom appearance for the Colima, Guerrero, Jalisco and Edo. de Mexico isolates. Pathogenicity tests were carried out with one isolate from each of the five regions of Mexico, following Koch's postulates, on healthy plants of *Quercus mexicana* and *Persea americana* six months old, and *Pseudotsuga menziesii* three years old. The genetic variability of the isolates was assessed by using the microsatellites (SSR) technique and five primers: d39, e16, g10, g13 (1) and g13 (4). 10 isolates more, from other regions of the world, were added in the analysis. The genetic distance among isolates was calculated by the average method with the R program (version 2.10.0). The results showed that the five isolates of *P. cinnamomi* were able to cause disease. The isolate from El Arrayanal behaved as the most

virulent in the three hosts. The 64 isolates were identified as *Phytophthora cinnamomi* with 99% of similarity with the GenBank database of the CNBI. Four groups in the dendrogram were identified, *P. cinnamomi* isolates from *Quercus* spp., *Pseudotsuga menziesii* and *Persea americana* showed similarity with the Papua New Guinea isolates. Regarding the phylogenetic tree analysis, the distance matrix was used to generate a tree, six clades were formed, most of the Mexican isolates were similar to the ones from Papua New Guinea.

Key words: *Phytophthora cinnamomi*, identification, morphological, molecular, Microsatelites

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
I.INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II.OBJETIVOS	2
CAPITULO I. VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE PHYTOPHTHORA CINNAMOMI RANDES EN ESPECIES FORESTALES MEDIANTE EL USO DE MICROSATÉLITES (SSR).	
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1. Origen y purificación de los aislamientos.....	8
2.2. Identificación morfológica.....	8
2.3. Extracción de ADN genómico de <i>P. cinnamomi</i>	9
2.4. Amplificación de la región ITS.....	12
2.5. Limpieza y obtención de secuencias de los productos PCR.....	12
2.6. Condiciones de la PCR con los cinco primers de Microsatélites.....	12
2.7. Análisis de datos.....	14
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
3.1. Identificación morfológica.....	16
3.2. Extracción de DNA genómico de <i>P. cinnamomi</i>	16

3.3. Identificación molecular por ITS.....	17
3.4. Microsatélites (SSR).....	17
IV. CONCLUSIONES.....	23
V. AGRADECIMIENTO.....	23
VI. LITERATURA CITADA.....	24

CAPITULO II. PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDB. AISLAMIENTOS DE ÁRBOLES FORESTALES EN MÉXICO.

RESUMEN.....	28
ABSTRACT.....	30
I. INTRODUCCIÓN.....	32
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1. Aislamiento de patógeno.....	33
2.2. Identificación morfológica.....	34
2.3. Extracción del DNA genómico de <i>P. cinnamomi</i>	35
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
3.1. Identificación morfológica.....	39
3.2. Pruebas de patogenicidad.....	41
3.3. Caracterización molecular.....	41
IV. CONCLUSIONES.....	44
V. AGRADECIMIENTOS.....	44
VI. LITERATURA CITADA.....	45

CAPITULO III. DETERMINACIÓN DE LA SEVERIDAD DE AISLADOS DE *P. CINNAMOMI* RANDB. EN *PERSEA AMERICANA*, *QUERCUS MEXICANA* Y *PSEUDOTSUGA MENSIEZI*

RESUMEN.....	49
ABSTRACT.....	51

I.INTRODUCCIÓN.....	52
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
2.1. Material vegetal.....	53
2.2. Preparación de inóculo.....	54
2.3. Inoculación por inmersión de raíz.....	54
2.4 Inoculación por riego al sustrato.....	55
2.5. Reaislamiento del patógeno.....	56
2.6. Variables evaluadas para los dos tratamientos.....	56
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
3.1. Inoculación por inmersión de raíz.....	57
3.2. Riego de inóculo al sustrato.....	63
IV. CONCLUSIONES.....	67
V.AGRADECIMIENTOS.....	68
VI. LITERATURA CITADA.....	69

CAPITULO IV. EFECTO DE *TRICHODERMA VIRIDE* Y *TRICHODERMA VIRENS* SOBRE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*, RANDS EN ESPECIES FORESTALES EN INVERNADERO.

RESUMEN.....	71
ABSTRACT.....	73
I.INTRODUCCIÓN.....	74
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
2.1. Fase de campo.....	76
2.2. Fase de laboratorio.....	76
2.3. Aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp.....	76
2.4. Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i>	76
2.5. Aislado de <i>P. cinnamomi</i>	77
2.6. Prueba de celofán de <i>Trichoderma</i> spp. nativa y comercial.....	77
2.7 .Ensayos de <i>Trichodermas</i> spp. en invernadero.....	78
2.8. Variables evaluadas.....	79

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
3.1. Obtención de <i>Trichoderma</i> nativa, aislamiento, purificación e identificación.....	79
3.2. Prueba de celofán de <i>Trichoderma</i> nativas y comercial.....	80
3.3. Ensayos de <i>Trichoderma</i> spp. en el invernadero.....	82
IV. CONCLUSIONES.....	86
V. AGRADECIMIENTOS.....	86
VI. LITERATURA CITADA.....	87

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. A) Aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> de siete días de edad en forma de camelia desarrollándose en medio de cultivo PDA utilizados en este trabajo.....	15
Figura 2. Corrimiento del ADN en gel de agarosa al 1.5% de los 64 aislamientos de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papua New Guinea y uno de Australia.....	16
Figura 3. Dendrograma generado a partir de distancia genética entre los aislamientos por el método de promedios con el programa R (versión;2.10.0) en una población de 64 aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa Nueva Guinea y uno de Australia.....	19
Figura 4. Árbol filogenético bootstrap generado a partir del análisis con cinco primers de microsatélites en una población de 64 aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa Nueva Guinea y uno de Australia.....	20

CAPITULO II

Figura 1. A) Aislados de *P. cinnamomi* de siete días de edad en forma de camelia, desarrollándose en medio de cultivo PDA. Con clave: A) COL-A, B) GRO-P, C) EDO-T encinos, D) JAL-C y E) MICH-P.....38

Figura 2.A) Desarrollo de síntomas en plantas de *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad inoculadas con los diferentes aislados de *P. cinnamomi* clave (COL-A, GRO-P, EDO-T, JAL-C y MICH-P). B) Cancro en plantas. C) Resinación en la base del tallo. D) Progreso de la enfermedad en la planta E) Cancro de coloración café claro a oscuro causado por el aislamiento COL-A. F) Testigo y plantas inoculadas durante las pruebas de patogenicidad. G) Tejido enfermo del aislado COL-A y micelio del organismo en medio selectivo PARHP. H) Aislamiento COL-A de *P. cinnamomi* de siete días en PDA.....42

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % que muestra una banda de aproximadamente 1500 pb del producto amplificado por PCR con los iniciadores ITS4 E ITS5; M. Marcador molecular de 1 kb, carril 1. COL-A., 2. GRO-P., 3. JAL-C., 4. MICH-P y 5. EDO-T.....43

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

Cuadro 1. Aislamientos de *P. cinnamomi* caracterizados molecularmente.....10

Cuadro 2. Primers utilizados para la amplificación de SSR en los 74 aislamientos de *P. cinnamomi*.....13

CAPITULO II

Cuadro 1. Aislados obtenidos de *P. cinnamomi*, empleados en las pruebas de patogenicidad y agresividad en plantas de *Pseudotsuga menziesii*.....36

Cuadro 2. Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la agresividad de la enfermedad de los cinco aislamientos de *Phytophthora cinnamomi*.....40

Cuadro 3. Identificación morfológica y molecular de aislados de *Phytophthora cinnamomi*, número de nucleótidos, especie alineada con el 99 % de confiabilidad y número de acceso en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).....43

CAPITULO III

Figura 1. Escala de severidad de síntomas aéreos de *P. cinnamomi* en plantas *Persea americana*. (0) planta sana (1) planta con pérdida de turgencia (2) follaje hojas un poco seca, enroscada (3) hojas amarillas verdosas y hojas secas (4) planta muerta. Observe la escala de severidad, como a mayor daño en la parte aérea, el % de severidad de daño en raíz también se incrementó.....60

Figura 2. Escala de severidad de síntomas de *P. cinnamomi* de la parte aérea de *Quercus mexicana*. (0) planta sana (1) planta con pérdida de turgencia (2) follaje hojas un poco seca, enroscada (3) hojas amarillas verdosas y hojas secas (4) planta muerta. Observe la escala de severidad como a mayor daño en la parte aérea, el % de severidad de daño en raíz también se incrementó.....60

Figura 3. Desarrollo de los síntomas en *Pseudotsuga mensiezii* en plantas inoculadas con diferentes aislados de *P. cinnamomi*. El testigo presenta un desarrollo normal comparado con las plantas inoculadas.....64

Figura 4. A y B) Progreso de la enfermedad en plantas de *Persea americana*, y *Quercus mexicana* inoculadas con *P. cinnamomi*. C) Tejido enfermo días después de inoculación con el patógeno D, E, F) Siembra de la raíz del tejido enfermo en medio PARPH. G) Crecimiento en forma cameloide de *P. cinnamomi* a los siete días de edad en medio PDA y H) Vista al microscopio compuesto del micelio coraloide (100 X).....67

CAPITULO III

Cuadro 1. Aislados de *P. cinnamomi*, empleados en las pruebas de severidad.....54

Cuadro 2. Diferencias en severidad en la parte aérea de aislados de *P. cinnamomi* inoculados en *Quercus mexicana*.....61

Cuadro 3. Diferencias en severidad en raíz de aislados inoculados de *P. cinnamomi* inoculados en *Quercus mexicana*.....62

Cuadro 4. Diferencias en severidad de las plantas en la parte aérea inoculados con *P. cinnamomi* en plantas de *Persea americana*62

Cuadro 5. Diferencias de severidad en raíz de aislados *P. cinnamomi* inoculados en *Persea americana*.....63

Cuadro 6. Diferencias en severidad de las plantas en la parte aérea inoculados con *P. cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.....65

Cuadro 7. Diferencias de severidad en raíz de aislados *P. cinnamomi* inoculados en *Pseudotsuga mensiezii*.....65

CAPITULO IV

Figura 1. Prueba de celofán con *Trichoderma nativa*, *Trichoderma* comercial y *P. cinnamomi* creciendo en medio de cultivo PDA donde antes creció el *Trichoderma* con 8 días de incubación.....81

CAPITULO IV

Cuadro 1. Efecto de la variable altura en tratamiento preventivo del *Trichoderma viride* contra *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.....84

Cuadro 2. Efecto de la variable diámetro de tallo en tratamiento preventivo de *Trichoderma virens* contra *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.....84

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Phytophthora cinnamomi Rands es un Oomiceto de la familia *Phytophthoraaceae*. parásito facultativo y acuático que puede vivir en el suelo por mucho tiempo, microorganismo del suelo que provoca grandes pérdidas económicas y ecológicas; causante de pudriciones radicales, cuello, tronco y ramas que afecta a muchas especies de plantas en la agricultura, horticultura y especies forestales, cuenta con una amplia distribución geográfica en todo el mundo que incluye más de 1000 especies (Crone *et al.*, 2013; Erwin y Ribeiro, 1996; Garbelotto *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2009; Zentmyer, 1980). La primera descripción de *Phytophthora cinnamomi* la realizó Rands, en 1922, como el agente causal del cancro en tallo de árboles de canelo, en Sumatra (Erwin y Ribeiro, 1996). Desde entonces sus daños se han reportado en diferentes hospedantes. En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952, causando daños severos en áreas productoras de aguacate y pérdidas de hasta 90 % (Pérez, 2008; Téliz y Mora, 2007; Tamayo, 2007). Así mismo, se ha reportado en bosques naturales de *Quercus* spp, a principios del año 2000, en El Arrayanal, Col., ocasionando la muerte y daños en árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000). Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008). También se reporta que afecta árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, México y Veracruz (García *et al.*, 2007). Los síntomas causados por el patógeno son clorosis, defoliación, muerte de ramas, canchales en la corteza y pudrición de raíz, lo que ocasiona la muerte del árbol (Erwin y Ribeiro, 1996). La identificación de este patógeno ha sido a través del uso de claves taxonómicas, medios selectivos y muy recientemente se ha caracterizado empleando diferentes técnicas moleculares, que han permitido facilitar la

identificación y caracterización de individuos, estimación de la variabilidad genética así como la identificación de genes de interés agronómico o ecológico mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), con iniciadores específicos para cada especie obteniendo resultados importantes sobre la taxonomía, filogenia y variabilidad del hongo (Gallegly y Hong, 2008; Tsai *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2000).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Determinar la patogenicidad y variabilidad genética de *P. cinnamomi*.

2.2 Objetivos específicos:

- 1) Identificación morfológica y molecularmente de los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* de árboles *Quercus spp.*, *Persea americana* y *Pseudotsuga menziesii*.
- 2) Determinar la patogenicidad, virulencia y severidad de aislamientos de *P. cinnamomi* en árboles de *Pseudotsuga menziesii*, *Quercus mexicana* y *Persea americana* en invernadero.
- 3) Determinar el efecto de *Trichoderma viride* (nativa) y *Trichoderma virens* (comercial) en árboles de *Pseudotsuga menziesii* infectados por *P. cinnamomi*, en invernadero.

CAPÍTULO 1

Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* Rands en especies forestales mediante el uso de Microsatélites (SSR).

Alejandra Almaraz-Sánchez¹, Matteo Garbelotto, Dionicio Alvarado-Rosales¹, Gerardo Leyva-Mir³, Armando Equihua-Martínez¹, Sergio Aranda-Ocampo¹ y Javier Hernández-Morales ¹

¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 56230; ²Department of Environmental Science Policy and Management, 151 Hilgard Hall University of Berkeley, California, ³Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 56230.

RESUMEN

Una población de 64 aislamientos de *P. cinnamomi* Rands procedentes de cinco regiones de México, se obtuvieron de suelo, raíz enferma y canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, en El Arrayanal, Col. (COL-A) siete aislamientos; de *Quercus elliptica* en Tecoaapa, Gro. (GRO-P) seis, de *Quercus peduncularis* en Manantlán, Jal. (JAL-C) siete, de *Pseudotsuga mensiezii* del Edo. de México (EDO-T) siete y de *Persea americana*, en Peribán Mich. (MICH-P) 37. Se evaluarón morfológica y molecularmente la variabilidad genética de los 64 aislamientos de *P. cinnamomi*, además se adicionaron seis aislamientos de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa Nueva Guinea y uno de Australia para conocer la relación genética de los 74 aislamientos. Se utilizó la técnica de Microsatélites (SSR) con cinco primers: d39, e16, g10, g13(1) y g13(4). Las cepas mostraron a pariamiento A2 y cremiemento cameloide en medio PDA y JV8. Se observó una diversidad en los esporangios generalmente ovoides a elipsoides. La distancia genética entre los aislamientos fue calculada por el método de promedios con el programa R (versión;2.10.0). Se formaron cuatro grupos dentro del dendrograma, los aislamientos de *P. cinnamomi* de los hospedantes de *Quercus* spp., *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* de México se encontró similitud con los aislamientos de Papúa Nueva Guinea. Se realizó un árbol filogenético con los aislamientos

de estudio por el método de cálculo de matriz de distancias genéticas; formaron seis clados agrupando la mayoría de los aislamientos de interés con los de Papúa Nueva Guinea.

Palabras clave: caracterización molecular y morfológica, Microsatelites, *Phytophthora cinnamomi*.

CHAPTER 1

Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands isolates in forest species using microsatellite (SSR).

ABSTRACT

A population of 64 isolates of *P. cinnamomi* Rands from five regions of Mexico, were obtained from soil, roots and stem cankers. Seven from *Quercus salicifolia* in El Arrayanal, Col. (COL-A); six from *Quercus elliptica* in Tecoanapa, Gro. (GRO-P); seven from *Quercus peduncularis* in Manantlán, Jal. (JAL-C); seven from *Pseudotsuga menziesii* in the Estado de Mexico (EDO-T) and 37 from *Persea americana* in Peribán Mich. (MICH-P) . All the isolates were characterized morphologically and molecularly to study their genetic variability. Six isolates from USA, one from Madagascar, two from Papua New Guinea and one from Australia were added to the molecular analysis. The Microsatellites (SSR) technique and five primers were used: d39, e16, g10, g13 (1) and g13 (4). The Mexican strains were A2 mating and showed camelloid growth in PDA and JV8. Sporangia were ovoid to ellipsoid. The genetic distance among isolates was calculated by the average method with the R program (version 2.10.0). Four groups in the dendrogram were obtained. The isolates of *P. cinnamomi* from *Quercus* spp., *Pseudotsuga menziesii* and *Persea americana* were similar to the ones from Papua New Guinea The phylogenetic tree with isolates studied by the method of calculation of genetic distances matrix; They formed six clades grouping most isolates of interest with Papua New Guinea.

Key words: molecular and morphological characterization, microsatellites, *Phytophthora cinnamomi*.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi es un patógeno de suelo que se encuentra distribuido en una amplia gama de hospedantes en el mundo, La primera descripción de *Phytophthora cinnamomi* la realizó Rands, en 1922, como el agente causal del cancro en tallo de árboles de canela, en Sumatra (Erwin y Ribeiro, 1996) y donde está la presencia de una alta diversidad de genotípica con dos tipos de apareamiento A1 y A2. Este parece ser el caso, incluso en las regiones del mundo, como Australia, California y Sudáfrica, donde se han reportado tanto el tipo A1 como el A2 (Brasier, 1978; Zentmyer; 1980; Linde *et al.*, 1999; Hulme., *et al.*, 2008; Liebhold *et al.*, 2012). Este oomyceto es heterotálico, ha causado grandes pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial en un amplio rango de hospedantes incluyendo especies forestales, ornamentales y frutales (Erwin y Ribeiro, 1996; Romero, 1993; Zentmyer, 1980; Sanabria, 2003; Pegg *et al.*, 2008). Además de ser un patógeno importante de los cultivos hortícolas, *P. cinnamomi* ha sido identificado como un patógeno nativo en ecosistemas naturales. El impacto de *P. cinnamomi* puede ser dramático como lo que ocurrió en los ecosistemas boscosos de Jarrah en Australia Occidental donde devastó 200 mil hectáreas de vegetación natural, destruyendo más de 400 especies hospedantes (Malajczuk, 1979). Es también responsable de pérdidas anuales de castaño (Kong *et al.*, 2003) y afectando poblaciones de manzanita (*Arctostaphylos* spp.) de la Familia *Ericaceae* en suelos de la Sierra Nevada en California (Garbelotto *et al.*, 2006). Su distribución mundial parece ser el resultado del movimiento de tierra y material vegetal infectado en el entorno agrícola y hortícola causa principalmente por el hombre (Garbelotto ,2008; Zentmyer., 1980). En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952 afectando áreas productoras de aguacate, causando daños y pérdidas importantes (Téliz *et al.*, 1989; Téliz y Mora 2007). Tainter *et al.*, 2000, lo reportó en bosques naturales afectando

a *Quercus* spp, a principios del año 2000, en El Arrayanal, Col., se reporta ocasionando la muerte y daños en árboles de encino. Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008). También se reporta que afecta árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, México y Veracruz (García *et al.*, 2007).

La presencia de *P. cinnamomi* en los ecosistemas naturales de México ha sido ignorada durante mucho tiempo o supervisada hasta hace poco y no hay ningún estudio publicado información o documentación de la estructura genética y morfológica del patógeno en escenarios naturales de México. Para el género *Phytophthora* se han empleado diferentes técnicas moleculares con resultados importantes en diagnósticos, taxonomía, filogenia, mapeo de genes y variabilidad (Kamoun, 2003).

Entre las técnicas empleadas está el uso de microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) que son regiones de secuencias pequeñas de dos a diez pares de bases que se encuentran distribuidas en muchos sitios del genoma del ADN en hongos, plantas y animales. A partir de estas secuencias se pueden diseñar cebadores específicos de 20 a 25 pb y como marcadores genéticos son altamente polimórficos permitiendo una discriminación entre individuos altamente emparentados. Mediante los microsatélites se puede encontrar y medir la diversidad entre genotipos amplificados mediante PCR la región del ADN que contenga las secuencias repetidas que permitan determinar la variabilidad genética (Condit y Hubbell, 1991; Phillips *et al* 1995; Dobrowolski *et al.*, 1998). Debido a la falta de información sobre la diversidad genética de *P. cinnamomi* en México se propuso este estudio con el siguiente objetivo: conocer la variabilidad genética y morfológica de 64 aislamientos

de *P. cinnamomi* de diferentes regiones y hospedantes de México comparando con seis aislados de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa New Guinea y uno de Australia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y purificación de los aislamientos

Los aislamientos utilizados de *Phytophthora cinnamomi* fueron obtenidos de suelo, raíz y canchales de árboles enfermos con los síntomas de la “enfermedad de la tinta” infectados naturalmente y recolectados de las regiones de bosque de encino y plantaciones de pseudotsuga y aguacate, en las localidades que se muestran en el Cuadro 1. Los árboles de *Quercus* y *Pseudotsuga* mostraban síntomas característicos de la enfermedad causada por *P. cinnamomi*, entre estos muerte regresiva, marchitez, clorosis, defoliación prematura, canchales y exudado color oscuro en la corteza (Alvarado *et al.*, 2007; Erwin y Ribeiro, 1996). Para obtener al patógeno directamente en campo, a partir de canchales, se hicieron siembras directas en medio selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) (Jeffer, N., Martín, J.B.1986; Erwin y Ribeiro, 1996). En laboratorio, para aislarlo de raíz, éstas se desinfectaron y sembraron en medio de cultivo selectivo PARPH. De suelo, se utilizó un método de trapeo con discos de camelia, en una suspensión de 350 mL de agua destilada, + 200 g de suelo y medio selectivo PARPH (Almaraz *et al.*, 2013).

Identificación morfológica

Los aislamientos obtenidos de *P. cinnamomi* se cultivaron en medio de cultivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) y JV8 e incubaron a ± 25 °C, en oscuridad, durante siete días, para estimular el desarrollo de las colonias; posteriormente se sembraron en medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y se midieron diariamente, hasta que el pseudohongo llenó la caja de (9 cm). Además se realizaron confrontaciones de los

aislamientos para conocer el tipo de apareamiento, se realizó preparaciones del micelio y clamidosporas con glicerina al 10 %, se observaron al microscopio compuesto y caracterizaron con base en la morfología de la colonia y estructuras de reproducción con ayuda de las claves de Waterhouse (1963) y Gallegly y Hong (2008). Para la producción de esporangios se realizó una suspensión de extracto de suelo + agua destilada estéril, en la cual se colocó discos de micelios de 5mm de diámetro en cajas Petri (Romero, 1996), estas cajas se colocaron a una temperatura de ± 25 °C bajo condiciones de luz continua por seis días. Los esporangios se observaron al microscopio y se realizaron las descripciones del tipo de esporangio y sus mediciones de la relación largo y ancho, se midieron 100 esporangios de cada aislamiento. Una vez identificados todos los aislamientos, se procedió a su purificación a través de punta de hifa para conservación en tubos con PDA (Papa-Dextrosa-Agar), agregando aceite mineral. Todo esto se realizó en el laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados.

Extracción de ADN genómico de *P. cinnamomi*.

La extracción del ADN de los 64 aislados se realizó con el método de celofán (Denis y Webster, 1971), el cual consistió en cortar papel celofán estéril del tamaño de la caja Petri, éste se colocó bajo condiciones asépticas sobre cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA, en el cual se colocó un disco de 5 mm de diámetro de *P. cinnamomi* con ayuda de un sacabocado, para cada aislamiento del patógeno, con diez repeticiones. Se colocaron a temperatura ambiente de ± 25 °C durante siete días, tiempo suficiente para el desarrollo del *P. cinnamomi*. Una vez crecido el micelio, éste se colocó en tubos viales a -20 °C y se liofilizaron durante 48 h. Para la extracción de ADN, de cada muestra liofilizada se pesaron 0.030g en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se le colocó una perla (Glass Beads) de 6.35 mm y posteriormente se llevaron a la cetrifuga por 2 min para su pulverización de

las muestras, posteriormente, se continuó con el método de extracción. La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción DNesay® Plant Minikit ADN de QUIAGEN siguiendo las recomendaciones del protocolo Kit del fabricante. Se obtuvieron 100 µl de ADN de cada muestra, la cual se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X. La concentración del ADN se determinó en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA®). De los 64 aislamientos de *P. cinnamomi* aislados y purificados de las cinco regiones de México, se compararon con seis aislamientos de USA, uno de Madagascar, dos de Papua New Guinea y uno de Australia, provenientes de la colección del laboratorio de Patología y Micología Forestal de la Universidad de Berkeley California U.S.A. (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Aislamientos de *P. cinnamomi* caracterizados molecularmente.

Nº de aislado	País *	Estado	Hospedante		Mating type
1	México	Colima.	<i>Quercus salicifolia</i>	suelo	A2
2	México	Colima	<i>Quercus salicifolia</i>	suelo	A2
3	México	Colima	<i>Quercus salicifolia</i>	suelo	A2
4	México	Colima	<i>Quercus salicifolia</i>	suelo	A2
5	México	Colima	<i>Quercus salicifolia</i>	suelo	A2
6	México	Colima	<i>Quercus salicifolia</i>	cancro	A2
7	México	Colima	<i>Quercus salicifolia</i>	cancro	A2
8	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	suelo	A2
9	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	suelo	A2
10	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	raíz	A2
11	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	suelo	A2
12	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	suelo	A2
13	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	suelo	A2
14	México	Jalisco	<i>Quercus peduncularis</i>	suelo	A2
15	México	Guerrero	<i>Quercus elliptica</i>	raíz	A2
16	México	Guerrero	<i>Quercus elliptica</i>	cancro	A2
17	México	Guerrero	<i>Quercus elliptica</i>	suelo	A2
18	México	Guerrero	<i>Quercus elliptica</i>	cancro	A2
19	México	Guerrero	<i>Quercus elliptica</i>	suelo	A2
20	México	Guerrero	<i>Quercus elliptica</i>	suelo	A2
21	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	suelo	A2
22	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	suelo	A2
23	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	raíz	A2
24	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	suelo	A2
25	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	raíz	A2
26	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	suelo	A2
27	México	Estado de México	<i>Pseudotsuga menziessii</i>	raíz	A2
28	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
29	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
30	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2

31	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
32	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
33	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
34	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
35	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
36	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
37	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
38	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
39	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
40	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
41	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
42	México	Michoacán	<i>Buxus semipervirens</i>	raíz	A2
43	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
44	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
45	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
46	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
47	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
48	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
49	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
50	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
51	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
52	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
53	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
54	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
55	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
56	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
57	México	Michoacán	<i>Buxus semipervirens</i>	raíz	A2
58	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
59	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
60	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
61	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
62	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
63	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
64	México	Michoacán	<i>P. americana</i>	raíz	A2
MC8	USA	California	<i>Q.agrifolia</i>	suelo	A2
MC16	USA	California	<i>Abies</i> sp.	suelo	A2
MC20	USA	California	<i>A. myrtifolia</i> , <i>A. viscida</i>	cancro	A2
MC38	USA	California	<i>A. viscida</i>	raíz	A2
MC39	USA	California	<i>A. viscida</i>	raíz	A2
P2301	USA	California	<i>Pinus</i> ssp.	suelo	A2
P2121	Madagascar		<i>P.americana</i>	raíz	A1
P2183	Papua New Guinea		suelo	suelo	A1
P3662	Papua New Guinea		<i>Castanopsis</i> spp.	suelo	A1
P3664	Australia		<i>Eucalyptus</i> spp.	cancro	A1

*64 aislamientos de México(MX), seis de USA, uno de Madagascar (MG), dos de Papúa Nueva Guinea(PNG)

y uno de Australia (AU).

Amplificación de la región ITS

Para esta técnica de PCR (Polimerasa Chain Reaction), con los primers ITS'5 (TCCTCCGCTTATTATTGATATGC) e ITS4 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) se amplificaron las regiones ITS1 e IT2 de genes rRNA, localizadas entre la subunidad pequeña 18S rRNA, 5.8S y la subunidad larga 28S rRNA (White et al., 1990). La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen total de 30 µL, la cual contenía 0.1 mM de dNTP's, 0.13 mM de cada oligonucleótido, 0.1 U de Taq DNA Polimerasa (QIAGEN®, GmbH, Hilden Germany) En 1X de buffer de PCR (Tris, CL, KCl, (NH₄)₂S₀4, 15 Mm MgCl₂; pH 8.7) y de 5 -10 ng de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler™ (BIO-RAD Laboratories Inc.®, Hercules CA, USA), el programa incluyó un ciclo inicial de 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 45 °C, 90 s a 72 °C y un ciclo de 5 min a 72°C. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE. El gel se tiñó con 7.5 µL del Biotium para visualizar los fragmentos bajo luz UV en un transluminador Modelo Gel Doc 2000, BIO RAD ®

Limpieza y obtención de secuencias de los productos PCR

Todos los productos de la reacción de PCR obtenidos de la región de ITS, se purificaron con el Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN®, GmbH, Hilden. Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas se enviaron a la Universidad de Berkeley California para su secuenciación directa.

Condiciones de la PCR - con los cinco primers de Microsatélites

Para este estudio se utilizaron cinco primers SSR (secuencias simples repetidas), estos fueron: d39, e16, g10, g13 (1) y g13(4) descrito por Dobrowolski *et al.*, (2002) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Primers utilizados para la amplificación de SSR en los 74 aislamientos de *P. cinnamomi*.

SSR	Núm.de Acceso NCBI	Repeticiones	Secuencia de Primers (5'-3') Forward y Reverse	Etiqueta	No. de alelos
d39	AF312882	(AC)n	F: GAGAGGTCTTCAGCACGAATG R: ACCACTTTGGTTTCTCGCC	6 FAM	11
e16	AF312887	(AC)n	F: AGATCTCGCACCTCCCTAAAG R: AGGCAAGATTTTCGTAGAAGGC	6 FAM	6
g10	AF312903	(AG)n	F: GAACTCCAGCTCCTCCTGC R: AAGTTCCCATTTTCGCAACAC	6 FAM	9
g13(1)	AF312904	(AG)n	F: ATGAGCTCACACAAGGTCTCG R: CTATACAGCAAACGCTAGTGATGG	6 FAM	17
g13(4)		(AG)n	F: ATGAGCTCACACAAGGTCTCG R: CTTAGGCGTCAAAGTGTCAGC	6 FAM	17

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MyCycler™ (BIO-RAD Laboratories Inc.®, Hercules CA, USA), siguiendo la metodología descrita por Dobrowolski *et al.*, 2002. La mezcla de la reacción fue de un volumen final de 10µl utilizando 10 ng de ADN genómico, 200 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada cebador y 1U de Taq polimerasa. Los primers g10, e16, d39 y g13 fueron amplificados utilizando las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial de 2 min a 96 °C, 6 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 96 °C, de recocido de 30 segundos a 66 °C y extensión de 30 segundos a 72 °C seguido por 20 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 96 °C, calentamiento de 30 segundos a 60 °C y extensión de 30 segundos a 72 °C. El primer g13 (4) se amplificó usando desnaturalización inicial de 2 min a 96 °C, 6 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 96

°C, de recocido de 30 segundos a 64 °C y extensión de 30 segundos a 72 °C seguido de 20 ciclos de desnaturalización de 30 seg a 96 °C, el recocido de 30 segundos a 64 °C y extensión de 30 segundos a 72 °C. El cebador directo se marcó con 6-FAM y los productos de PCR se les colocó un marcador molecular utilizando GeneScan 500 Liz. Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos, y controles positivos y negativos (cepas de genotipo conocido) se incluyeron en cada placa. Las muestras se llevaron a la Universidad de Berkeley California para su análisis y secuenciación directa para su electroforesis capilar automatizada modelo ABI 3730xl que permite obtener las secuencias completas de cada muestra analizada.

Análisis de datos

Los datos obtenidos de se analizaron con el programa PeakScanner-V2.0 y procesados en Microsoft Office Excel 2007. Para el análisis del dendrograma para la variación se utilizó el programa “R” versión 2.10.0 Copyright© donde se analizaron los datos usando promedios. Para el árbol filogenético las relaciones entre los aislamientos se visualizaron mediante el cálculo de la matriz de distancias genéticas por pares utilizando el software Genodive (Meirmans PG, 2004) usando la métrica simple, general y robusto basado en el número de repeticiones. Las relaciones genéticas entre los aislamientos se visualizaron mediante la estimación de matriz de media Bruvo pares genéticas distales (Bruvo *et al*, 2004) el Bootstrap del árbol consenso se realizó con 1000 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

De acuerdo a la identificación morfológica, todos los aislamientos pertenecieron a *P. cinnamomi*. Los aislados de Colima, Guerrero, Jalisco y Edo. de México, en general, sobre medio PDA presentaron las características típicas de la especie, entre estas crecimiento lento del micelio y coloración blanca, de consistencia algodonosa, aspecto de forma de flor de camelia, micelio turuloso y formación de clamidosporas y tipo de apareamiento A2 (Waterhouse, 1963; Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008) (**Figura 1**)

Zentmyer (1980) menciona que el grupo A2 presenta mayor grado de agresividad, siendo el más común en cultivos agrícolas.

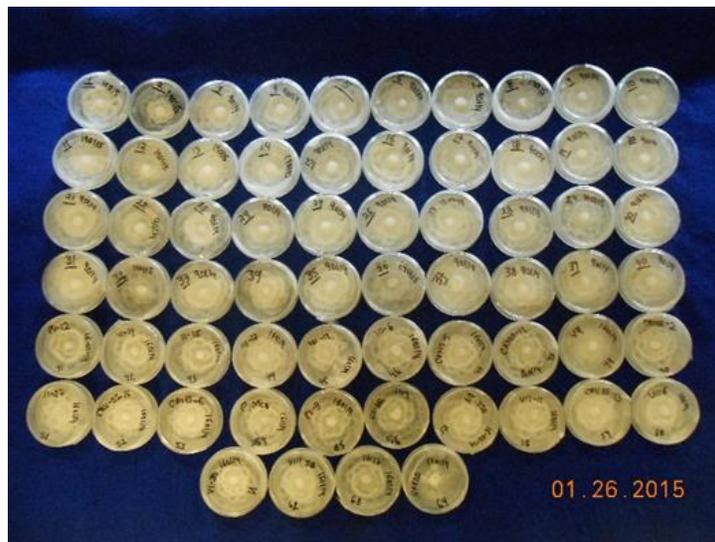


Figura 1. A) Aislamientos de *P. cinnamomi* de siete días de edad en forma de camelia desarrollándose en medio de cultivo PDA utilizados en este trabajo.

En medio de cultivo PARPH y JV8, el aspecto de los 64 aislamientos sembrados fue uniforme. En general, el micelio de los aislamientos fue de tipo coraloide, con hinchamientos hifales esféricos en racimos, especialmente abundantes en el medio PDA. Las clamidosporas

fueron globosas y lisas, intercalares o terminales; estas estructuras son latentes pues aseguran la sobrevivencia de este oomicete en el suelo por mucho tiempo (Agrios, 2005). En cuanto a morfología de los esporangios estos fueron ovoides a elipsoides, no papilados, en ocasiones se pudo observar en algunos esporangios una proliferación interna en forma de nido en el mismo esporangio. De cada aislamiento, los tamaños promedio fueron: de El Arrayanal, Col. (COL-A) 40.49 x 28.19, de Manantlán, Jal. (JAL-C 40.81 x 28.63) μm , un poco mayor en Tecoaapa, Gro. (GRO-P) con 48.24 x 31.47 μm , comparado con los dos anteriores. En *Pseudotsuga mensiezii* EDO-T con 43.2 x 32.9 μm , pero el de mayor tamaño fueron los de *Persea americana* MICH con 56.23 x 33.8 μm . Por su parte Harman., (2005); Erwin y Ribeiro (1996) mencionan que la variación de tamaño de los esporangios dependen de las condiciones del sitio y del hospedante donde fue colectado.

Extracción de DNA genómico de *P. cinnamomi*

La extracción del ADN de los 74 aislamientos utilizando el kit de extracción DNesay® Plant Minikit DNA de QUIAGEN mostró bandas bien definidas en el corrimiento del gel de agarosa (**Figura 2**).

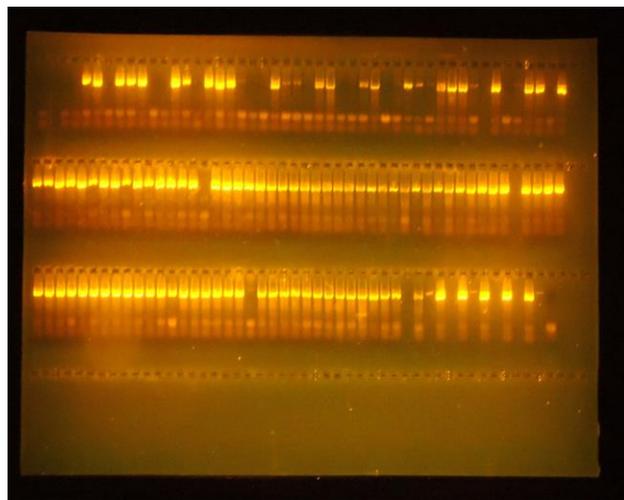


Figura 2. Corrimiento del ADN en gel de agarosa al 1.5% de los 64 aislamientos de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papua New Guinea y uno de Australia.

Identificación molecular por ITS

Los resultados de la secuenciación de cada aislado se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI) de U.S.A. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias por aislamiento tuvieron 99 % de índice de similaridad para la especie *P. cinnamomi*. Al comparar los nucleótidos de cada aislamiento e identificados morfológicamente con las reportadas en el banco de genes (NCBI), estas correspondieron a la misma especie. Esto corroboró la identificación morfológica de cada aislado.

Microsatélites (SSR)

La distancia genética de los 64 aislamientos de *P. cinnamomi* procedentes de cinco regiones de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa Nueva Guinea y uno de Australia. Formaron cuatro grupos dentro del dendrograma, en base a la escala de 0 a 500 pb (**Figura 3**). El primer grupo está formado por tres aislamientos de USA (AV3, AB5, OAK6). El segundo grupo está formado por dos subgrupos el primero de AU que se separa con de los aislamientos de MX (OAK9 y AVOC30) Los dos aislamientos de México están cercanos a 0 esto indica mayor similitud entre los dos aislamientos. El tercer grupo está formado con un aislamiento de USA(AV4). En el cuarto grupo lo conforman la mayoría de los aislamientos de *P. cinnamomi* de los hospedantes de *Quercus* spp., *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* de México con similitud dentro de la escala de 0 a 300 pb con aislados de Papúa Nueva Guinea dentro de este grupo existe homología entre aislamientos.

Dobrowolski *et al.*, (2002) evaluó una población de *P. cinnamomi* de tres sitios en el suroeste de Australia y los analizó junto con una colección de otras partes del mundo entre ellos los de Papúa Nueva Guinea. Los análisis revelaron tres linajes en las poblaciones con otros aislados del mundo por lo que el patógeno se ha extendido en varias regiones.

El análisis filogenético con los aislamientos de estudio por el método de cálculo de matriz de distancias genéticas; formaron seis clados (**Figura 4**).

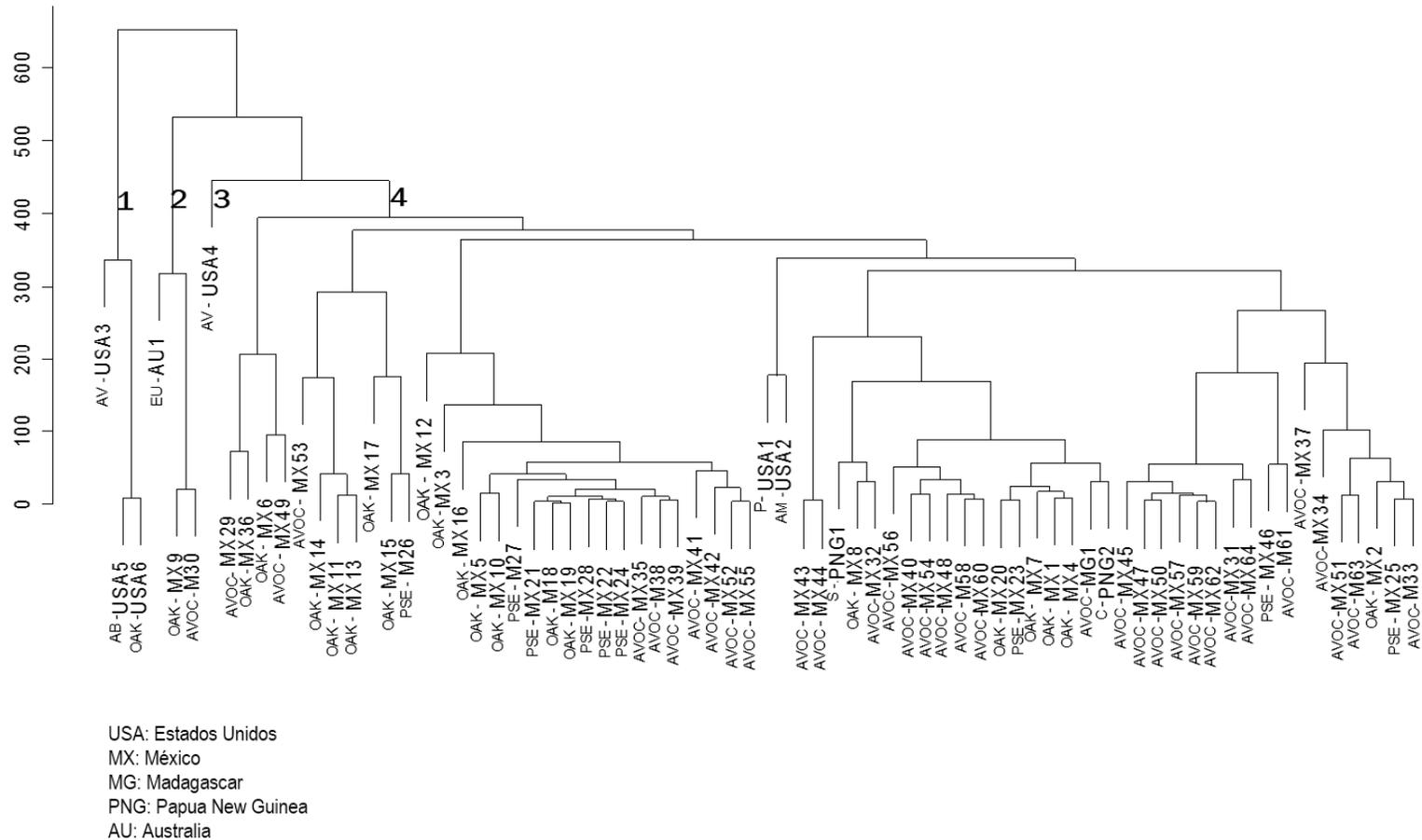


Figura 3. Dendrograma generado a partir de distancia genética entre los aislamientos por el método de promedios con el programa R (versión;2.10.0) en una población de 64 aislamientos de *P. cinnamomi* de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa Nueva Guinea y uno de Australia.

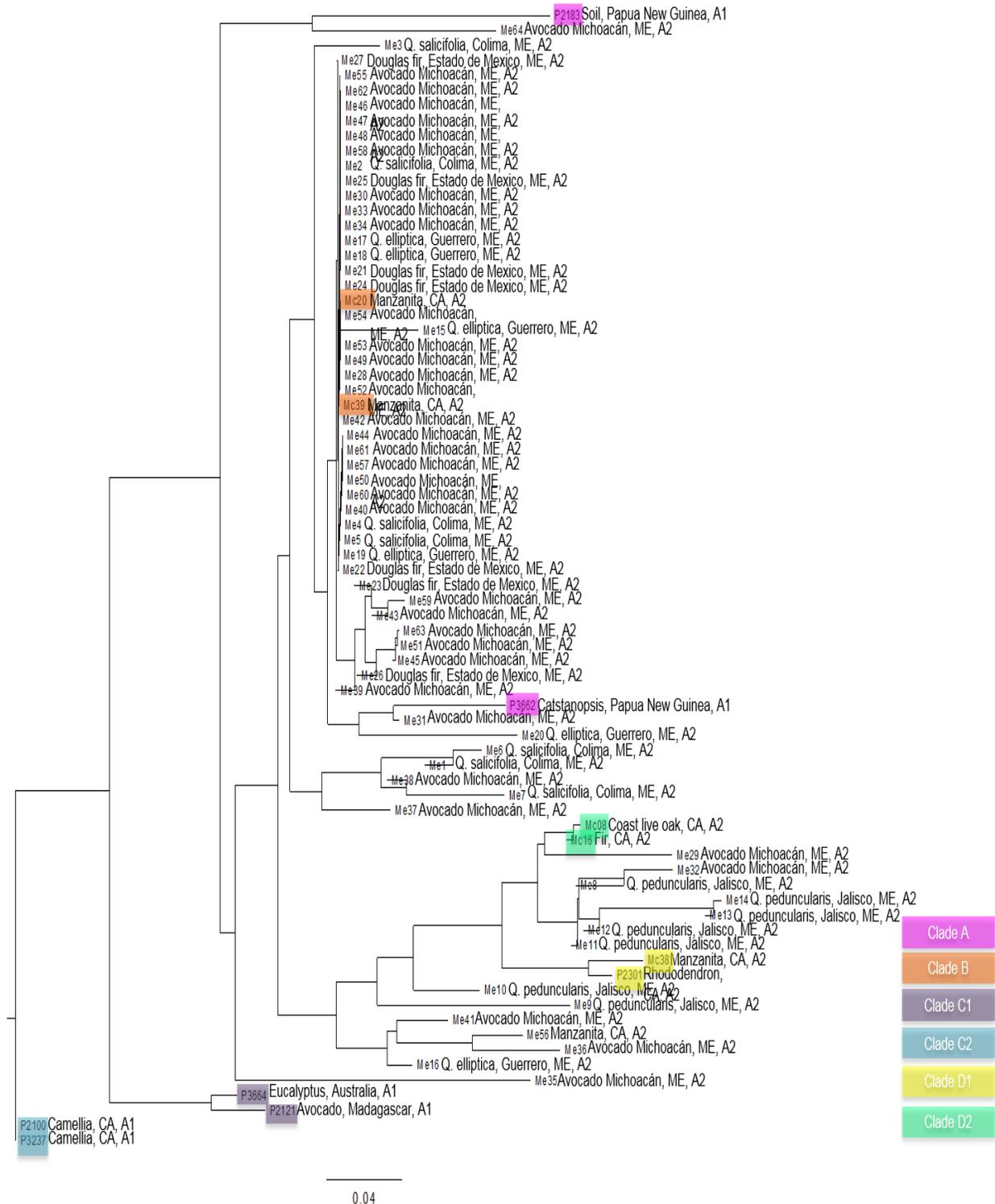


Figura 4. Árbol filogenético bootstrap generado a partir del análisis con cinco primers de microsatélites en una población de 64 aislamientos de *P. cinnamomi* de México, seis de USA, uno de Madagascar, dos de Papúa Nueva Guinea y uno de Australia.

En el clado A se observa que la mayoría de los aislados mexicanos están más estrechamente relacionados con Papúa Nueva Guinea que con los de Australia, Madagascar y algunos aislados de California. Sin embargo, hay un grupo suficiente de aislados de aguacate para generar un clado ya que tienen una similitud dentro de este clado con aislados nativos de México de los hospedantes *Quercus* spp. y *Pseudotsuga*. El clado B agrupa tanto especies de California silvestres de *A. myrtifolia* y *A. viscida* (Manzanita) y comerciales como Aguacate y especies forestales como *Quercus*, y *Pseudotsuga* de México. Esta es una pieza evidente de que las poblaciones silvestres están asociadas con el comercio debido a que los aislados colectados fueron de tres hospedantes diferentes. Se puede observar más diversidad dentro de las poblaciones silvestres en México que en California. Por lo que el factor humano corresponde se puede observar que juega un papel importante en la distribución de este patógeno a través del movimiento del suelo agua de riego y plantas de vivero ya que zonas libres de este patógeno están presentes en diferentes estados o en la misma zona dentro de México lo que sugiere una clara vía de introducción local. El clado C1 agrupa aislados de Australia y Madagascar pero sin ninguna relación con aislados Mexicanos El clado C2 lo conforman aislamientos solo de California y sin relación con los aislados de México. Lo mismo se mostró para el Clado D1 y D2 sale como otro grupo con aislados solo de California de USA.

La caracterización con los marcadores de microsatélites desarrollados por Dobrowolski *et al.* (2003) puede diferenciar sistemáticamente las diferencias genéticas entre los aislamientos *P. cinnamomi*, ya que algunas longitudes de los fragmentos son similares incluso aquellos que están geográficamente distales como los aislamientos de USA y Papúa Nueva Guinea con relación a los aislamientos de México.

La presencia de *P. cinnamomi* en los ecosistemas naturales y sus diferentes hospedantes indica que hay otros factores influenciando la capacidad de la expresión del patógeno y desarrollo de la enfermedad y depende de los factores físicos, químicos, biológicos además del cambio de tipo de suelo y cambio climático (Bergot *et al.*, 2004; Brasier, 1993; Téliz *et al.*, 2007; Jung, T.2009).

Las técnicas moleculares al igual que las morfológicas son herramientas indispensables para el entendimiento de la distribución y diversidad de hongos fitopatógenos. Existen diferentes técnicas moleculares entre las que se emplean: RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar), estas técnicas han sido utilizadas para determinar variabilidad genética de aislamientos de especies de *Phytophthora infestans* y *P. cinnamomi*.

Ochoa- Fuentes *et al.*, (2009). Encontraron que 42 aislados de aguacate de cinco municipios del estado de Michoacán presentaron variabilidad genética utilizando RAPD con 21 cebadores y produjeron 23 bandas la distancia genética también fue calculada por el método de promedio no ponderado presentando polimorfismo entre los aislamientos.

En los últimos años las isoenzimas han sido sustituidas por micro satélites (SSR) como marcador de elección para estudio de variabilidad genética de poblaciones de *P. cinnamomi* por su alto grado de polimorfismo. Aunque la técnica es costosa, es considerada como una técnica altamente polimórfica en cuanto a su longitud, estas regiones son adecuadas para usarse como marcadores moleculares para estudios de variabilidad genética de los organismos (Zane *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 1995).

Los resultados que aquí se presentan muestran las relaciones genéticas que se establecen entre los diferentes aislamientos que están influenciados por el hospedero, por la región de origen esto proporciona mayor variabilidad genética

CONCLUSIONES

Las cepas mostraron variabilidad morfológica en el crecimiento cameloide en medio PDA y JV8.

Se observaron diferentes tamaños de esporangios de las diferentes regiones y hospedantes de México. Tipo de Aparamiento A2

En análisis de microsatelites de los aislamientos de *P. cinnamomi* de los hospedantes de *Quercus* spp., *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* de México se encontró similitud con los aislamientos de Papúa Nueva Guinea, con un peso molecular de 0 a 300 .

El árbol filogenético con los 74 aislamientos formo seis clados estos resultados permiten inferir que los aislamientos de México están estrechamente relacionados con aislados de Papua Nueva Guinea.

El primer estudio de identificación morfológica de 64 aislamientos de cinco estado de México de tres hospedantes diferentes como *Quercus* spp. *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana*. Así como diez aislamientos de la colección de colección del laboratorio de patología y micología forestal de la Universidad de Berkeley California U.S.A

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento y aceptación para realizas mis estudios de postgrado

Al Dr. Matteo Garbelotto de la Universidad de Berkeley California, USA.

LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales, D., L. de L. Saavedra, Romero, A. Almaraz-Sánchez., B. Tlapal-Bolaños, O. Trejo-Ramírez., M. J., Davidson, J.T. Kliejunas, S. W. Oak, O'Brien. G. J., F Orozco-Torres y Quiroz-Reygadas. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. *Polibotánica* 23: 1-21.
- Alvarado-Rosales-D., L. de L Saavedra y A. Almaraz-Sánchez. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino *Quercus* spp., en Tecoaapa, Guerrero, México. *Agrociencia* 42: 565-572.
- Almaraz-Sánchez- A., Alvarado-Rosales-D., Saavedra-Romero L de L.2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de esporulación. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestal y del Ambiente* 19: 5-12.
- Brasier, C. M. 1978. Stimulation of oospore formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma* and its ecological implications. *Ann. Appl. Biol.* 89:135-139.
- Brasier, C.M.1993. *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor in Europe oak decline. In: Recent advances in studies on oak decline, eds., N.Luisi, P. Lerario y A. Vannini. Pp 49-57.
- Bruvo, R., Michiels N.K., D'Souza, T.G., Schulenburg, H.2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol Ecol* 13:2101–2106
- Bergot, M., Cloppet E, Pérarnaud V, Déqué M, Marcais, B., Desprez-Loustau, ML. 2004 Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology* 10, 1539–52.
- Condit, R. and Hubbell. S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome* 34:66-71.
- Davidson, J.M., O'Brien, J.G., S. Oak, and J. Kliejunas. 2003. Report on a site visit to México-Muerte del Encino. USDA Forest Service. 9p.

- Dennis, C., y Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological Society 57: 25-39 p.
- Dobrowolski, M. P., Tommerup, I. C., Blakeman, H. D., and O'Brien, P. A. 2002. Non-Mendelian inheritance revealed in a genetic analysis of sexual progeny of *Phytophthora cinnamomi* with microsatellite markers. Fungal Genet. Biol. 35:197-212.
- Dobrowolski, M.P., Tommerup, I.C., Chearer, B.L., O'Brien, P.A. 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. Phytopathology, 93, 695–704.
- Dobrowolski, M. P., Tommerup, I. C., and O'Brien, P. A. 1998. Microsatellites in the mitochondrial genome of *Phytophthora cinnamomi* failed to provide highly polymorphic markers for population genetics. FEMS Microbiol. Lett. 163:243-248.
- Erwin, D. C and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. USA. 562
- Garbelotto, M., Huberli D., Shaw D. 2006. First report on an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in natural oak woodlands of California and its differential impact on two native oak species. Plant Dis. 90:685.
- Garbelotto, M. 2008. Molecular analysis to study invasions by forest pathogens: examples from Mediterranean ecosystems. Phytopathologia Mediterranea, 47, 183–203.
- Gallegly M. E., Hong C. 2008. *Phytophthora*: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. APS Press, American Phytopathological Society. 158 p
- García, D.S.E. 2007. Pudriciones de raíz por *Phytophthora*/Root rot by *Phytophthora*. En: Cibrián T.D., Alvarado, R.D. y García. D.S.E (Eds). 2007. Enfermedades forestales en México/ Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo y CONAFOR. 587
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., and Feldman, M. W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics 139:463-471
- Hardham, A. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6: 589-604.

- Hulme, P.E, Bacher S, Kenis M, Klotz, S. Kuehn, I.2008. Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *Journal of Applied Ecology* 45: 403–414
- Jeffer, N., Martín, J.B.1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70:1038-1043
- Jung, T.2009. Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climatic extremes. *Forest Pathology*, 39: 73-94.
- Kamoun, S. 2003. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell.* 2: 191 - 199.
- Kong, P., Hong, C.X and Richardson, P.A.2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant Pathology* 52, 681-6.93.
- Linde, C., Drenth, A., and Wingfield., M. J. 1999. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:667-680.
- Liebold,A.M., Brockerhoff, E., Garrett, L.J, Parke, J.L, Britton, K.O .2012. Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the USA. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10: 135–143
- Malajczuk. 1979. Biological suppression of *Phytophthora cinnamomi* in eucalyptus and avocado in Australia. In: Schippers B. & Gams W. (Eds). *Soil plant Pathogens.* Academic. Press. 635-652 p.
- Meirmans, P.G., and P.H. Van Tienderen. 2004. Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms, *Molecular Ecology Notes.* 4 p.792-794
- Old, K.M., Moran,G.F. and Bell, J.C. 1984. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany* 62: 216-222 *Phytophthora database.* In: <http://www.Phytophthora.org>.
- Ochoa-Fuentes, Y. M., Martínez-de la Vega, O., Olalde-Portugal, V.,Cema-Chavez, E., Landeros-Flores, J., Hemandez-Castillo, F. D., and Flores-Olivas, A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacan, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25:161-166.

- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Whiley, T. 2008. *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. P. 23-25. *In: The Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australian Rural Woman of the Year 2008 to Mrs Ros Smerdoon. Canberra. Vol. 19, núm. 2.52 p.*
- Romero, C.S. 1996. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General de Patronato Universitario. 347 p
- Sanabria, H. 2003. La tristeza del aguacatero y su control. *Horticultura global: revista de industria, distribución y socio economía hortícola* 171:61-62.
- Tainter, F.H., O'Brien, J.G., Hernández, A., and F. Orozco. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Dis.* 84(4):394-398.
- Téliz, O.D., y 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, O.D., y Mora, A.A. 2007. El aguacate y su Manejo integrado 2nd edición. Mundi-Prensa, México. 287-306.
- Waterhouse G M.1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. UK: Commonwealth Mycological Institute 22p.
- White T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. *PCR. Protocols: a guide to methods and applications.* 38(5):315-322
- Zane, L. L. Bargelloni and T, Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review *Molecular Ecology* 11: 1-16
- Zentmyer, A.G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph. 10 APS Press. St. Paul, MN. USA. 96 pp.

CAPÍTULO 2

Patogenicidad y virulencia de *Phytophthora cinnamomi* Rands. aislamientos de árboles forestales en México

Alejandra Almaraz-Sánchez¹, Dionicio Alvarado-Rosales¹, Gerardo Leyva-Mir², Armando Equihua-Martínez¹, Sergio Aranda-Ocampo¹ y Javier Hernández-Morales¹

¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 56230; ²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 56230.

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi Rands es un microorganismo del suelo que ha causado grandes pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial, en una amplia gama de hospedantes. Por lo que se evaluó la patogenicidad y agresividad de cinco aislados de *Phytophthora cinnamomi* Rands., procedentes de cinco regiones de México, obtenidos de tres hospedantes que presentaban síntomas de la “enfermedad de la tinta”. Los aislados se obtuvieron de suelo, raíz y canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, de El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* de Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* de Manántlan, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga menziesii* del Edo. de México (EDO-T) y *Persea americana*, de Peribán Mich. (MICH-P). A través de un análisis morfológico y molecular (No Acceso: KP773290, KP773291, KP773292, KP773293, KP773294) se corroboró la identificación de *P. cinnamomi*. Su patogenicidad y agresividad se probó en plantas sanas de *P. menziesii* de tres años de edad. Para cada aislado se utilizaron cinco repeticiones con su respectivo testigo, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y la evaluación de síntomas se realizó semanalmente durante ocho meses. Los resultados obtenidos indicaron que los cinco aislados de *P. cinnamomi* son capaces de causar enfermedad en las plantas de *P. menziesii*.

El aislado COL-A, de la región del Arrayanal Col., se comportó como el más virulento, causando síntomas visibles a los 120 ddi, le siguieron los aislados GRO-P a los 180 ddi, JAL-C y EDO-T a los 210 ddi, y MICH-P a los 240 ddi. Para analizar los datos obtenidos en el ensayo se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis detectando diferencias estadísticas significativas en la virulencia de los aislados sobre el hospedante. El testigo no presentó síntoma alguno. Los análisis moleculares indican una homología de 99 % de identidad con *P. cinnamomi*. Este es el primer reporte de *P. cinnamomi* aislado de *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *P. mensiezii* y *P. americana* evaluado en plantas de *P. mensiezii*, donde se corrobora la patogenicidad y virulencia del patógeno.

Palabras clave: agresividad, oomiceto, identificación, morfológica, molecular, *Pseudotsuga mensiezii*, *Persea americana*, *Quercus* spp.

CHAPTER II

Pathogenicity and virulence of *Phytophthora cinnamomi* Rands. isolates of forest trees in México.

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi is a soil microorganism that has caused great economic and ecological losses worldwide, in a wide range of hosts. So the pathogenicity and aggressiveness five isolates of *Phytophthora cinnamomi* were evaluated, From five regions of Mexico, obtained from three hosts with symptoms of the "ink disease". Isolates were obtained from soil, roots and tree canker *Quercus salicifolia*, El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* Tecoanapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* Manantlan, Jal. (JAL-C), Edo *Pseudotsuga menziesii*. of Mexico (EDO-T) and *Persea americana* of Peribán Mich. (MICH-P). Through morphological and molecular analysis (Accession No: KP773290, KP773291, KP773292, KP773293, KP773294) identification of *P. cinnamomi* was confirmed. Pathogenicity and aggressiveness was tested in healthy plants of *P. menziesii* three years. Five repetitions for each isolated with its own witness used, the plants were kept under greenhouse conditions and symptom assessment was performed weekly for eight months. The results showed that the five isolates of *P. cinnamomi* are capable of causing disease inplants of *P. menziesii*. The COL-A isolated region of Col. Arrayanal, behaved as the most aggressive, causing visible symptoms DDI 120, followed the GRO-P isolated within 180 ddi, EDO JAL-C and 210-T ddi, and MICH-P at 240 ddi. To analyze the data obtained in the test was just the Kruskal-Wallis test to detect statistically significant differences in the aggressiveness of the isolates on the host. The witness did not show any symptoms. Molecular analyzes indicate a homology of 99% identity with *P. cinnamomi*. This is the first

report of *P. cinnamomi* isolate *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, and *P. americana menziesii* evaluated in *P. menziesii* plants where pathogenicity and aggressiveness of the pathogen is confirmed.

Key words: aggressive, Oomycota, identification, morphological, molecular, *Pseudotsuga menziesii*, *Persea americana*, *Quercus* spp.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi es un microorganismo del suelo que provoca grandes pérdidas económicas y ecológicas; causante de pudriciones radicales, cuello, tronco y ramas que afecta a muchas especies de plantas en la agricultura, horticultura y especies forestales, cuenta con una amplia distribución geográfica en todo el mundo que incluye más de 1000 especies (Crone *et al.*, 2013; Erwin y Ribeiro, 1996; Garbelotto *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2009; Zentmyer, 1980). La primera descripción de *Phytophthora cinnamomi* la realizó Rands, en 1922, como el agente causal del cancro en tallo de árboles de canelo, en Sumatra (Erwin y Ribeiro, 1996). Desde entonces sus daños se han reportado en diferentes hospedantes. En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952, causando daños severos en áreas productoras de aguacate y pérdidas de hasta 90 % (Pérez, 2008; Téliz y Mora, 2007; Tamayo, 2007). Así mismo, se ha reportado en bosques naturales de *Quercus* spp, a principios del año 2000, en El Arrayanal, Col., ocasionando la muerte y daños en árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000). Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008).

También se reporta que afecta árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, México y Veracruz (García *et al.*, 2007). Los síntomas causados por el patógeno son clorosis, defoliación, muerte de ramas, canchales en la corteza y pudrición de raíz, lo que ocasiona la muerte del árbol (Dos Santos *et al.*, 2011; Erwin y Ribeiro, 1996). La patogenicidad de las especies de *Phytophthora cinnamomi* está influenciada por condiciones de temperatura, precipitación, humedad, textura del suelo, pH y disponibilidad de nutrientes (Shew y Benson, 1983; Balci *et al.*, 2008; Grant y Byrt, 1958; Jonsson *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Thompsom *et al.*, 2013). La virulencia de la enfermedad es un componente de la

patogenicidad, la cual depende del tipo de cepa y adaptación de los patógenos en la planta, y puede ser estimada por la rapidez del patógeno en dañar al hospedante causando la misma enfermedad pero en menor tiempo (Pariaud *et al.*, 2009; Robin *et al.*, 1998). La identificación de este patógeno ha sido a través del uso de claves taxonómicas, medios selectivos y muy recientemente se ha caracterizado empleando diferentes técnicas moleculares mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), con iniciadores específicos para cada especie obteniendo resultados importantes sobre la taxonomía, filogenia y variabilidad del hongo (Gallegly y Hong, 2008; Tsai *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2000).

En México se han realizado pruebas de patogenicidad con el oomycete en especies de aguacate, sin embargo, no hay reportes de estas ni sobre agresividad con aislados de *P. cinnamomi* procedentes de varias regiones de México, obtenidas de especies forestales. Esto representa una amenaza para este tipo de especies y las comerciales como *P. mensiezii*, que se encuentran en otras partes de país, ya que el desconocimiento de esta información puede ocasionar serios problemas si se extrae suelo del bosque con arbolado enfermo para su uso en viveros forestales. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar morfológica y molecular al oomyceto, así como evaluar la patogenicidad y agresividad de cinco aislamientos en plantas de *P. mensiezii* obtenidos de árboles de *Quercus elliptica*, *Q. salicifolia*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del patógeno

Se realizaron muestreos suelo, raíz y canchales dirigidos a árboles enfermos con los síntomas de la “enfermedad de la tinta” infectados naturalmente en el bosque de encino y plantaciones de pseudotsuga y *Persea Americana* con el fin de aislar al agente causal. Los aislamientos se obtuvieron de árboles de *Quercus salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga*

mensiezii y *Persea americana* de cinco regiones de México. Los árboles de *Quercus* y *Pseudotsuga* mostraban síntomas característicos de la enfermedad causada por *P. cinnamomi*, entre estos muerte regresiva, marchitez, clorosis, defoliación prematura, canchales y exudado color oscuro en la corteza. Para obtener al patógeno directamente en campo, a partir de canchales, se utilizó medio selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) (Jeffer, N., Martín, J.B.1986; Erwin y Ribeiro, 1996;). Los aislamientos de aguacate, fue proporcionado por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez. En laboratorio, para aislarlo de raíz, estas se desinfectaron y sembraron en medio de cultivo selectivo PARPH. De suelo, se utilizó un método de trapeo con discos de camelia, una suspensión de agua suelo y medio selectivo (Almaraz *et al.*, 2013). Todo esto se realizó en el laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados.

Identificación morfológica

Las colonias obtenidas del oomiceto se caracterizaron con base en la morfología de la colonia y estructuras de reproducción. Los aislados se cultivaron en medio de cultivo PDA e incubaron a ± 25 °C (Zentmyer, 1980), en oscuridad, durante siete días, para estimular el desarrollo de las colonias; se midieron diariamente, hasta que el pseudohongo llenó la caja Petri. De cada aislado se realizaron preparaciones del micelio, presencia de clamidosporas y esporangios con glicerina al 10 % y se observaron al microscopio compuesto. Identificados los aislamientos, se procedió a su purificación y conservación en tubos con PDA, agregando aceite mineral.

Extracción de DNA genómico de *P. cinnamomi*.

El ADN de cada aislamiento que se utilizó en las pruebas de patogenicidad se extrajo de colonias miceliales desarrolladas en medio de cultivo PDA de aproximadamente siete días de crecimiento. Para la extracción del ADN se empleó la técnica de Sambrook y Russell (2001) y la calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermoscientific). Se amplificaron las regiones ITS con los primers ITS'5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS'4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de genes rRNA de las subunidades 18S-5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990). Para la reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 µL con la siguiente formulación: 13.22 µL de agua ultrapura estéril, 2.5µL con solución amortiguadora (TBE 1X), 2.08 µL de MgCl₂ a 2.5 Mm, 2 µL dNTPs a 2.0 mM, 2 µL de cada uno de los iniciadores ITS5 e ITS4 a 20 pMol, 0.2 µL de Taq-DNA polimerasa a 1.5 U y 1 µL de muestra de ADN 80 ng. La reacción se realizó en un termociclador Perkin-Elmer (Mod. CT 2400), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min; la extensión final fue a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se purificó con el KIT Quiagen® y la calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. La banda se visualizó en un transiluminador GelDoc 2000, BIO RAD®, y se analizó con el programa QuantityOne 4.0.3 (Sambrook y Rusell, 2001). El producto de PCR se envió a la compañía Macrogen, E.U.A, para su secuenciación (secuenciador Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer). Las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS5–ITS4 se alinearon con las disponibles en el banco de genes del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), de E.U.A. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los valores cuantitativos generados, solo se bajaron las secuencias con el valor más alto, para su comparación con las que se obtuvieron

en este estudio. Las secuencias se alinearon con Clustal W versión 1.6. y se depositaron en la base de datos del Gen Bank para obtener su número de acceso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislamientos obtenidos de las diferentes localidades, con la metodología descrita, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Aislados obtenidos de *P. cinnamomi*, empleados en las pruebas de patogenicidad y agresividad en plantas de *Pseudotsuga menziesii*.

Clave	Localidad	Hospedante	Origen Suelo/Raíz/cancro
COL – A	El Arrayanal, Col.	<i>Quercus salicifolia</i> .	cancro
GRO – P	Tecoanapa, Gro	<i>Quercus elliptica</i> .	cancro
JAL – C	Manántlan, Jal.	<i>Quercus peduncularis</i> .	Suelo
MICH- P	Peribán, Mich.	Aguacate	Raíz
EDO –T	Edo. de México	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Suelo

Los cinco aislamientos inoculados ocasionaron síntomas de la enfermedad, entre estas clorosis, defoliación, muerte de ramas, canchros en la corteza y finalmente la muerte de la planta. En este estudio se relacionó la sintomatología causada por *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*, la cual coincide con lo reportado por Erwin y Ribeiro (1996).

De igual manera, Robinson y Desprez–Loustau (1998), quienes inocularon discos de agar de micelio de *P. cinnamomi* en plantas de castaño y roble rojo, probaron su patogenicidad, encontrado que todas las plantas manifestaron síntomas de amarillamiento, defoliación,

agrietamientos, coloración color marrón y canchales pero con diferente nivel de agresividad. Sin embargo, Chastagner (1997), hace mención que la formación o desarrollo del cancro no siempre se forma ya que este dependerá del mecanismo del patógeno y del ambiente.

Por otra parte, Jordan y Tainter (1996) observaron que al inocular plantas de robles blancos y rojos, estas especies son muy susceptibles a *P. cinnamomi* y que los síntomas pueden tardar meses a años para ser evidentes.

Podger (1989) por su parte, menciona que cuando utilizó 14 aislados australianos de *P. cinnamomi*, aisladas de 10 especies de plantas hospederas, causaron enfermedad en especies de dicotiledóneas y el síntoma principal consistió de una coloración anormal en raíz y finalmente la muerte. Los aislados no mostraron diferencia en su patogenicidad.

En México no existen reportes donde se reporte la patogenicidad con aislados de *P. cinnamomi* de diferentes regiones y diferentes hospedantes sobre plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.

Identificación morfológica

Las cinco colonias aisladas de árboles de *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* mostraron un crecimiento uniforme en medio de cultivo PDA. El crecimiento micelial en medio de cultivo fue de aspecto algodonoso, de color blanco, en forma de camelia (**Figura 1**) debido al crecimiento deprimido; micelio cenocítico, toruloso, con hifas coraloides y abundantes hinchamientos, presentando esporangios ovoides, piriformes a elongados y ápice no papilado. Estas características de *P. cinnamomi* concuerdan con las reportadas por Edwin y Ribeiro (1996), Gallegly y Hong (2008) y Waterhouse (1963). En cuanto a la forma y tamaño de los esporangios, estos varían con las condiciones ambientales y solo se producen en extracto de suelo (Sánchez *et al.*, 2002b). Mediante esta técnica, se obtuvo y midió el largo y ancho promedio de 100 esporangios de

cada aislado, los valores obtenidos fueron los siguientes: COL-A 40.49 x 28.19, JAL-C 40.81 x 28.63 μm , GRO-P 48.24 x 31.47 μm , EDO-T 43.2 x 32.9 μm y MICH 56.23 x 33.8 μm , por su parte Edwin y Ribeiro (1996), reportan valores de 75 x 40 μm por lo que no concuerdan con las obtenidas en este estudio. Por otra parte las condiciones ambientales de cada región van a influir en el tamaño de las estructuras de los esporangios.

Se observó que este patógeno produce clamidosporas esféricas, ovales, piriformes, terminales o intercalares, frecuentemente en racimos que persisten en el suelo por años, las cuales constituyen un órgano de conservación y supervivencia como lo reportan (Erwin y Ribeiro (1996); Jung *et al.*, (2013) y Zemtmyer *et al.*, (1996).

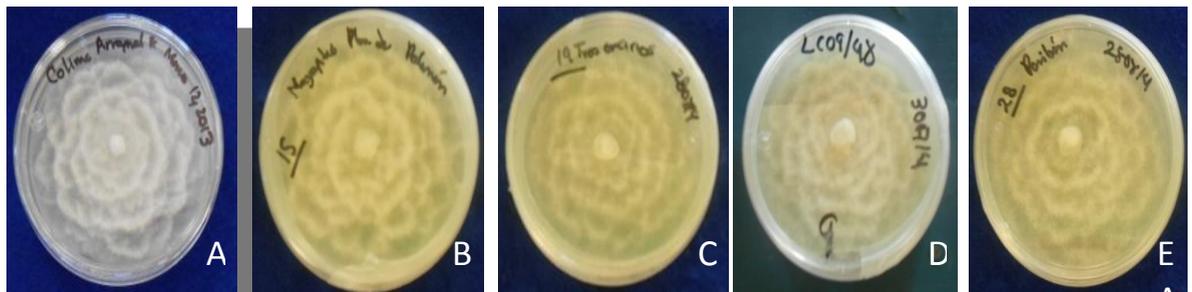


Figura 1. A) Aislados de *P. cinnamomi* de siete días de edad en forma de camelia, desarrollándose en medio de cultivo PDA. Con clave: A) COL-A, B) GRO-P, C) EDO-T encinos, D) JAL-C y E) MICH-P.

Pruebas de patogenicidad

Ocho meses después de la inoculación, todas las plantas de *Pseudotsuga menziesii* que se les colocó el patógeno presentaron síntomas de marchitez de brotes, flacidez en las puntas, clorosis en las acículas, muerte de ramas en la base de la planta, pudrición de raíz, color café rojizo en las acículas y finalmente murieron. Acompañado del desarrollo de cancro en el tallo, el cual se caracterizó por la presencia de necrosis en la epidermis del mismo y desprendimiento de la corteza, dando una coloración de color café claro a oscura. Esto permitió comprobar la patogenicidad y severidad del oomyceto en la planta hospedante. A partir del tejido infectado de las plantas inoculadas con cada aislado, se reaisló el patógeno similar a *P. cinnamomi*. Las plantas que se emplearon como testigo no presentaron ningún síntoma asociado. No se encontraron estudios similares en especies forestales, sin embargo, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Ceja *et al.*, (2000) en plantas de aguacate inoculadas con *P. cinnamomi* quienes observaron que el patógeno provocó marchitez en el follaje, presencia de cancro de color oscuro en tallo con una lesión interna de color café y finalmente la muerte de las plantas.

Los aislados presentaron una agresividad diferente en el hospedante inoculado. El aislado COL-A del Arrayanal, Col., procedente de *Quercus salicifolia*, fue el primero en causar síntomas visibles 120 después de la inoculación. El aislado GRO-P, procedente de *Q. elliptica*, ocasionó los síntomas 180 días después de la inoculación; en el caso del EDO-T, de *Pseudotsuga menziesii*, se requirieron 210 días, lo mismo que para JAL-C, obtenido de *Q. peduncularis*, y para MICH-P, aislado de *Persea americana* 240 días (**Figura 2**). Los resultados anteriores muestran que el aislado COL-A se comportó como el más agresivo en las plantas de *Pseudotsuga menziesii*, por lo que es evidente que hay una variación de la

patogenicidad y agresividad entre los aislamientos de las diferentes regiones de México, aun siendo la misma especie.

Los datos anteriores, específicamente el número de días que tardaron en manifestarse los síntomas, se sometieron a un análisis estadístico, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Se obtuvieron diferencias significativas entre los aislados (P 0.0001) (**Cuadro 2**). El aislado COL-A fue estadísticamente diferente al resto de los demás, mostrando una media de rango mayor a la de los otros.

Cuadro 2. Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la agresividad de la enfermedad de los cinco aislamientos de *Phytophthora cinnamomi*.

Tratamiento	Hongo	Medias de rangos	Grupos
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	31.50	A
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	60.68	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	64.85	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	64.85	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	66.52	B
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	97.00	C

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la agresividad de los aislados de *P. cinnamomi* coinciden con los reportados por Huberli *et al.*, (2001), quienes encontraron que la agresividad de aislados australianos en plantas de *Eucalyptus marginata* y *Corymbia calophylla* mostraron tres tipos de respuesta: la primera, con alta capacidad para matar plantas, a los 59 días, después de la inoculación; la segunda, de 182, los cuales fueron

considerados intermedios y la tercera, los que no inducen muerte de planta, pero son considerados los menos patogénicos.

Por su parte, Dudzinski *et al.*, (1993), encontraron diferencias entre los aislados de *P. cinnamomi* colectados en Australia inoculados en tallos de *Eucalyptus marginata*, estos autores detectaron una variación de la agresividad en la manifestación de síntomas, desde la inoculación hasta la muerte de la planta. Otros estudio realizado por Brasier *et al.*, (1993) menciona que *P. cinnamomi* es un patógeno agresivo en árboles de robles y que la introducción y la propagación de suelo de bosque con el patógeno puede ser un factor importante en la declinación y disminución del alcornoques en la Península Ibérica.

Por otra parte Tippet and Shearer (1985). Evaluaron el método de inoculación por herida en 21 árboles de *Eucalytus marginata* y observaron que no existe variación en la agresividad de *P. cinnamomi* en las plantas inoculadas.

Caracterización molecular

La banda del producto de PCR fue de aproximadamente 1200 a 1500 pb (**Figura 3**). Los resultados de la secuenciación de cada aislado se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI). Las secuencias por aislamiento tuvieron 99 % de índice de similaridad para la especie *P. cinnamomi*. Al comparar los nucleótidos de cada aislamiento e identificados morfológicamente con las reportadas en el banco de genes (NCBI), estas correspondieron a la misma especie. Esto corroboró la identificación morfológica de cada aislado (**Cuadro 3.**)

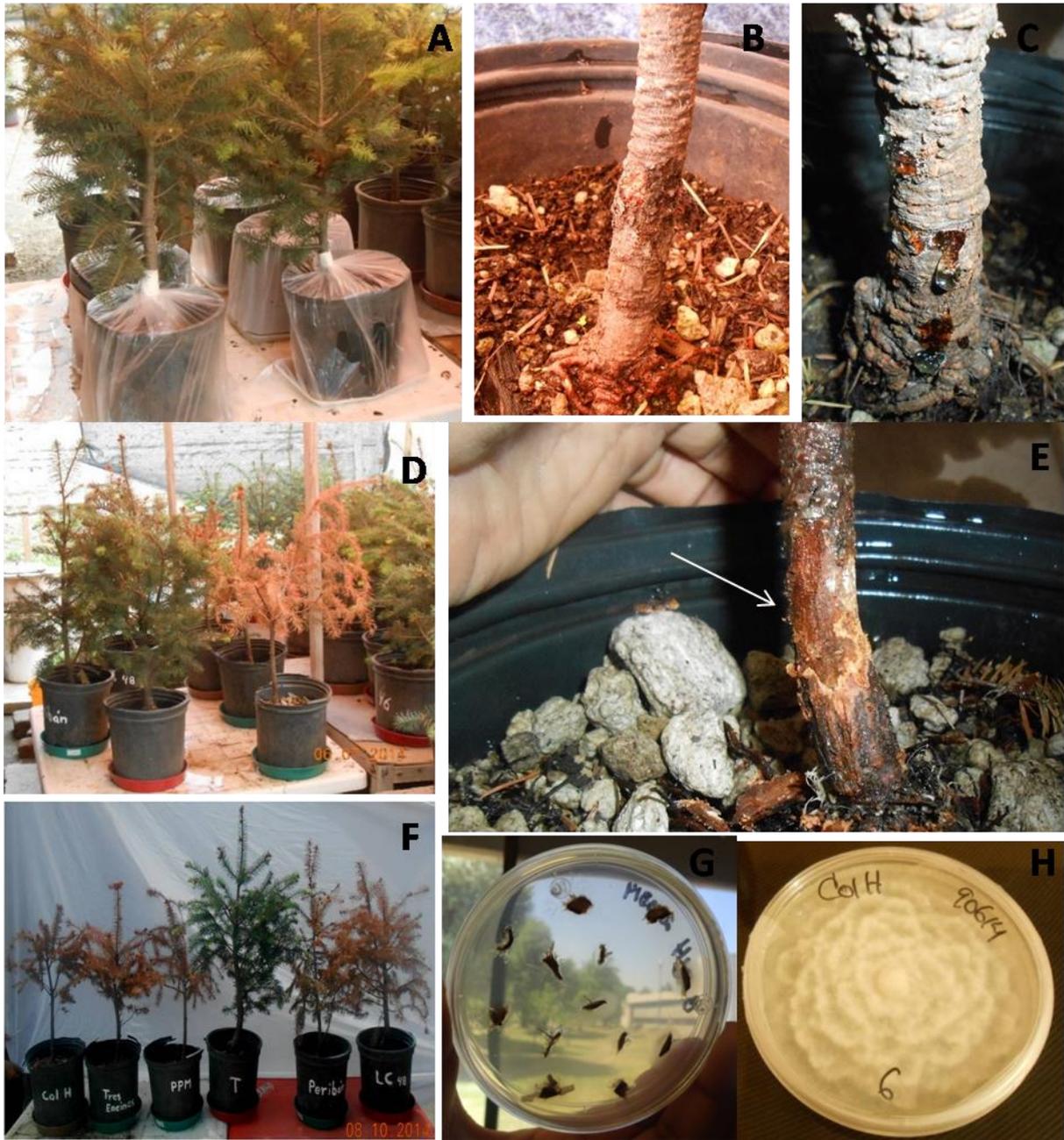


Figura 2.A) Desarrollo de síntomas en plantas de *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad inoculadas con los diferentes aislados de *P. cinnamomi* clave (COL-A, GRO-P, EDO-T, JAL-C y MICH-P). B) Cancro en plantas. C) Resinación en la base del tallo. D) Progreso de la enfermedad en la planta E) Cancro de coloración café claro a oscuro causado por el aislamiento COL-A. F) Testigo y plantas inoculadas durante las pruebas de patogenicidad. G) Tejido enfermo del aislado COL-A y micelio del organismo en medio selectivo PARHP. H) Aislamiento COL-A de *P. cinnamomi* de siete días en PDA.

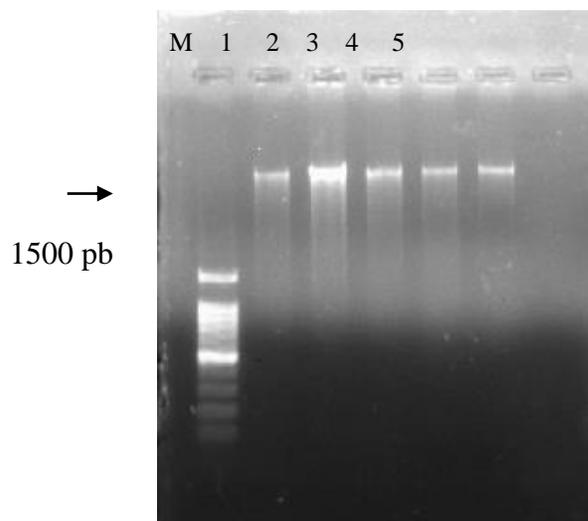


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % que muestra una banda de aproximadamente 1500 pb del producto amplificado por PCR con los iniciadores ITS4 E ITS5; M. Marcador molecular de 1 kb, carril 1. COL-A., 2. GRO-P., 3. JAL-C., 4. MICH-P y 5. EDO-T.

Cuadro 3. Identificación morfológica y molecular de aislados de *Phytophthora cinnamomi*, número de nucleótidos, especie alineada con el 99 % de confiabilidad y número de acceso en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Clave de Aislamiento	de Identificación morfológica	No. de nucleótidos	Especie alineada	Núm. de acceso a especie alineada NCBI
Col-A	<i>P. cinnamomi</i>	1046	<i>P. cinnamomi</i>	KP773290
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	925	<i>P. cinnamomi</i>	KP773291
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	940	<i>P. cinnamomi</i>	KP773292
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	926	<i>P. cinnamomi</i>	KP773293
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	952	<i>P. cinnamomi</i>	KP773294

CONCLUSIONES

De las muestras de suelo, cancro y raíz, obtenidas de *Quercus salicifolia*, *Q elliptica*, *Q peduncularis*, *Pseudotsuga menziesii* y *Persea americana*, se logró aislar e identificar a *P. cinnamomi*.

Todos los aislados de *Phytophthora cinnamomi* mostraron ser patógenicos.

Los síntomas observados en invernadero concuerdan con la sintomatología manifestada en campo donde este patógeno es responsable del declinamiento y muerte en las plantas de *P. menziesii* y otros hospedantes como encinos y aguacate donde ha sido reportado.

El aislado COL-A fue el primero en causar síntomas visibles, a los 120 después de la inoculación, y estadísticamente fue diferente al resto, por lo que se considera el más virulento.

Este es el primer estudio en México donde se reportan diferencias en la virulencia entre aislados de *P. cinnamomi* procedentes de diferentes lugares y hospedantes sobre *P. menziesii*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento y aceptación para realizar mis estudios de postgrado

LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales, D., L. de L. Saavedra, Romero, A. Almaraz-Sánchez., B. Tlapal-Bolaños, O Trejo-Ramírez., M. J., Davidson, J.T. Kliejunas, S. W. Oak, O'Brien. G. J., F Orozco-Torres y Quiroz-Reygadas. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-este de México. Polibotánica 23: 1-21.
- Alvarado-Rosales-D., L. de L Saavedra y A. Almaraz-Sánchez. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino *Quercus* spp., en Tecoaapa, Guerrero, México. Agrocienca 42: 565-572.
- Bryla, D., and R. Linderman. 2007. Implications of irrigation method and amount of water application on *Phytophthora* and *Pythium* infection and severity of root rot in highbush blueberry. Hort-Science 42:1463-1467.
- Balci, Y., and Halmschlager, E. 2003. Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. For. Pathol. 33:157-174
- Balci, Y., S. Balci, W. L. MacDonald, and Gottschalk, K. W. 2008. Relative susceptibility of oaks to seven species of *Phytophthora* isolated from oak forest soils. For. Pathol. 38:394-409.
- Brasier, C. M., Robredo, F., Ferraz, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant. Pathol. 42, 140–145.
- Crone, M. McComb, J.A, O'Brien P.A, Hardy G.E.St.J. 2013. Assessment of Australian native annual/herbaceous perennial plant species as asymptomatic or symptomatic hosts of *Phytophthora cinnamomi* under controlled conditions. For. Pathol. 245-251
- Ceja, T.L.F., Téliz, O.D., Osada K.S., Morales.G.J.L.2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea Americana* Mill. en cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Rev. Mexi. Fitopatol. 18:79-86
- Chastagner,G.A., Brther, R. and Antonelli, A., et, al. Associate (Eds). 1997. Christmas Tree Diseases, insects, and disorders in the Pacific Northwest: Identification and Management. Washington State University USA. 27-30
- Davidson, J.M., O'Brien, J.G.,S. Oak, and J. Kliejunas.2003. Report on a site visit to México-Muerte del Encino. USDA Forest Service. 9 p.

- Dos Santos Á.F, D. J. Tessmann, T. C. A. Alves, J. B. Vida, and R. Harakava. 2011. Root and crown rot of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) caused by *Phytophthora cinnamomi*. J. Phytopathol. 159:194-196
- Dudzinski, M.L., O.L.D. K.M. and Gibbs., R. J. 1993. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. Aust. J. Bot 17: 35-37
- Erwin, D. C and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. USA. 562
- Gallegly, M.E., and Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. ST. Paul, MN USA. 158
- Garbelotto, M., Huberli D, Shaw D. 2006. First report on an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in natural oak woodlands of California and its differential impact on two native oak species. Plant Dis. 90:685
- García, D.S.E. 2007. Pudriciones de raíz por *Phytophthora*/Rootrot by *Phytophthora*. En: Cibrián T.D., Alvarado, R.D. y García. D.S.E (Eds). 2007 Enfermedades forestales en México/ Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo y CONAFOR. 587
- Hardham, A. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6: 589-604.
- Hansen, E. M., Parke, J. L., and Sutton, W. 2005. Susceptibility of Oregon forest trees and shrubs to *Phytophthora ramorum*: a comparison of artificial inoculation and natural infection. Plant Dis. 89:63-70
- Huberli, D., Tommerup, L. C., Dobrowolski, M. P., Calver, M. C., and Hardy, E. St J. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. Mycol. Res. 105:1053-1064.
- Jordan, A.P. and Tainter, F.H. 1996. The susceptibility of Southern Appalachian Oaks to *Phytophthora cinnamomi*. Department of Forest Resources, Cleson University, USA. Castanea 61(4): 348-355.
- Jönsson U, Jung T, Sonesson K and Rosengren U. 2005. Relationships between health of *Quercus robur*, occurrence of *Phytophthora* species and site conditions in southern Sweden. Plant Pathol. 54: 502-511.
- Jeffer, N., Martín, J.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Dis. 70, 1038-1043.

- Martin, R.R., James, D., Léves. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* 38: 207-239.
- O’Gara, E., Hardy, G.E.S.U.and Mc Comb, I.A .1996.The ability of *Phytophthora cinnamomi* to infect through unwounded and wounded periderm tissue of *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology* 45: 955-963.
- Pariaud, B., Rauigné, V., Hal kett,F. Goyeau, H., Carlier, J. y Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58:409-424.
- Pérez, R.M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European J Plant Sci Biotechnol* 2(1):1-24.
- Philip, A. O’Brien, Nari Williams, and Giles E StJ Hardy. 2009. Critical Review in *Microbiology* 35(3): 169–181.
- Podger, F.D. 1989. Comparative pathogenicity of fourteen Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* determined on transplants of Tasmanian temperate heathland. *Aust.J.Bot.* 37: 491–500
- Robin, C. and Desprez-Loustau, M. L. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* (Buscar abreviatura) 104: 465-475.
- Sánchez, M.E, Andicoberry S, and Trapero, A. 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathol* 35: 115-125
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J., Trapero, A. 2002b. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* insouthwestern Spain. *For. Path.* 32, 5-18.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volumen 1*, 3rd. edition. Cold spring Harbour Laboratory Press, NY. USA.234 P.
- Shew, H.D., and Benso, D.M.1983. influence of soil temperature and inoculum density of *Phytophthora cinnamomi* on root rot of Fraser fir. *Plant Dis.* 67:522-524.
- SAS Intitute. 2012. *GLM Procedure*. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Tainter, F.H., O’Brien, J.G., Hernández, A., and F. Orozco. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Dis.* 84(4):394-398.

- Tamietti, G. 2003. First report of *Phytophthora cinnamomi* on high-bush blueberry in Italy. Plant Dis 87:451.
- Tamayo, P.J. 2007. Enfermedades del aguacate. Revista Politécnica 4:52-71.
- Tsai, H. L., Huang, L.C., Ann P.J. and Liou, R.F. 2006. Detection of orchid *Phytophthora* diseases by nested PCR. Bot Bull. Acad. Sin. 47: 379-387.
- Téliz, O.D. y Mora, A.A. 2007. El aguacate y su Manejo integrado 2nd edición. Mundi-Prensa, México. 287-306.
- Thompson, S.E., Levin, S. & Rodriguez-Iturbe, I. 2014. Rainfall and temperatures changes have confounding impacts on *Phytophthora cinnamomi* occurrence risk in the southwestern USA under climate change scenarios. Glob. Chang. Biol. 20 1299–1312
- Waterhouse, G.H. 1963 Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonw Mycol. Inst. Kew. UK. 92 p.
- Weste, G. 1975. Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* towards *Nothofagus cunninghamii* Aust. J. Bot. 23: 277–283
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J W. . 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc. pp. 315–322.
- Zentmyer, G.A. 1952. *Phytophthora cinnamomi* on avocado in México and Costa Rica and others avocado diseases in México. Plant. Dis. Rep. 36: 31 p.
- Zentmyer, A.G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph. 10 APS.Press. St. Paul, MN. USA. 96 pp.
- Zentmyer, G.A., Mircetich, S.M. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 56:710-112
- Zentmyer, G.A., Ohr. H.D and Menge. 1994. Compendium of Tropical Fruit Diseases, APS. 76 p

CAPÍTULO 3

Determinación de la severidad de aislados de *P. cinnamomi* Rads. en *Persea americana*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezii*.

Alejandra Almaraz-Sánchez¹, Dionicio Alvarado-Rosales¹, Gerardo Leyva-Mir², Armando Equihua-Martínez¹, Sergio Aranda-Ocampo¹ y Javier Hernández-Morales¹

¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 56230; ²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 56230.

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi es un patógeno que causa grandes pérdidas económicas y se encuentra distribuido en una amplia gama de hospedantes en el mundo. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la severidad de aislados de *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Persea americana*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezii*. Se seleccionaron cinco aislados de *P. cinnamomi* procedentes de cinco regiones de México, obtenidos de árboles de *Quercus salicifolia* de la región del Arrayanal Col (COL-A), *Quercus elliptica* de Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus pedunculari* de Manantlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* del Edo. de México (EDO-T) y *Persea americana* de Peribán Mich. (MICH-P). Los aislados se inocularon en plantas de aguacate y encino de seis meses de edad, y árboles de *Pseudotsuga* de dos años de edad. Para cada aislado se utilizaron diez repeticiones con su respectivo testigo. La evaluación de severidad se realizó utilizando una escala mediante el muestreo destructivo en follaje y en raíz. Los aislados se categorizaron de acuerdo a su grado de severidad en tres grupos: muy severos, moderadamente severos y levemente severos. Este estudio mostró que el aislado COL-A fue el más severo, le siguieron los aislados GRO-P, MICH-P moderadamente severos, y JAL-C y EDO-T como levemente severos en los tres hospedantes. Los datos de severidad y porcentaje de daño en raíz se analizaron mediante la

prueba de medias de rangos de Kruskal-Wallis con un nivel significancia α 0.05. Los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas en la severidad de los aislados así como en porcentaje de daño en raíz, siendo el más severo COL-A sobre los tres diferentes hospedantes. Este es el primer reporte donde se evaluó la severidad de *P. cinnamomi* en plantas de *Quercus mexicana*, *Persea americana* y *Pseudotsuga menziesii*.

Palabras clave: Oomyceto, *Pseudotsuga mensiezii*, *Persea americana*, *Quercus mexicana*

CHAPTER 3

Determining the severity of isolates of *P. cinnamomi* Rands. in *Persea americana*, *Quercus mexicana* and *Pseudotsuga menziesii*.

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi is a pathogen that causes great economic losses and is distributed in a wide range of hosts in the world. The main objective of this study was to evaluate the severity of *Phytophthora cinnamomi* isolates on *Persea americana*, *Quercus mexicana* and *Pseudotsuga menziesii* plants. Five isolates of the pathogen *P. cinnamomi* were collected from different host in five regions of Mexico: *Quercus salicifolia* in El Arrayanal, Col. (COL-A), *Quercus elliptica* from Tecoanapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* in Manantlan, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga menziesii* in the Estado de Mexico (EDO-T) and *Persea americana* from Peribán, Mich. (MICH-P). The five isolates were inoculated on avocado and oak plants six months old, and *P. menziesii* trees two years old. Ten repetitions for each isolate were used with its own control. To assess the severity of each isolate, a destructive sampling of foliage and roots was performed. Isolates were categorized according to their severity in three groups: severe, moderately severe and slightly severe. This study showed that COL-A isolate was the most severe, followed by GRO-P, MICH-P, and JAL-C and EDO-T in the three hosts. Data severity and percentage of root damage were analyzed by means of the test ranges Kruskal-Wallis with $\alpha=0.05$. The results showed statistically significant differences in the severity and percentage of root damage by the isolates, the most severe was COL-A on the three different hosts. This is the first report in which *P. cinnamomi* severity was evaluated on *Quercus mexicana* plants, *Persea americana* and *Pseudotsuga menziesii*.

Key words: Oomyceto, *Pseudotsuga mensiezii*, *Persea americana*, *Quercus mexica*

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi Rands es un Oomiceto de la familia *Phytophthoraceae*. Es un parásito facultativo y acuático que puede vivir en el suelo por mucho tiempo causa pudrición de la raíz y es una de las enfermedades más destructiva en todo el mundo (Zentmyer, 1980 y 1984; Erwin y Ribeiro, 1996). La primera descripción de *Phytophthora cinnamomi* la realizó Rands, en 1922, como el agente causal del cancro en tallo de árboles de canelo, en Sumatra (Erwin y Ribeiro, 1996). Desde entonces, sus daños se han reportado en diferentes países y hospedantes causando pudriciones radicales en la agricultura, horticultura y especies forestales (Hardhman, 2005; Kong *et al.*, 2003; Sanabria, 2003). La enfermedad aparece cuando el patógeno entra en contacto con las raíces y tiene las condiciones adecuadas de alta humedad en el suelo (Ben y Michelson 2010). Los síntomas causados por el patógeno son clorosis; defoliación, muerte de ramas, canchales en la corteza y pudrición de raíz (Erwin y Ribeiro, 1996; Sánchez *et al.*, 2002). En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952 causando daños severos en áreas productoras de aguacate y pérdidas de hasta 90 % trayendo como consecuencia su desaparición en de grandes regiones de Atlixco Puebla y Uruapan, Michoacán (Vidales *et al.*, 1994; Pérez, 2008; Téliz 2000; Téliz y Mora, 2007; Tamayo, 2007). Se ha reportado también en bosques naturales de *Quercus* spp., a principios del año 2000 en El Arrayanal, Col., ocasionando la muerte y daños en árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000). Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008). También se reporta afectando árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, México y Veracruz (García *et al.*, 2007).

Este patógeno representa una amenaza para especies de plantas tanto comerciales como bosques naturales como *Persea americana*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezii*, que se encuentran en otras partes del país, ya que el desconocimiento de esta información puede traer como consecuencia una alta probabilidad de diseminar al patógeno con materiales contaminados a plantaciones establecidas o suelo del bosque con arbolado enfermo para su uso en viveros forestales. Por esto, se realizó el presente estudio con el siguiente objetivo evaluar la severidad de aislados de *P. cinnamomi* en plantas de *Persea americana*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado en este estudio fueron plantas de *Persea americana*, provenientes del vivero de Yautepec Morelos, *Quercus mexicana* del vivero forestal de Temamatla en el Edo. de México, ambas de seis meses de edad, y plantas de *Pseudotsuga mensiezii* de dos años de edad procedentes de Agros navidad, S.A. de C.V del Valle de Bravo, Edo. de México.

Aislados

Los aislados empleados en esta investigación se obtuvieron de suelo, raíz y canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* de cinco regiones de México los cuales fueron identificados a través de un análisis morfológico y molecular **Cuadro 1**. El aislado de aguacate, con clave MICH-P, fue proporcionado por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH.

Cuadro 1. Aislados de *P. cinnamomi*, empleados en las pruebas de severidad.

Clave	Localidad	Hospedante	Origen Suelo/Raíz/cancro	Núm. de acceso NCBI
COL – A	El Arrayanal, Col.	<i>Quercus salicifolia.</i>	cancro	KP773290
GRO – P	Tecoanapa, Gro	<i>Quercus elliptica.</i>	cancro	KP773291
JAL – C	Manántlán, Jal.	<i>Quercus peduncularis.</i>	Suelo	KP773292
MICH- P	Peribán, Mich.	<i>Persea America</i>	Raíz	KP773293
EDO –T	Edo. de México	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Suelo	KP773294

(Almaraz *et al.*, 2015).

Preparación de inóculo

Los aislados se purificaron en medio selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) (Jeffers y Martin, 1986; Erwin y Ribeiro, 1996). Se realizó punta de hifa y se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar), en total se transfirieron 270 cajas para cada aislado. Se incubaron durante siete días en oscuridad, a una temperatura de ± 25 °C. Posteriormente se procedió a realizar las inoculaciones en los tres hospedantes utilizando dos tipos de inoculación: por inmersión de raíz para *Persea americana* y *Quercus mexicana* y por riego al sustrato en *Pseudotsuga mensiezii*.

Inoculación por inmersión de raíz

Para la inoculación de las plantas y con la finalidad de observar la severidad de los cinco aislados se utilizaron 60 plantas sanas de *Persea americana* y 60 de *Quercus mexicana* de seis meses de edad, se usaron 10 plantas de cada especie por cada aislado de *P. cinnamomi*. El método de inoculación consistió en tomar colonias de *P. cinnamomi*, de siete días de edad más 250 mL de agua destilada estéril que se agregando en licuadora lo cual se trituró y homogenizó por 1 min, para obtener una suspensión de fragmentos miceliales. Los cuales

se cuantificaron con un hematocitómetro Neubauer, obteniendo una concentración de 1×10^6 fragmentos miceliales por mL. Las plantas se inocularon por inmersión de raíz desnuda por inmersión en la suspensión de fragmentos miceliales, la cual consistió primeramente en lavar con agua corriente los cepellones de *Persea americana* y *Quercus mexicana*, en seguida se sumergieron hasta el cuello las plantas en la suspensión acuosa de fragmentos miceliales durante cuatro horas basadas en metodología de Zentmyer (1984). Como testigo se usaron 10 plantas de cada especie a las cuales se les trató de la misma manera, solo se les sumergió la raíz en agua destilada estéril. Una vez transcurrido el tiempo, cada planta se plantó en macetas individuales (capacidad 1L). Se utilizaron los sustratos de peat moss[®], agrolita[®] y vermiculita[®] en proporción (2:1:1) previamente esterilizado por 4 h a 15 lb de presión. Las plantas se regaron cada dos días a 100% de humedad relativa y una temperatura de $22 \pm 6^\circ\text{C}$ durante 72 h. Posteriormente, se mantuvieron en el invernadero en condiciones de un manejo normal. Las observaciones se realizaron cada 24 hrs utilizando la escala de severidad previamente realizada en campo en base a los síntomas de la enfermedad del patógeno como: clorosis foliar, vigor de la planta, muerte de ramas, así mismo el porcentaje del daño del sistema radicular

Inoculación por riego al sustrato

Se utilizaron 60 plantas sanas de *Pseudotsuga mensiezii*, de dos años de edad, a las que se les agregó directamente una suspensión del patógeno al sustrato de cada planta. Este método consistió en tomar colonias *P. cinnamomi* de siete días de edad más 300 mL de agua destilada estéril para obtener inóculo a una concentración de 2.7×10^3 fragmentos miceliales por mL. Como testigos se usaron 10 plantas a las cuales se les agregó solo agua destilada estéril. Finalmente todas las plantas se regaron cada dos días a capacidad de campo durante

seis meses y una temperatura ambiente de $\pm 26^{\circ}\text{C}$. Las plantas se distribuyeron al azar sobre mesas en el invernadero todo esto se realizó bajo condiciones asépticas.

Reaislamiento del patógeno.

Previo a la aparición de síntomas se obtuvieron muestras de raíces de 1 cm de longitud, tanto de plantas infectadas como testigos. Una vez que aparecieron los síntomas de marchitez, clorosis, necrosis foliar y pudrición de raíz se llevó a cabo otra toma de muestras en las plantas enfermas, realizando aislamientos de la zona del avance del patógeno en las raíces de cada planta con síntomas de la enfermedad, para lo cual se cortaron trozos de raíces de la zona del daño causado por el patógeno para esto se lavaron las raíces con agua corriente y posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por 2 min de inmersión, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y secándolos con papel estéril. El material se sembró en cajas Petri de plástico con medio de cultivo PARPH, con la finalidad de asociar la sintomatología observada en las plantas con el patógeno. Las cajas se incubaron en oscuridad a una temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, una vez crecidas las colonias se realizaron montajes permanentes en glicerol a 50% acidificado con HCL al 12N, para su observación al microscopio compuesto.

Variables evaluadas para los dos tratamientos

1.- La severidad de la enfermedad se evaluó tanto en la parte aérea como para la parte radical. Se determinó con base a la escala de Coffey (1991) considera la sintomatología visual de la planta las categorías son: 0 =planta sana, daño leve de follaje 1 = (planta con flacidez), daño medio 2= (follaje hoja seca), daño severo 3 = (hojas amarillas verdosas y ramas secas) 4= Daño muy severo árbol muerto de los aislamientos.

2.- Se midió el porcentaje daño en raíz con respecto a los síntomas aéreos. La evaluación de síntomas en raíz se realizó a la par en que se presentaban los síntomas aéreos durante 25 días se determinó con base a la escala visual arbitraria de la raíz en porciento: donde; 0% = raíz sana, 1 = 1 a 24 % raíz necrosada, 2 =25 a 49 % de raíz dañada, 3 =50 a 74% raíz dañada y 4 =75 a 100% de, raíz totalmente necrosada y muerta.

3.- Se evaluó el peso seco del follaje y raíz, previo a esto, se empacaron en bolsas de papel y se marcaron; enseguida, se colocaron en un horno de secado a 60 °C por dos días. Posteriormente se pesaron para su respectivo análisis. Aunque los aislamientos utilizados eran de diferentes procedencias, cada aislado fue evaluado bajo las mismas condiciones.

El diseño experimental fue completamente al azar, los resultados obtenidos se le aplicó una prueba de medias de rangos de Kruskalwallis con un nivel significancia α 0.05 utilizando el programa SAS (SAS, 2012), para determinar el comportamiento de los aislados de *P. cinnamomi* de las diferentes regiones de México.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Phytophthora cinnamomi indujo diferentes síntomas según el tiempo de infección de cada aislado en las especies de *Quercus mexicana*, *Persea americana* y *Pseudotsuga mensiezii* infectadas artificialmente por inmersión de raíz y por riego al sustrato, mientras que las plantas testigo no presentaron ningún cambio apreciable.

Inoculación por inmersión de raíz

En el caso de las plantas de *Persea americana* establecidas en el invernadero y tratadas con los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* procedentes de cinco regiones de México presentaron los síntomas en diferentes tiempos. El primer aislamiento que causó los síntomas

a las 24 hrs ddi en la planta correspondió a COL-A observándose en la planta una flacidez de las hojas, pérdida de vigor en la parte aérea, marchitez a las 72 hrs ddi, el follaje de las plantas se fue secando colocándolas en una escala de 3 y posteriormente aunado a la pérdida de vigor y marchitez se apreció amarillamiento de las hojas y café-claro. La muerte de la primera planta inoculada con el aislado COL-A fue de 192 hrs ddi y con un daño muy severo más de tres cuartas partes de la planta estaba seca tomando una coloración marrón y se observaron completamente secos con una evaluación de 4. Así mismo el % de daño de severidad en la parte radical se fue mostrando un necrosamiento con fácil desprendimiento del sistema radical y pudrición hasta 100% de daño total en raíz.

Mientras que, para la especie de *Quercus mexicana* las plantas inoculadas de *P. cinnamomi* presentaron síntomas similares, con diferencia de que en este caso en la parte aérea hubo un decaimiento de hojas de la planta muy evidentes, dado que también se observó flacidez de las hojas, pérdida de vigor en la parte aérea, marchitez. El follaje empezó a mostrar un amarrillamiento para después adquirir una coloración café, seguida de una coloración marrón y finalmente la planta quedó seca y totalmente muerta.

Así mismo, el aislado COL-A se comportó severo tanto en la parte aérea como radical en las plantas de *Persea americana* y *Quercus mexicana*. Al ser comparado con el resto de los demás aislados, presentándose síntomas de marchitez, flacidez de puntas, clorosis, muerte de ramas, pudrición de raíz, coloración rojiza en las hojas y finalmente murieron. El número de días que tardaron en manifestarse los síntomas, se sometieron a un análisis estadístico utilizando un modelo lineal generalizado con prueba de medias de rangos con un nivel de significancia α 0.05 (**Cuadro 2, 3, 4 y 5**). Se observó diferencias significativas en los análisis para la variable pudrición de raíz y daño en la parte aérea acción del patógeno sobre su

hospedante. Sin embargo, se observó el mayor número de plantas muertas y porcentaje de daño en la parte radical en menor tiempo con el aislado COL-A teniendo un comportamiento similar en los dos hospedantes de seis meses de edad. Las plantas de *Persea americana* y *Quercus mexicana* requirieron diferentes días para expresar los síntomas de la enfermedad para COL-A requirieron de 288 hrs ddi. Seguido de GRO-P, EDO-T, 332 hrs y JAL-C 504, MICH-P.528. En cuanto al sistema radical de las plantas de igual manera las raíces eran quebradizas y presentaban una coloración muy oscura. Tres semanas y media después del experimento, el 100% de las plantas *Persea americana* y *Quercus mexicana* habían muerto, presentando pudrición total en raíz y causando la muerte de las plantas. Estos resultados indican que el hongo *P. cinnamomi* infectó el sistema radical y coincide con lo reportado por Téliz (2000) para el caso de árboles de aguacate infectados por *P. cinnamomi*.

Los síntomas aéreos estuvieron siempre asociados con la presencia de la pudrición parcial o total de las raíces, lo que provocó al final la muerte de las plantas inoculadas con los aislados de *P. cinnamomi* de las diferentes regiones. En este estudio se relacionó la sintomatología causada por *P. cinnamomi* en plantas de *Persea americana*, la cual coincide con lo reportado por (Erwin y Ribeiro, 1996 y Ramírez 2013). Las plantas inoculadas mostraron pérdida de turgencia, marchitez de la parte aérea, necrosis en el sistema radicular y finalmente la muerte de la planta así mismo coinciden con los descritos por (Zentmyer, 1980 y Coffey, 1991) que manifiestan claramente que la sintomatología aérea es el reflejo del estado sanitario de las raíces de la planta de aguacate.

Este estudio mostró que los aislados de *P. cinnamomi* de las cinco regiones de México inoculados en las plantas de *Persea americana*, y *Quercus mexicana* presentaron diferencias significativas con el aislado COL-A proveniente de Arrayal Colima, que se mostró más

severo, le siguieron los aislados GRO-P, MICH-P moderadamente severos y JAL-C, EDO-T levemente severo. Todos se comportaron diferentes con respecto al testigo, de acuerdo a la escala de severidad tanto aérea y radical que se utilizó (**Figura 1 y 2**).

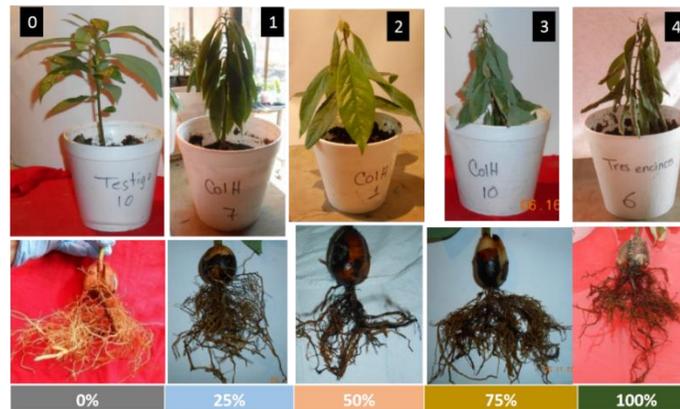


Figura 1. Escala de severidad de síntomas aéreos de *P. cinnamomi* en plantas *Persea americana*. (0) planta sana (1) planta con pérdida de turgencia (2) follaje hojas un poco seca, enroscada (3) hojas amarillas verdosas y hojas secas (4) planta muerta. Observe la escala de severidad, como a mayor daño en la parte aérea, el % de severidad de daño en raíz también se incrementó.

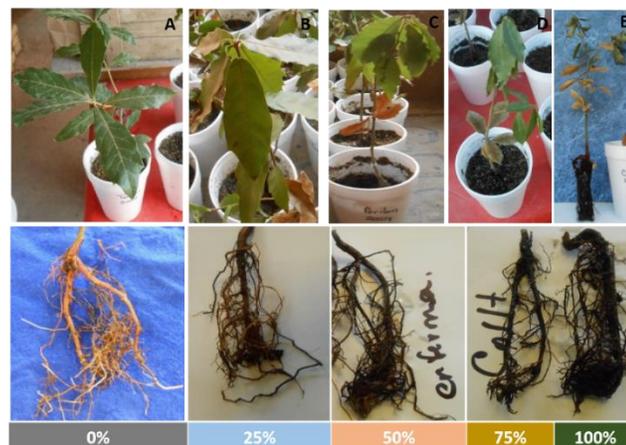


Figura 2. Escala de severidad de síntomas de *P. cinnamomi* de la parte aérea de *Quercus mexicana*. (0) planta sana (1) planta con pérdida de turgencia (2) follaje hojas un poco seca, enroscada (3) hojas amarillas verdosas y hojas secas (4) planta muerta. Observe la escala de severidad como a mayor daño en la parte aérea, el % de severidad de daño en raíz también se incrementó.

Zentmyer (1980) por su parte menciona que cepas aisladas de una misma especie pueden poseer diferente grado de severidad. De acuerdo a esto, se puede establecer que aunque los aislados son de la misma especie poseen diferente capacidad de provocar daño en sus hospederos. Por otra parte si bien la enfermedad fue más severa con el aislado COL-A de *P. cinnamomi* inoculado en las plantas de *Quercus mexicana* y *Persea americana*, no se observaron diferencias en la variable de peso seco entre los aislados de las diferentes regiones, pero si con el testigo.

Cuadro 2. Diferencias en severidad en la parte aérea de aislados de *P. cinnamomi* inoculados en *Quercus mexicana*

Tratamiento	Hongo	Medias de severidad de la parte aérea	Grupos
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	2.53	C
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	1.75	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	1.72	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	1.75	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	1.79	B
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	0	A

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 3. Diferencias en severidad en raíz de aislados inoculados de *P. cinnamomi* inoculados en *Quercus mexicana*.

Tratamiento	Hongo	Medias de % en severidad en raíz	Grupos
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	62.50	C
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	43.86	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	43.10	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	43.86	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	46.07	B
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	0	A

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 4. Diferencias en severidad de las plantas en la parte aérea inoculados con *P. cinnamomi* en plantas de *Persea americana*.

Tratamiento	Hongo	Medias de severidad de la parte aérea	Grupos
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	2.5	C
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	1.7	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	1.6	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	1.4	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	1.6	B
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	0	A

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 5. Diferencias de severidad en raíz de aislados *P. cinnamomi* inoculados en *Persea americana*.

Tratamiento	Hongo	Medias de % en severidad en raíz	Grupos
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	61.87	C
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	43.22	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	39.51	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	31.72	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	40.72	B
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	0	A

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Riego de inóculo al sustrato

Phytophthora cinnamomi indujo diferentes síntomas según el tiempo de infección en la especie de *Pseudotsuga mensiezii*, lo cual presentó: clorosis, marchitamiento de ramas algunas se tornó de color café, seguida de una coloración marrón, las raíces de las plantas enfermas estaban quebradizas, necrosadas y frágiles. El aislado COL-A inoculado en plantas de *Pseudotsuga mensiezii* de dos años de edad, causó enfermedad en el hospedante tanto en la parte aérea como radical hasta que la planta estuvo totalmente muerta. El primer árbol que expreso los síntomas requirió de 96 días ddi. Los síntomas fueron marchitamiento de ramas, muerte de rama en la base que se tornó de color café rojizo (**Figura 3**). El primer árbol muerto se presentó a los cuatro meses ddi y en cinco meses la mayoría de los árboles presentaban más del 50 % de daño en raíz y con los síntomas típicos de la enfermedad. El último árbol

en morir tardo seis meses con 100% de daño en raíz. El resto de los aislados inoculados en las plantas de *P. mensiezii* causaron síntomas de la enfermedad en la parte aérea, así como en la parte radical. Los síntomas aéreos estuvieron siempre asociados con el estado sanitario del sistema radicular tanto parcial o total de estas, siendo escasas, débiles y quebradizas, lo que provocó al final, la muerte de árbol. A diferencia de las plantas testigo que no presentaron ninguno de los síntomas. Los síntomas anteriormente descritos coinciden con otros autores como (Cibrián *et al.*, 2007; Erwin y Ribeiro, 1996; Jordán y Tainer, 1996; Huberli *et al.*, 2002; Zentmyer, 1980) quien realizaron trabajos con diferentes hospedantes y observaron síntomas similares a los ya mencionados.

Los datos obtenidos utilizando la escala de severidad tanto de la parte aérea como la radical en *Pseudotsuga mensiezii*, una prueba de medias de rangos de Kruskalwallis con un nivel significancia α 0.05. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre los aislados (Cuadro 6 y 7).



Figura 3. Desarrollo de los síntomas en *Pseudotsuga mensiezii* en plantas inoculadas con diferentes aislados de *P. cinnamomi*. El testigo presenta un desarrollo normal comparado con las plantas inoculadas.

Cuadro 6. Diferencias en severidad de las plantas en la parte aérea inoculados con *P. cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.

Tratamiento	Hongo	Medias de de daño	Grupos
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	2	C
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	1.33	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	1.41	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	1.35	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	1.08	B
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	0	A

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 7. Diferencias de severidad en raíz de aislados *P. cinnamomi* inoculados en *Pseudotsuga mensiezii*.

Tratamiento	Hongo	Medias de % en severidad en raíz	Grupos
COL-A	<i>P. cinnamomi</i>	50.0	C
MICH-P	<i>P. cinnamomi</i>	33.33	B
EDO-T	<i>P. cinnamomi</i>	37.82	B
JAL-C	<i>P. cinnamomi</i>	33.78	B
GRO-P	<i>P. cinnamomi</i>	26.92	B
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	0	A

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

En general, el comportamiento de los aislados en *Quercus mexicana*, *Persea americana* al final del experimento, fue que todas las plantas inoculadas COL-A murieron de 288 hrs ddi y *Pseudotsuga mensiezii* de cuatro meses ddi en comparación del resto de los demás aislados. Podger (1989) por su parte, menciona que cuando utilizó 14 aislados australianos de *P. cinnamomi*, aisladas de 10 especies de plantas hospederas, causaron enfermedad en especies de dicotiledóneas y finalmente la muerte. Con los resultados obtenidos de los cinco aislados de *P. cinnamomi*, de las diferentes regiones, las cuales causaron los síntomas típicos de la enfermedad de la tinta tanto en la parte aérea como radical, el patógeno tiene la capacidad de dañar al hospedante tal como lo señala Erwin and Ribeiro, (1996).

Si bien la enfermedad fue más severa con el aislados COL-A, no se observaron diferencias significativas en las variable de peso seco entre los tratamientos inoculados con los aislados pero si con el testigo.

En todas las macetas donde se inoculó al patógeno se reaisló nuevamente *P. cinnamomi* de las raíces de las plantas realizándose los postulados de Koch y los aislamientos fueron identificados de acuerdo a al crecimiento en forma de camelia en medio PDA, de color blanco, micelio cenocítico, turuloso y abundantes hinchamientos, indicando que estos aislamientos corresponden a *P. cinnamomi* (**Figura 5**). Las plantas testigo no mostraron ningún síntoma de la enfermedad. En general *P. cinnamomi* afecta el desarrollo del sistema radical de las plantas y por lo tanto se reduce la salud y desarrollo de los hospedantes.

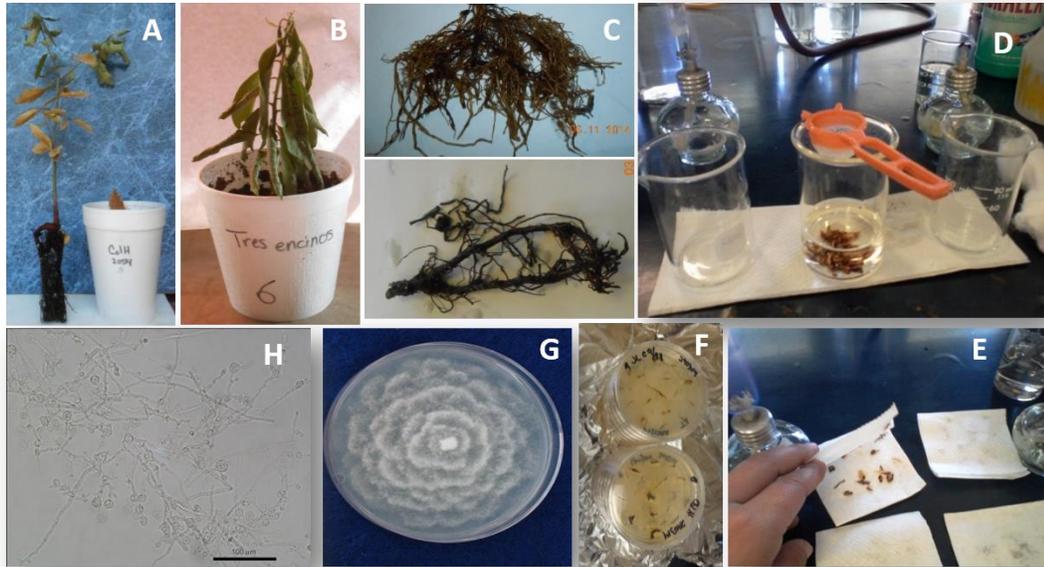


Figura 4. A y B) Progreso de la enfermedad en plantas de *Persea americana*, y *Quercus mexicana* inoculadas con *P. cinnamomi*. C) Tejido enfermo días después de inoculación con el patógeno D, E, F) Siembra de la raíz del tejido enfermo en medio PARPH . G) Crecimiento en forma cameloide de *P. cinnamomi* a los siete días de edad en medio PDA y H) Vista al microscopio compuesto del micelio coraloide (100 X).

CONCLUSIONES

Se corrobora que *P. cinnamomi* es responsable en causar la enfermedad. Los síntomas observados en invernadero concuerdan con la sintomatología manifestada en campo donde este patógeno es responsable del declinamiento y muerte en las plantas de *Persea americana*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezii*. Los resultados encontrados enfatizan la necesidad de aumentar investigaciones sobre las poblaciones de este patógeno en México y muy especial en el aquellos aislamientos que afectan hospedantes diferentes a su origen, especialmente en cultivos susceptibles, a este patógeno.

Los aislados de las cinco regiones de México *P. cinnamomi* evaluados en la severidad de la parte aérea y radicular en plantas de *Persea americana*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezi* presentaron diferencia significativas en menor tiempo.

El aislamiento COL-A fue el primero que causó los síntomas de severidad en menor tiempo, en la parte aérea como la radical en los tres hospedantes.

Este es el primer estudio en México donde se reportan la severidad de *P. cinnamomi* procedentes de diferentes lugares e inoculados en plantas *Persea drymifolia*, *Quercus mexicana* y *Pseudotsuga mensiezi*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento y aceptación para realizar mis estudios de postgrado

LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales, D., L. de L. Saavedra, Romero, A. Almaraz-Sánchez., B. Tlapal-Bolaños, O Trejo-Ramírez., M. J., Davidson, J.T. Kliejunas, S. W. Oak, O'Brien. G. J., F Orozco-Torres y Quiroz-Reygadas. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. Polibotánica 23: 1- 21.
- Alvarado-Rosales-D., L. de L Saavedra y A. Almaraz-Sánchez. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino *Quercus* spp., en Tecoaapa,Guerrero, México. Agrociencia 42: 565-572.
- Ben Y, Michelson E. 2010. Avocado Rootstocks. Horticultural Review 17: 381-429.
- Cibrián, T. D., Alvarado, R.D., y García, E. S. 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo: CONAFOR-SEMARNAT. México: Forest Service USDA. EUA: NRCAN Forest Service. Canadá y Comisión Forestal de América de Norte. COFAN. FAO. Chapingo. México. 587 p
- Coffey M.1991. Cause and diagnosis of Avocado root rot. California Grower, 15:22-23
- Coffey MD.1992. Phytophthora root rot of avocado. In Plant 22: 423-444.
- Davidson, J.M., O'Brien, J.G.,S. Oak, and J. Kliejunas.2003. Report on a site visit to México-Muerte del Encino. USDA Forest Service. 9 p.
- Erwin, D. C and O. K. Ribeiro.1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. USA. 562 p.
- García, D.S.E. 2007. Pudriciones de raíz por *Phytophthora*/Rootrot by *Phytophthora*. En: Cibrián T.D., Alvarado, R.D. y García. D.S.E (Eds).2007 Enfermedades forestales en México/ Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo y CONAFOR. 587 p.
- Hardham, A. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6: 589-604.
- Hüberli, D., Tommerup, I. C., Colquhoun, I. J. and Hardy, G. E. ST J., 2002. Evaluation of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in seed grown trees and clonal lines of *Eucalyptus marginata* inoculated in lateral branches and roots. Plant pathology 51, 435.

- Jordan, A.P. and Tainter, F.H. 1996. The susceptibility of Southern Appalachian oaks to *Phytophthora cinnamomi*. Department of Forest Resources, Clemson University, USA. *Castanea* 61(4): 348-355.
- Kong, P., Hong, C.X. and Richardson, P.A. 2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant Pathology* 52, 681-693.
- Pérez, R.M. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and Oomycetes. *The European J. Plant Sci Biotechnol.* 2 (1):1-24.
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J., Trapero, A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For. Path.* 32, 5-18.
- SAS Intitute. 2012. GLM Procedure. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sanabria H. 2003. La tristeza del aguacate y su control. *Horticultura global: revista de industria, distribución y socio economía hortícola* 171:61-62
- Tamayo, P.J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4:52-71.
- Tainter, F.H., O'Brien, J.G., Hernández, A. and F. Orozco. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, México. *Plant Dis.* 84(4):394-398.
- Téliz, D.O. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi- Prensa México, S.A de C.V. pp 146-148
- Téliz, O.D. y Mora, A.A. 2007. El aguacate y su manejo integrado 2nd edición. Mundi- Prensa, México. 321 p.
- Vidales, F.J.A; Morales, G.J.L. 1994. Guía para el cultivo del aguacate. Guía técnica núm 5, CIPAC, INIFAP SARH. 46 p.
- Zentmyer, A.G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph. 10 APS.Press. St. Paul, MN. USA. 96 p.
- Zentmyer GA .1984. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *California Avocado Society* 69: 89-94

CAPÍTULO 4

Efecto de *Trichoderma viride* y *Trichoderma virens* sobre *Phytophthora cinnamomi*, Rands en especies forestales en invernadero.

Alejandra Almaraz-Sánchez¹, Dionicio Alvarado-Rosales¹, Gerardo Leyva-Mir², Armando Equihua-Martínez¹, Sergio Aranda-Ocampo¹ y Javier Hernández-Morales¹

¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 56230; ²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 56230.

RESUMEN

Entre los microorganismos utilizados para el biocontrol de hongos patógenos del suelo, varias especies de *Trichoderma* spp. se han empleado debido a su rápido crecimiento y producción de metabolitos que inhiben el crecimiento de estos patógenos. El objetivo del presente estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro* e invernadero, el efecto biocontrolador de una cepa nativa de *Trichoderma viride* y la cepa comercial G-41 de *T. virens* contra *P. cinnamomi*. Se aisló a *Trichoderma viride* y *P. cinnamomi* de suelo y raíz, de árboles de plantaciones de *Pseudotsuga menziesii*, en el Rancho tres Encinos, Valle de Bravo, Estado de México. Los aislados fueron seleccionados para determinar su capacidad antibiótica contra *P. cinnamomi* mediante el método de celofán. La confrontación se realizó *in vitro*, con cinco repeticiones y sus testigos. En invernadero, se ensayaron dos tiempos de aplicación del antagonista en plantas de *Pseudotsuga menziesii* de dos años de edad: **1.Preventivo** inoculando las plantas primero con el antagonista y dos meses después al patógeno. **2. Curativo** inoculando primero al patógeno, y dos meses después el antagonista. Además de un control con *P. cinnamomi* y sin patógeno. Para cada aislado se utilizaron cinco repeticiones, en total fueron 30 plantas las que se mantuvieron bajo condiciones de

invernadero y la evaluación de síntomas se realizó cada 30 días durante un año nueve meses. Los resultados sugieren que tanto *Trichoderma viride* nativa como *Trichoderma virens* comercial G-41 al ser aplicados como preventivos tienen un efecto positivo ante el patógeno, mostrando incremento en altura y grosor de tallo, además de la reducción del progreso de la enfermedad en plantas. Con los datos de las variables altura y diámetro de tallo, se realizó un modelo lineal generalizado con prueba de medias Tukey con un nivel significancia α 0.05. mostrando que tienen potencial como agentes de control biológico.

Palabras claves: antagonismo, antibiosis, control biológico, *Trichoderma*

CHAPTER 4
Effect of *Trichoderma viride* and *Trichoderma virens* on *Phytophthora cinnamomi*
Rands under greenhouse conditions.

ABSTRACT

Among the microorganisms used for biocontrol of pathogenic soil fungi, several species of *Trichoderma* spp. have been used because of its rapid growth and production of metabolites to inhibit growth of the pathogens. The aim of this study was to evaluate in vitro and under greenhouse conditions, the biocontrol effect of a native strain of *Trichoderma viride* and the G-41 commercial strain (*T. virens* also) against *P. cinnamomi*. Native strains of *Trichoderma* and *P. cinnamomi* were isolated from soil and roots from *Pseudotsuga menziesii* plantations in the Rancho Tres Encinos, Valle de Bravo, Estado de Mexico. The isolates were screened for their antibiotic ability against *P. cinnamomi* by the cellophane method. The confrontation tests took place in vitro, and five repetitions and their respective controls were used. In greenhouse, two application dates of the antagonist were tested in *Pseudotsuga menziesii* plants two years old: 1. Preventive by inoculating the plants with the antagonist first and the pathogen two months after. 2. Curative by inoculating the pathogen first and the antagonist two months later. Five repetitions and the control for each isolate were used. A total of 30 plants were kept under greenhouse conditions and symptom assessment was performed every 30 days for 21 months. The results suggest that both native *Trichoderma viride* and the commercial G-41 when applied as preventive, they had a positive effect against the pathogen, showing also an increase on stem height and diameter. With the data of the variables height and stem diameter, a generalized linear model was obtained, by using the Tukey mean test (with $\alpha = 0.05$), showed that both strains have potential as biocontrol agents.

Key words: antagonism, antibiosis, biocontrol, *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi Rands es un patógeno del suelo causante de pudriciones radicales, que en el siglo pasado devastó aproximadamente 200 mil hectáreas de vegetación natural en Australia, destruyendo más de 400 especies hospedantes (Malajczuk, 1979). Es también responsable de serias pérdidas anuales de castaño, árboles de arándano y plantas ornamentales dentro de los viveros forestales de Estados Unidos de Norteamérica (Kong *et al.*, 2003). La “enfermedad de la tinta”, comúnmente así llamada, se ha reportado además en Argentina, California, España, Sudáfrica, Sudamérica y Taiwán, atacando un amplio rango de hospedantes (Agrios, 1989; Edwin y Ribeiro 1996; Brasier *et al.*, 1993; Mendoza, 1993; Zentmyer, 1980). En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952, causando daños severos en áreas productoras de aguacate y pérdidas de hasta 90 % (Pérez, 2008; Téliz y Mora, 2007; Tamayo, 2007). Así mismo, en bosques naturales de *Quercus* spp, a principios del año 2000, en El Arrayanal, Col., ocasionando la muerte y daños en árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000). Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008); afectando árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, México y Veracruz (García *et al.*, 2007).

Entre las alternativas para el manejo de *Phytophthora* spp. se encuentra el uso de hongos como el género *Trichoderma* debido a su versatilidad, adaptación y facilidad de manejo, además de sus diferentes mecanismos de acción, tales como micoparásitismo, antibiosis, competencia por espacio y nutrientes e inducción de resistencia en plantas contra patógenos (Howell, 2003; Mukherjee *et al.*, 2013). *Trichoderma* es utilizado en la agricultura como agentes de biocontrol con capacidad antagónica contra otros fitopatógenos que causan enfermedades en las raíces de las plantas, por lo que es utilizado como biopesticidas (Sid-Ahmed *et al.*, 2003; Stefanoca, 2007; Wilson y Backman, 1998). El primer investigador que descubrió el género *Trichoderma* fue Persoon en 1774 desde y, hace más de 200 años se ha estudiado su capacidad antagónica y se continúan descubriendo nuevas especies y nuevas interacciones (Druzhinina *et al.*, 2006). *Trichoderma* spp. tiene una distribución

cosmopolita, esta capacidad de adaptación le ha dado la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos y cultivos además de tener capacidad competitiva por espacio y nutrientes (Papavizas, 1985; Harman, 2000; Howell, 2003). Este género ha sido motivo de estudio con diversos fitopatógenos de importancia agrícola mostrando ser excelentes hiperparásitos competitivos porque producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que son de las más utilizadas como antagonistas para el control de enfermedades de plantas además de su rápido aislamiento, crecimiento y producción de metabolitos con poder antibiótico (Chet *et al.*, 1981; Druzhinina *et al.*, 2011; Ezziyyani *et al.* 2007; Ghisalberti *et al.* , 1991; Harman, 2004; Papavizas ,1981; Sid Ahmed *et al.*, 2003). *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida desde la germinación de esporas hasta la esporulación. Entre las especies de este género existen más de 50 especies, todas con efecto benéfico para la agricultura y otras ramas (Perez, 2000). Pero considerando el principio de que un agente de control biológico tenga éxito, deben considerarse diferentes factores como condiciones climáticas y hábitat que deban ser compatibles con las del patógeno de dichas región para la efectividad del control biológico (Watanabe *et al.*, 2005). Con base en lo anterior, se requiere la obtención de aislados nativos que sean capaces de competir con patógenos dentro del mismo nicho ecológico y puedan ser utilizados como controladores biológicos por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro* e invernadero, el efecto biocontrolador de la cepa nativa de *Trichoderma viride* y la cepa comercial G-41 *T. virens* contra el patógeno *P. cinnamomi*. en las plantas de *P. menziesii* y distinguir las capacidades de dichos organismos para que puedan ser empleados como agentes de control y ser capaces de competir con el patógeno dentro de un mismo nicho ecológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo

Los aislados *P. cinnamomi* y *Trichoderma viride* empleados en esta investigación se obtuvieron de suelo colectados durante los meses de febrero y noviembre de 2012 y 2013 en las localidades del

Rancho tres Encinos, Km. 40.5 (Carr. Toluca-Temascaltepec), Edo. De México, en las plantaciones de Agros Navidad, S.A. de C.V.

En el sitio de muestreo se tomaron 20 muestras compuestas de suelo-raíz de aproximadamente 1kg a una profundidad de 10 cm de la rizósfera del árbol, realizando un muestreo dirigido a árboles con síntomas de la enfermedad que causa *P. cinnamomi*. El suelo se colocó en bolsas de plástico, las cuales se etiquetaron y trasladaron en una hielera al laboratorio de fitopatología forestal del Colegio de Postgraduados para su procesamiento.

Fase de laboratorio

Aislados nativos de *Trichoderma* spp.

Para la obtención de cepas nativas de *Trichoderma* se utilizó la técnica de dilución de suelo PDA-TS (Papa- Dextrosa- Agar-Tergitol-Estreptomina) de Steiner y Watson (1965). Del área de estudio se procesaron un total de 20 muestras de suelo. Cada muestra se homogenizó dentro de la misma bolsa y enseguida se pesaron 10 g de suelo por muestra. El suelo se colocó dentro de un matraz Erlenmeyer con 90 mL de agua destilada estéril (un matraz por muestra); de esta suspensión (10^{-1}), se tomo 1 mL y se adicionó a un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril (10^{-2}), la dilución se repitió y se obtuvo la dilución 10^{-3} . De esta suspensión se tomó un 1mL, el cual se colocó 0.1 mL por caja (10 repeticiones). Posteriormente, a cada caja se le adicionó medio PDA-TS tibio, el medio se agitó ligeramente con un triángulo de vidrio; finalmente, las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente de ± 25 °C por diez días. Una vez crecidas las colonias, los hongos fueron sembrados por separado en cajas con medio PDA (papa-dextrosa-agar).

Identificación morfológica de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichodermas* spp aisladas, se hicieron crecer en medio de cultivo PDA e incubaron a ± 24 °C con luz blanca constante por cinco días. Con ayuda de las claves de Barnett and Hunter (1998) y Kubicek & Harman (1998). Se identificaron los aislados de *Trichoderma* nivel de género, con base en sus características morfológicas, entre estas: micelio, forma, color de la colonia, forma y tamaño del conidióforo, fialides, tamaño y color de conidios. Se realizaron preparaciones permanentes de las

colonias en glicerol al 50% y acidificado con 5 gotas de HCL a 12N para observar en el microscopio compuesto.

Aislado de *P. cinnamomi*

El aislado empleado en esta investigación se obtuvo de la raíz, de *Pseudotsuga mensiezii* el cual fue identificados a través de un análisis morfológico – molecular. La secuenciación mostraron una homología de 99 % de identidad con *P. cinnamomi* (No Accesoión: KP773294) (Almaraz *et al.*, 2015).

Prueba de celofán de *Trichoderma* spp. nativa y comercial.

Para conocer la capacidad antibiótica de las cepas de *Trichoderma*, se utilizó el método de papel de celofán (Denis y Webster, 1971). Al final selecciono al aislado de *Trichoderma* que presentó mayor habilidad para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*. El cual consistió en cortar papel celofán estéril al tamaño de la caja Petri, este se colocó bajo condiciones asépticas sobre cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA en el cual se colocó un disco de 5 mm de diámetro que se realizó con el sacabocado, esto para cada aislados de *Trichoderma* spp. de 8 días de edad, previamente cultivados en PDA. Las cajas se colocaron a temperatura ambiente de ± 25 °C durante cuatro días, tiempo suficiente para que *Trichoderma* se desarrollara. Se retiró el papel celofán y se colocó en el centro de la misma caja un disco de 5 mm del aislado con el patógeno. Se utilizó como testigo al patógeno *P. cinnamomi*, todo el material se colocó en oscuridad a temperatura ambiente a temperatura ambiente de ± 25 °C. Este proceso se realizó con diez repeticiones para cada aislado de *Trichoderma* nativo y *Trichoderma* comercial G-41. Cada 24hrs se observó el diámetro de la colonia de *P. cinnamomi*, creciendo en el medio de cultivo donde antes creció *Trichoderma* spp. Se observó la inhibición de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. contra el patógeno, el experimento concluyó hasta que el testigo con *P. cinnamomi* cubrió la caja Petri. Posteriormente se incrementó el inóculo de cada organismo para realizar las inoculaciones. El aislado nativo que inhibió mejor al patógeno se identificó a nivel de especie y se cultivó en PDA, observándose las siguientes características: forma de la colonia, el color de los conidios y disposición de la fialide. Se midió el largo y ancho de 100 conidios y 50 fialides, se observó la presencia o ausencia de clamidosporas,

éstas se compararon con las reportadas en las claves taxonómicas. Estos aislados de *Trichoderma* se identificaron a nivel de especie utilizando las claves especializadas descritas por Kubicek & Harman (1998).

Ensayos de *Trichodermas* spp. en invernadero

Las inoculaciones de los microorganismos del suelo se hicieron en forma individual en plantas de *Pseudotsuga menziesii* sanas de tres años de edad procedentes de Agros navidad, S.A. de C.V del Valle de Bravo Edo de México. Se emplearon dos tratamientos: **1. Preventivo**, primero inoculando las plantas con el antagonista y dos meses después al patógeno. La aplicación de *Trichoderma* nativa, *Trichoderma* comercial se realizó preparando una suspensión de los *Trichoderma* spp. Por separado en la licuadora agregando 300 mL de agua destilada estéril más tres cajas del crecimiento micelial se procedió a cuantificar el número de fragmentos del micelio por mililitro la solución correspondió a 2.7×10^3 mL *Trichoderma* spp y se colocó directamente al sustrato de cada planta. Esto se realizó cada 30 días dos veces, después de esta aplicaciones se preparó una suspensión micelial en licuadora, agregando con 300 mL de agua destilada estéril y una caja del crecimiento micelial de *P. cinnamomi*, de siete días de edad se trituró y homogenizó por 1 min. Enseguida se procedió a cuantificar el número de fragmentos de micelio del patógeno por mililitro con un hematocitómetro Neubauer, la solución correspondió a 1×10^6 mL. *P. cinnamomi* la cual se introdujo al suelo de la rizósfera repartido homogéneamente alrededor de la planta.

2. Curativo inoculando primero al patógeno y dos meses después al antagonista este consistió en aplicar *P. cinnamomi* y un mes después se aplicó *Trichoderma* nativa y *Trichoderma* comercial se procesó el inóculo de la manera antes mencionada. Para la evaluación de la patogenicidad de *P. cinnamomi* se tomaron cinco plantas sanas y se le inoculó solo a *P. cinnamomi* con la misma dosis. Para cada aislado se utilizaron cinco repeticiones con su respectivo testigo en total fueron 30 plantas y se distribuyeron al azar sobre mesas en el invernadero, a una temperatura ambiente de ± 26 °C y se regaron cada tercer días a capacidad de campo.

Variables evaluadas

Después de la inoculación de los aislados se evaluaron los síntomas y desarrollo de la enfermedad cada 20 días durante un período de dos años nueve meses. También, se midieron altura y diámetro de la base del tallo de las plantas, cada 30 días después de iniciado los tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento más el testigo. Los datos obtenidos en el ensayo fueron analizados con un modelo lineal generalizado con prueba de medias de Tukey con un nivel significancia α 0.05. con el programa SAS (SAS, 2012) Además se realizó el re-aislamiento de *Trichoderma* spp. y *P. cinnamomi*, a partir de los tratamientos inoculados en las raíces de las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de *Trichoderma* nativa, aislamiento, purificación e identificación.

La cepa aislada del género *Trichoderma* se identificaron por sus características morfológicas que resultaron: conidióforo hialino ramificado, fiálides individuales, conidios hialinos de una célula ovoides nacidos en pequeños racimos terminales en masa dan una coloración verde, producidas apicalmente. Estas características observadas concuerdan con las descritas por Barnett y Hunter (1998). La identificación morfológica a especie fue que las colonias de cinco días de crecimiento sembradas en medio de cultivo PDA, presentaron un crecimiento de 1.8 cm por día y una coloración blanca verdosa aparentemente granulada debido a la densa masa de conidios. Fiálides largas y delgadas cuyas medidas oxilaron $20 \mu \times 2.4-3 \mu$ de largo por ancho, de 2 a 3 vértices, conidios hialinos, subglobosos miden desde $2.6 \mu \times 3.6 \mu$ en relación largo por ancho, clamidosporas abundantes dichas características concuerdan (Kubicek & Harman, 1998). La identidad de la especie nativa de *Trichoderma viride* se confirmó con la identificación molecular mediante la comparación de las secuencias

obtenidas con las reportadas en el banco de genes del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) con un índice de similitud del 99%. La utilización de las técnicas moleculares así como la identificación morfológica son dos herramientas de gran importancia y relevancia ya que la combinación de diferentes técnicas permite el estudio más profundo de la diversidad de comunidades microbianas en general del suelo.

Prueba de celofán de *Trichoderma* nativas y comercial.

Los resultados obtenidos *in vitro* con el aislado nativo de *Trichoderma viride* y el comercial *Trichoderma virens* G-41 mostraron que se logró inhibir 100% del crecimiento de *P. cinnamomi* por antibiosis en la prueba de papel de celofán (Figura 1). El efecto antibiótico sobre el crecimiento micelial del patógeno mostró que *Trichoderma* tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios tales como micotoxinas, pigmentos, antibióticos que pudieron influir en la inhibición para el desarrollo de *P. cinnamomi*. Además de que nos indica que *Trichoderma* tienen una mayor actividad antagonica por lo que se ve reducida la colonia del patógeno y conforme transcurren los días, este queda totalmente parasitado, ya que dentro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* ocurre el fenómeno de antagonismo por antibiosis.

En cuanto a la inhibición ocasionada por el género *Trichoderma*, Dennis y Webster (1971), fueron los primeros en describir el antagonismo en términos de producción de antibiosis capaces de inhibir el crecimiento micelial de otras especies de hongos sobre patógenos de plantas; esto significa que hay producción de metabolitos difusibles al medio de cultivo y que poseen la capacidad de producir compuestos que ejercen un control con determinados patógenos. Por su parte Bruce (2000), reporta que las especies de *Trichoderma* poseen potencial antagónico, debido a la producción de compuestos orgánicos volátiles y no

volátiles, que inducen efectos fungicidas contra diversos organismos. Así mismo lo reporta Mukhejeer *et al.*, (2013) que muchas especies de *Trichoderma* producen metabolitos secundario los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico directamente. Por su parte Taylor (1986), menciona que *T. virens* produce antibióticos como glioviridin y gliotoxina que inhiben el crecimiento de *P. parasitica* en pruebas de celofán. Estudios realizados por Infante *et al.*, (2009) reportan la presencia de metabolitos con actividad anti fúngica con cuatros aislamientos de *Trichoderma* frente a *P.nicotianae* y *R. solani* en medios de cultivos.

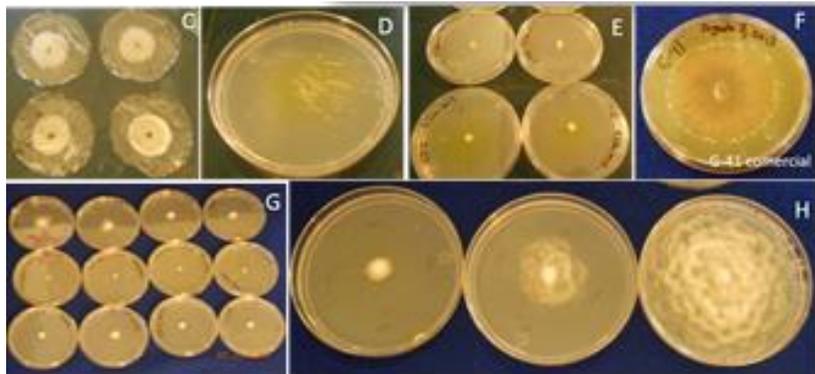


Figura 1. Prueba de celofán con *Trichoderma nativa*, *Trichoderma* comercial y *P. cinnamomi* creciendo en medio de cultivo PDA donde antes creció el *Trichoderma* con 8 días de incubación.

En cuanto a la esporulación, se pudo observar que el aislamientos de *Trichoderma viride* nativa presento abundante esporulación entre el tercero y cuarto día, toda la superficie de la caja estaba llena de abundantes conidios, lo que pone de manifiesto la agresividad del hongo antagonista sobre *P. cinnamomi*. Por otra parte el aislamiento de *Trichoderma virens* (comercial) esporuló hasta el quinto día a diferencia de la nativa, lo que también manifiesto que el hongo antagonista puede ejercer un control en el patógeno al no permitirle que se

siguiera desarrollando. Se ha documentado que una alta capacidad de esporulación es de gran importancia en el potencial de los hongos por su parte Ezziyyani *et al.*, (2007) señala que diferentes aislados de *Trichoderma* retardaron el crecimiento de *P. capsici* al tener una buena esporulación sobre el patógeno en pruebas de laboratorio. La colonización rápida, es una capacidad de competencia por nutrientes, ya que su naturaleza agresivamente competitiva de cada especie de *Trichoderma* es un buen indicador para que se establezca la colonización más rápido entre otros organismos (Kubicek & Harman, 1998).

Ensayos de *Trichodermas* spp. en invernadero

Las plantas de *Pseudotsuga mensiezii* inoculadas sólo con *P. cinnamomi* ocasionaron los primeros síntomas de la enfermedad, a los 98 ddi, entre los síntomas destacaron: clorosis y muerte de ramas. A los 6 meses ddi se presentan los síntomas típicos de la enfermedad en una de las cinco plantas, como son la clorosis, defoliación, muerte de ramas y pudrición de raíz, y pasando el séptimo mes ddi mueren tres plantas. La última planta de *Pseudotsuga mensiezii* tardo en morir 10 meses ddi los síntomas fueron similares a los ya mencionados. En todas las macetas donde se inoculo al patógeno se re aisló nuevamente a *P. cinnamomi* siguiendo los postulados de Koch. En este estudio se relacionó la sintomatología causada por *P. cinnamomi*, la cual coincide con lo reportado por Erwin y Ribeiro en plantas de Aguacate (1996). Por otra parte, Jordan y Tainter (1996) observaron que al inocular plantas de robles blancos y rojos, estas especies son muy susceptibles a *P. cinnamomi* y que los síntomas pueden tardar meses a años para ser evidentes.

El tratamiento preventivo. Se observó que al hacer dos aplicaciones primero de *Trichoderma* spp. y un mes después se inoculó a *P. cinnamomi*, las plantas comenzaron a manifestar síntomas a los cinco meses ddi se observó un ligero decaimiento de las acículas

por lo que se pudo observar que el hongo antagonista tiene una influencia en la acción del patógeno en el material tratado antes con *T. viride* nativa y *T. virens* comercial G-4 frente a *P. cinnamomi*, las cuales consiguen detener la acción del fitopatógeno. Se detiene la muerte de plantas debido a que el antagonista logra actuar eficientemente, neutralizando a partir de toxinas la acción del patógeno y por ello las plantas con los síntomas iniciales de la enfermedad mostraron recuperación aparente.

Como preventivo *Trichoderma viride* nativo tienen un efecto positivo ante el patógeno, ya que ninguna planta murió aun que si se presentaron algunos síntomas de la enfermedad. Además este es reflejado en altura de las plantas (**Cuadro 1**). Para *Trichoderma virens* comercial además de la reducción del progreso de la enfermedad en plantas hubo un mayor diámetro de tallo en plantas con el tratamiento preventivo (**Cuadro 2**). Los datos obtenidos en el ensayo de altura y diámetro de las plantas fueron analizados con un modelo lineal generalizado con prueba de medias Tukey con un nivel significancia α 0.05. Se observaron diferencias significativas entre las distintas medias, por lo que se distinguieron grupos estadísticamente diferentes. No obstante, se observa reducción de la parte aérea en el tratamiento con *P. cinnamomi*. El máximo diámetro medio correspondió al tratamiento TC+PC, mientras que el valor mínimo fue obtenido para *P. cinnamomi* = PC. Se puede observar que se mantuvo una tendencia de una pérdida de crecimiento y diámetro del tratamiento de *P. cinnamomi*.

Cuadro 1. Efecto de la variable altura en tratamiento preventivo del *Trichoderma viride* contra *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.

Tratamiento	Hongo	Medias de altura	Grupos
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	62.34	A
TN + PC	<i>P. cinnamomi</i>	60.911	A
TC+ PC	<i>P. cinnamomi</i>	56.00	B
PC+ TN	<i>P. cinnamomi</i>	53.26	B
PC+ TC	<i>P. cinnamomi</i>	51.61	B
PC	<i>P. cinnamomi</i>	49.24	C

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

*TN+PC = *Trichoderma* nativo + *Phytophthora cinnamomi*, TC+PC= *Trichoderma comercial* + *Phytophthora cinnamomi*, PC+TN = *Phytophthora cinnamomi* + *Trichoderma* nativo, PC+TC= *Phytophthora cinnamomi* +*Trichoderma comercial* y PC= *Phytophthora cinnamomi*.

Cuadro 2. Efecto de la variable diámetro de tallo en tratamiento preventivo de *Trichoderma virens* contra *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*.

Tratamiento	Hongo	Medias de diámetro	Grupos
TESTIGO	<i>P. cinnamomi</i>	1.87	B
TN + PC	<i>P. cinnamomi</i>	1.83	B
TC+ PC	<i>P. cinnamomi</i>	2.06	A
PC+ TN	<i>P. cinnamomi</i>	1.72	B
PC+ TC	<i>P. cinnamomi</i>	1.75	C
PC	<i>P. cinnamomi</i>	1.70	B

Letras iguales indican igual significancia y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

*TN+PC = *Trichoderma* nativo + *Phytophthora cinnamomi*, TC+PC= *Trichoderma comercial* + *Phytophthora cinnamomi*, PC+TN = *Phytophthora cinnamomi* + *Trichoderma* nativo, PC+TC= *Phytophthora cinnamomi* +*Trichoderma comercial* y PC= *Phytophthora cinnamomi*.

En el tratamiento 2. Curativo. Por otra parte donde se aplicó primero al patógeno *P. cinnamomi* y posteriormente a *Trichoderma* se observó que a los 100 ddi las plantas comenzaron a presentar los primeros síntomas de la enfermedad como son la clorosis, las acículas eran frágiles. El mayor número de plantas enfermas se presentó entre el cuarto, quinto mes ddi para el séptimo mes ocho de las diez plantas estaban totalmente muertas de igual manera las raíces se tornaron frágiles y necrosadas y solo dos plantas sobrevivieron. Los síntomas anteriormente descritos coincidieron con los reportados por Cibrián *et al.*.,(2007) para el caso de árboles de *Pinus* spp. infectadas por especies de *Phytophthora*.

En general *Trichoderma* nativa y *Trichoderma* comercial G-41 al ser aplicados como preventivos tienen un efecto positivo ante el patógeno, ya que se presentaron los mejores resultados en la reducción del progreso de la enfermedad y mejorando la altura y diámetro de tallo *Pseudotsuga mensienzii* al ser evaluadas durante un año nueve meses.

En todos los tratamientos donde se realizó la inoculación con *P. cinnamomi* y *Trichodermas* spp., se logró re aislar colonias de estos microorganismos. Por su parte Mohiddin *et al.* (2010), indican que las especies de *Trichoderma* durante interacciones con plantas exhiben entre otras características: aumento de raíz, disparan su crecimiento y contribuyen a la resistencia o tolerancia de enfermedades en condiciones de invernadero. Por su parte Jabnoun - Khiareddine *et al.*, (2009) menciona que el cultivo de tomate inoculado con *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride* disminuyeron la incidencia provocada por *Verticillium* spp. incrementando el 50% del peso fresco de la raíz y peso de tallo.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Trichoderma viride* nativa y *Trichoderma virens* G-41 comercial mostraron potencial de inhibición como antagonista a *P. cinnamomi* esto *in vitro* e invernadero disminuyó la enfermedad además de incremento la altura y diámetro de tallo *Pseudotsuga mensienzii*, al ser utilizados como preventivos, sobre *P. cinnamomi* y al ser evaluadas durante un año nueve meses. Sin embargo, aunque cada una de las especies tienen un resultado favorable, en general el aislamiento de *Trichoderma viride* nativo es otra alternativa para el biocontrol de *P. cinnamomi* en árboles de *Pseudotsuga* donde está adaptado a las condiciones del ecosistema y donde ha convivido con el patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento y aceptación para realizar mis estudios de postgrado

LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 1989. Fitopatología. Tercera reimpresión. Versión española. Guzmán O.,M (Traductor), Ed. Limusa. México D.F. 756 p.
- Alvarado-Rosales, D., L. de L. Saavedra, Romero, A. Almaraz-Sánchez., B. Tlapal-Bolaños, O Trejo-Ramírez., M. J., Davidson, J.T. Kliejunas, S. W. Oak, O'Brien. G. J., F Orozco-Torres y Quiroz-Reygadas. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. Polibotánica 23: 1-21.
- Alvarado-Rosales-D., L. de L Saavedra y A. Almaraz-Sánchez. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino *Quercus* spp., en Tecoaapa,Guerrero, México. Agrociencia 42: 565-572.
- Barnett, H.I. and Binder, F. L. 1973. The fungal hosts parasite relationship. Annu. Rev. Phytopathology Society. 11: 273-292
- Barnett, L.H., y Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Benitez, T. Rincón, M. A., M. Carmen, L., Codón, C. A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249-260.
- Brasier, C. M., Robredo, F., Ferraz, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant. Pathol. 42, 140–145.
- Bruce, A., Wheatley, R.E., Humphris, S.N., Huckett, C.A and Florence M.E.J.2000. Production on volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effects on selected wood decay fungi. Holzforschung 54: 41-486
- Chet, I., Harman, G.E. and Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbiology Ecologica 7:29-38
- Cibrián, T. D., Alvarado, R.D., y García, E. S. 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo: CONAFOR-SEMARNAT. México: Forest Service USDA. EUA: NRCAN Forest Service. Canadá y Comisión Forestal de América de Norte. COFAN. FAO. Chapingo. México. 587 p.

- Davidson, J.M., O'Brien, J.G., S. Oak, and J. Kliejunas. 2003. Report on a site visit to México-Muerte del Encino. USDA Forest Service. 9 p.
- Dennis, C., y Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological Society 57: 25-39 p.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat Rev Microbiol. 9(10):749–759.
- Erwin, D. C and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. USA. 562
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea Gilabert C & Candela ME, 2007. Biological Control of *Phytophthora* rootrot of pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination Journal of Phytopathology 155: 342-349
- García, D.S.E. 2007. Pudriciones de raíz por *Phytophthora*/Rootrot by *Phytophthora*. En: Cibrián T.D., Alvarado, R.D. y García. D.S.E (Eds). 2007 Enfermedades forestales en México/ Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo y CONAFOR. 587
- Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced *Trichoderma* spp. Soil biology biochemistry 11(23):10111-1020
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Change in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84:377-393
- Harman, G.E., Howell, C.R. Viterbo, A Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. Nature Review 2:43-56
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases in the history and evolution of ocurrent concepts. Plant Dis; 87(1): 4-10
- Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal 24: 14-21.
- Jordan, A.P. and Tainter, F.H. 1996. The susceptibility of Southern Appalachin Oaks to *Phytophthora cinnamomi*. Department of Forest Resources, Cleson University, USA. Castanea 61(4): 348-355.

- Jabnoun – Khiareddine, H., M.Daami-Remadi, F.Ayed and M.El Mahjoub.2009. Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous Trichoderma spp. Journal of plant science and biotechnology 3: 26 26-36.
- Kong, P., Hong, C.X. and Richardson, P.A.2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. Plant Pathology 52, 681-693.
- Kubicek , P.C and Harman, G.H. 1998. *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 1 Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis. 278 p.
- Malajczuk. 1979. Biological supresión of Phytophthora cinnamomi in eucalyptus and avocado in Australia. In: Schippers B. & Gams W. (Eds). Soil plant Pathogens. Academic. Press. 635-652 p.
- Michel- Aceves, A.C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euascomicetos: Hyprocreales),su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F.oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima Tecomán Colima, México. 162 p.
- Mukherjee, B., A. Horwitz,A. Herrera-Estrada, M. Schmoll, C. Prasun and K.M. Kenerley. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. Annu. Rev. Phytopathol. 51:105-29
- Mohiddin, F. A.; Khan, M. R.; Khan, S. M. y Bhat, B. H. (2010). Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? *Plant Pathology Journal* 9: 92-102.
- Papavizas, G.C.1985.*Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and potencial for biocontrol Annu. Rev. Phytopathology. 23:23-54.
- Papavizas, G.C. 1981.Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. Phytopathology 71:121-125.
- Pérez, R.M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. The European J. Plant Sci Biotechnol 2(1):1-24.
- SAS Intitute. 2012. GLM Procedure. SAS Institute. Cary, NC, USA
- Stefanova, N. M. 2007. Introducción y eficacia del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. *Fitosanidad* 11(3):75-79.

- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C & Candela ME, 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824
- Steiner, G. W. y Watson, R.D. 1965. Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology*. 55: 728-730
- Tamayo, P.J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4:52-71.
- Tainter, F.H., O'Brien, J.G., Hernández, A., and F. Orozco. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Dis.* 84(4):394-398.
- Taylor, A. 1986. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Protection Nova Scotia Inst Science* 36:27-58
- Téliz, O.D. y Mora, A.A. 2007. El aguacate y su Manejo integrado 2nd edición. Mundi-Prensa, México. 287-306.
- Watanabe, S., K. Kumakura, H. Kato, H. Iyozumi, M. Togawa and K. Nagayama. 2005. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1 *Journal General Plant Pathology* 71 351-356
- Wilson, M. and Backman, P.A. 1998. Biological control of plant pathogens: IN: J.R. Rubozan (ed). *Handbook of pest management*. Marcel Dekker. New York. USA 309-355 p
- Zentmyer, A.G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph. 10 APS. Press. St. Paul, MN. USA. 96 pp.