



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
**POSTGRADO EN FITOSANIDAD**  
**FITOPATOLOGÍA**

## **ETIOLOGÍA Y MANEJO DE *Phytophthora* *cinnamomi* (Rands) EN AGUACATE EN MICHOACÁN**

**DAGOBERTO FIERRO CORRALES**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis titulada: **Etiología y Manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán** realizada por el alumno: **Dagoberto Fierro Corrales** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO**



---

DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ

**ASESOR**



---

DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA

**ASESOR**



---

DR. JESÚS SORIA RUIZ

**ASESOR**



---

MC. HUGO BELTRÁN PEÑA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2011

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por su amistad, apoyo e invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. José Antonio Mora por su apoyo, orientación e innumerables muestras de sencillez y amistad.

Al Dr. Jesús Soria Ruiz por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al MC. Hugo Beltrán Peña por la amistad de años y su valioso apoyo en la fase de campo y sus acertados consejos.

A la Dra. María Antonia Pérez Olvera por ser una gran amiga y por sus acertados consejos y contribuciones al desarrollo y escrito de esta tesis.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel y Verito por su gran amistad y por todo el apoyo brindado para la realización de mis estudios de postgrado.

Al Dr. Eduardo Molina por todos los consejos y el apoyo brindado en la fase de laboratorio. Lalito, gracias por ser un gran amigo.

A la Ing. Alba P. Suaste por brindarme su amistad y por todo el apoyo en la fase de laboratorio en biología molecular.

A la Ing. Cristina Pineda por su amistad y apoyo en la fase de campo.

Al MC. Francisco Marroquín por los recorridos de campo en huertas de aguacate de Michoacán, por los consejos y sugerencias que contribuyeron a la realización de esta tesis.

Al Dr. Salvador Ochoa Ascencio y Dra. Blanca Lara por su amistad y su valioso apoyo en la fase de laboratorio y campo.

Al personal de la huerta “El Salto 2”, especialmente al Sr. Jesús Legorreta por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo

A Elvia Rosas con cariño, por sus consejos, su invaluable ayuda y facilidades brindadas en la fase de laboratorio.

A mis hijos: Jorge L. Flores y Antonio García, por su amistad y apoyo. Gracias por compartir los buenos y malos momentos en estos dos años.

A todos mis amigos y compañeros: en especial a Carlos Patricio Saucedo, Juan M. Tovar, Misael Martínez, Viviana Aldama, José Ramón Saucedo, Santiago Domínguez, Fabiola Esquivel, Lupita Hernández, Nadia Landeros y Paquito, Anselmo Cabrera, Silvia Berrocal, Luis A. Aguilar (El Ferras), Daniel López, Gildardo Olgún (Johnny Bravo), Luis Alberto Gómez, Aarón Chávez y Miguel Lucero (+).

Un especial agradecimiento a los doctores que hicieron posible mi formación en fitopatología: Carlos de León, Cristian Nava, Guadalupe Valdovinos, Juan Cibrián, Daniel Téliz, Antonio Mora, Remigio Guzmán, Daniel Nieto, Daniel Ochoa y Graciela Bueno.

## **DEDICATORIA**

**A mi esposa: Aleyda Arenas  
Por la espera y apoyo incondicional**

**A mis padres: José María y Guadalupe**

**A mis hermanos: José Hualberto, Nereyda Guadalupe, Selene, Dalia Patricia y José María**

**A mi Tío: Rosario Saucedá Salvatierra**

**A mis compañeros de la ESAVF; Especialmente al MC. Cesar A. Palacios Mondaca, Dr.  
José A. Quintero Benítez y Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez**

**Al Honorable Cuerpo de Socorristas de Cruz Roja Mexicana Base Ruiz Cortines; en  
especial a Rafael y Minélida Ochoa Félix**

## ETIOLOGÍA Y MANEJO DE *Phytophthora cinnamomi* (Rands) EN AGUACATE EN MICHOACÁN

Dagoberto Fierro Corrales, MC

Colegio de Postgraduados, 2011

El estado de Michoacán es el principal productor y exportador de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill) en México y en el mundo y uno de sus principales problemas fitosanitarios es “la tristeza del aguacatero”, causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. La tristeza del aguacatero se intentó reducir con un manejo integrado parcial del aguacate (MIA) aplicado durante ocho meses y consistente en dos aplicaciones al suelo de vermicompost, seis de ácido fosfórico y cuatro de *Trichoderma harzianum* en un huerto del municipio de Uruapan, Mich. El % de raíces infectadas por *P. cinnamomi* al inicio del experimento (37.9%) bajó a 6.6% en el MIA, en el testigo subió de 26.9% al inicio a 30.2% al final. El crecimiento medio de brotes vegetativos fue de 8.4 cm en el MIA y 6.22 en el testigo. La media de frutos amarrados fue de 17 en el MIA y de 7 en el testigo. No hubo diferencias significativas en número de inflorescencias ni en la recuperación de árboles con MIA. La severidad visual se incrementó en los 18 árboles experimentales. Para verificar la presencia de *P. cinnamomi* en las raíces de cinco árboles de aguacate con síntomas de la enfermedad, se aisló y purificó micelio a partir de sus raíces alimenticias. Posteriormente el patógeno se identificó morfológicamente como *Phytophthora cinnamomi* Rands con claves taxonómicas. La detección molecular se logró con la amplificación de la región espaciadora transcrita (ITS2) del DNA ribosomal de *P. cinnamomi* usando los iniciadores ITS3/ITS4, obteniendo un producto de amplificación de 570 pb. Las secuencias de los productos amplificados presentaron un 99% de similitud con *P. cinnamomi* comparadas en la base de datos del GenBank del NCBI.

**Palabras clave:** *Trichoderma harzianum*, evaluación de severidad, Manejo Integrado de Plagas y de Cultivos, pudrición radical, tristeza del aguacate.

# ETIOLOGY AND MANAGEMENT OF *Phytophthora cinnamomi* (Rands) ON AVOCADO IN MICHOACÁN

Dagoberto Fierro Corrales, MC

Colegio de Postgraduados, 2011

The Mexican state of Michoacán is the main producer and exporter of avocado cv. Hass (*Persea americana* Mill) in Mexico and the world. One of the main disease affecting this crop is “avocado tristeza”, caused by the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands. The effects of “avocado tristeza” were tried to be reduced by a partial avocado integrated management (AIM) which was carried out during eight months and consisted of two applications of vermicompost, six of phosphoric acid and four of *Trichoderma harzianum* in an avocado orchard located in Uruapan, Michoacan. The percentage of infected roots by *P. cinnamomi* at the beginning of the experiment (37.9 %) lowered to 6.6 % in the AIM, in the control it raised from 26.9 % at the beginning to 30.2 % at the end. The medium growth of shoots was of 8.4 cm in the AIM and 6.22 cm in the control. The medium of fruit setting went from 17 in AIM to 7 in the control. There were no significant differences in the number of inflorescence or the recuperation of trees under AIM. The visual severity incremented in the 18 experimental trees. To prove the presence of *P. cinnamomi* in the roots of five avocado trees expressing symptoms of this disease, there was mycelium isolated and purified from the roots collected from these trees. Prior to isolation, the pathogen was identified morphologically as *Phytophthora cinnamomi* Rands using taxonomic keys. The molecular detection was performed by the amplification of the internal transcribed section (ITS2) of the rDNA of *P. cinnamomi* using the ITS3/ITS4 primers, obtaining an amplification product of 570 pb, similar to those reported for this pathogen. The sequence of the amplified products presented a similarity of 99% with *P. cinnamomi*, compared with the data base of the GenBank of NCBI.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, severity evaluation, Integrated Pest Management, root rot, avocado tristeza.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA.....	v
ETIOLOGÍA Y MANEJO DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Rands) EN AGUACATE EN MICHOACÁN.....	vi
ETIOLOGY AND MANAGEMENT OF <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Rands) ON AVOCADO IN MICHOACÁN.....	vii
CAPÍTULO 1. MANEJO INTEGRADO DE LA TRISTEZA DEL AGUACATE [ <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Rands) ] EN URUAPAN, MICHOACÁN, MÉXICO.....	1
RESUMEN .....	1
CHAPTER 1. INTEGRATED MANAGEMENT OF AVOCADO TRISTEZA [ <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Rands) ] IN URUAPAN, MICHOACAN, MEXICO .....	2
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
Muestreo de raíces .....	6
Aislamiento de hongos .....	7
Identificación de oomicetos.....	7
Identificación morfológica .....	7
Identificación molecular .....	8
Amplificación por PCR de la región ITS .....	8
Secuenciación de la región ITS .....	9
Severidad de la enfermedad en raíces .....	9
Medición de brotes y conteo de inflorescencias y frutos .....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
Características físicas y químicas del suelo en los dos tratamientos.....	11
Identificación molecular de <i>P. cinnamomi</i> .....	13
Severidad inicial y final de la tristeza del aguacate .....	14
Medición de longitud de brotes, conteo de inflorescencias y de frutos.....	14
LITERATURA CITADA.....	15
ANEXOS.....	20



CAPÍTULO 2. DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Rands) EN EL CULTIVO DE AGUACATE .....	26
RESUMEN .....	26
CHAPTER 2. MOLECULAR DETECTION OF <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Rands) IN AVOCADO .....	27
ABSTRACT .....	27
INTRODUCCIÓN .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Material vegetal .....	30
Condiciones de aislamiento .....	30
Extracción de DNA .....	31
Amplificación por PCR de la región ITS .....	31
Secuenciación de la región ITS .....	32
Extracción de DNA .....	33
Detección de <i>P. cinnamomi</i> por PCR .....	33
Secuenciación de la región ITS .....	34
LITERATURA CITADA .....	36
ANEXOS .....	39
CONCLUSIONES GENERALES .....	42

## CAPÍTULO 1

### LISTA DE CUADROS

		Pág.
<b>Cuadro 1</b>	Prácticas de manejo aplicado a nueve árboles de aguacate con Manejo Integral Parcial del aguacate (MIA) y a nueve árboles testigo (SMIA) en Uruapan, Michoacán.	20
<b>Cuadro 2</b>	Características químicas del suelo en árboles de aguacate con y sin Manejo Integral Parcial (MIA y SMIA) al inicio del experimento en Uruapan, Michoacán. Octubre de 2010.	20
<b>Cuadro 3</b>	Contenido nutrimental en árboles de aguacate al inicio (Octubre de 2010) y al final (junio de 2011) de la aplicación del Manejo Integral Parcial del Aguacate en Uruapan, Michoacán.	21
<b>Cuadro 4</b>	Coefficientes de correlación de Pearson con 0.05 de significancia en muestras de suelo al inicio (Octubre de 2010) y al final (Junio de 2011) del MIA. Uruapan, Michoacán.	22
<b>Cuadro 5</b>	Comparación de medias de las variables longitud de brotes, número de inflorescencias, amarre de frutos e incidencia de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en las raíces de árboles de aguacate al final del MIA (Tukey, 0.05). Uruapan, Michoacán. 2011.	23

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Trozos de raíces de aguacate sembrados en Cajas Petri con el medio selectivo PARPH.	23
<b>Figura 2</b>	Estructuras morfológicas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands. A) Micelio cenocítico toruloso. B) Clamidospora esférica. C) Colonia cameloide. D) Esporangio ovoide sin papila.	24
<b>Figura 3</b>	Lectura de pH inicial y final por tratamiento. Manejo Integral Parcial del aguacate (MIA) y testigo (SMIA). Uruapan, Michoacán. 2011.	24
<b>Figura 4</b>	Contenido final de N y Materia orgánica (M.O) en árboles con MIA (Manejo Integral Parcial del Aguacate) y testigo (SMIA). Uruapan, Michoacán. 2011.	25

## CAPÍTULO 2

### LISTA DE CUADROS

		Pág.
<b>Cuadro 1</b>	Secuencia de los iniciadores empleados para la amplificación de la región ITS.	39

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Electroforesis del aislamiento del DNA de cinco muestras de micelio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . El DNA fue separado en agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Líneas: M) marcador fago $\lambda$ en concentración 100 ng/ $\mu$ L; 1) Muestra R5; 2) Muestra R14; 3) Muestra R16; 4) Muestra R18; 5) Muestra R23.	39
<b>Figura 2</b>	Productos de amplificación de la PCR con los iniciadores ITS3/ITS4. Líneas: M) Marcador molecular 100 pb; 1) Muestra de raíces de aguacate R5; 2) R14; 3) R16; 4) R18; 5) R23.	40
<b>Figura 3</b>	Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen ITS DNAr de las amplificaciones de <i>P. cinnamomi</i> para las cinco muestras de aguacate en comparación de alineamiento con diferentes aislados de <i>P. cinnamomi</i> de la base de datos del GenBank. La secuencia de <i>Fusarium oxysporum</i> se utilizó como grupo externo. El árbol está dibujado a escala con la longitud de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas para inferir el árbol filogenético.	41

## MANEJO INTEGRADO DE LA TRISTEZA DEL AGUACATERO [*Phytophthora cinnamomi* (Rands)] EN URUAPAN, MICHOACÁN, MÉXICO

Dagoberto Fierro Corrales<sup>1</sup>, Daniel Téliz Ortiz<sup>2\*</sup>, José Antonio Mora Aguilera<sup>2</sup>, Hugo Beltrán Peña<sup>1</sup>, Ma. Antonia Pérez Olvera<sup>3</sup>, Jesús Soria Ruiz<sup>4</sup>, Blanca Nieves Lara Chavez<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa; <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad y <sup>3</sup>Desarrollo Rural, Colegio de Postgraduados; <sup>4</sup>Campo Experimental Valle de Toluca, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); <sup>5</sup>Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez', Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

### RESUMEN

La tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) del aguacatero se intentó reducir con un manejo integrado parcial del aguacate (MIA) aplicado durante ocho meses y consistente en dos aplicaciones al suelo de vermicompost, seis de ácido fosfórico y cuatro de *Trichoderma harzianum* en un huerto del municipio de Uruapan, Mich. El % de raíces infectadas por *P. cinnamomi* al inicio del experimento (37.9%) bajó a 6.6% en el MIA, en el testigo subió de 26.9% al inicio a 30.2% al final. El crecimiento medio de brotes vegetativos fue de 8.4 cm en el MIA y 6.22 en el testigo. La media de frutos amarrados fue de 17 en el MIA y de 7 en el testigo. No hubo diferencias significativas en número de inflorescencias ni en la recuperación de árboles con MIA. La severidad visual se incrementó en los 20 árboles experimentales. *P. cinnamomi* se identificó morfológica y molecularmente. La recuperación de árboles con MIA estuvo limitada por el manejo deficiente en riego, nivelación de suelos y posición de los árboles experimentales, cuya modificación no fue apoyada por el agricultor cooperante. El efecto del MIA requiere, además, de un periodo de evaluación más largo. En otro huerto ubicado en Salvador Escalante, Michoacán, los árboles de aguacate se plantaron en surcos de 1.5 – 1.8 m de altura y el riego por microaspersión se aplica según necesidades medidas técnicamente. *P. cinnamomi* está presente en las raíces de estos árboles, sin embargo se han mantenido sanos y con alta productividad durante cinco años.

**Palabras clave:** *Trichoderma harzianum*, evaluación de severidad, Manejo Integrado de Plagas y de Cultivos.

**INTEGRATED MANAGEMENT OF AVOCADO TRISTEZA [*Phytophthora cinnamomi*  
(Rands)] IN URUAPAN, MICHOACAN, MEXICO**

**Dagoberto Fierro Corrales<sup>1</sup>, Daniel Téliz Ortiz<sup>2\*</sup>, José Antonio Mora Aguilera<sup>2</sup>, Hugo Beltrán Peña<sup>1</sup>, Ma. Antonia Pérez Olvera<sup>3</sup>, Jesús Soria Ruiz<sup>4</sup>, Blanca Nieves Lara Chavez<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa; <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad y <sup>3</sup>Desarrollo Rural, Colegio de Postgraduados; <sup>4</sup>Campo Experimental Valle de Toluca, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); <sup>5</sup>Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez', Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

**ABSTRACT**

The aim of this study was to reduce the avocado tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) by a partial avocado integrated management (AIM), applied during eight months which consisted of two applications of vermicompost, six of phosphoric acid and four of *Trichoderma harzanium*, all of which were applied to soil in an avocado orchard located in Uruapan, Michoacan. The percentage of infected roots by *P. cinnamomi* at the beginning of the experiment (37.9 %) was reduced to 6.6 % by the AIM, in contrast to the control which incremented from 26.9 % at the beginning to 30.2 % at the end. The medium growth of shoots was of 8.4 cm in the AIM and 6.22 cm in the control. The medium of fruit setting was of 17 in the AIM and 7 in the control. There were no significant differences in the number of inflorescence or the recuperation of trees with AIM. The visual severity incremented in the 20 experimental trees. *P. cinnamomi* was identified by morphological and molecular characterization. The recovery of trees by AIM was limited by a deficient irrigation, soil leveling and position of the experimental trees, which it's modification was not supported by the orchard owner. The effects of the AIM require of a longer evaluation period. In another orchard located in Salvador Escalante, state of Michoacan, the avocado trees were planted in rows of 1.5 – 1.8 m of height and the irrigation was carried out by microspraying according to technically carried out measurements. Although *P. cinnamomi* is present in the roots of these trees, they appeared to be healthy and presented high productivity during five years.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, severity evaluation, Integrated Pest Management.

## INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial, en 2009 produjo 1'230,970 t., seguido por Chile, Estados Unidos, Indonesia, República Dominicana, Colombia, Perú, Brasil, China y Guatemala (FAOSTAT, 2011). Los principales estados productores de aguacate en México, son: Michoacán, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Guerrero y Puebla. En Michoacán, el volumen de la producción en 2010 fue de 951,000 t con un rendimiento medio de 9.2 t ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2011), el proceso productivo y las actividades derivadas del mismo generan más de 40 mil empleos permanentes y 60 mil empleos estacionales, lo cual equivale a 9 millones de jornales al año (Téliz y Marroquín, 2007). La exportación de su fruta genera importantes divisas para el país, por ejemplo en 2010 por la exportación de 266,378 t se generaron divisas por 53'412,000 dólares (APEAM, 2011; SAGARPA, 2011). La franja Aguacatera de Michoacán, ocupa 7,752 Km<sup>2</sup>, equivalente al 13% de la superficie estatal y se caracteriza por un clima templado, húmedo y sub-húmedo, con temperatura media de 8 a 21°C y una precipitación anual de 1,200 a 1,600 mm (APROAM, 2005; Téliz y Marroquín, 2007).

Las enfermedades fungosas (antracnosis, roña y tristeza) limitan la producción y calidad del fruto. La tristeza, originada por el oomyceto *Phytophthora cinnamomi* Rands), causa daños y pérdidas importantes (Téliz y Mora, 2007). En 1979 se estimaron 13 mil árboles dañados, en suelos pobres en materia orgánica; en 1994 se detectaron cerca de 100 mil árboles y en 1999 la severidad estimada subió a 550 mil árboles enfermos en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tingüindín, Los Reyes, Tancítaro, Peribán y Ziracuaretiro, con pérdidas estimadas en alrededor de 640 millones de pesos (Vidales, 1999). En el 2007 se estimó su presencia en todos los municipios productores en aproximadamente 5,500 ha, equivalentes al 5% de la superficie estatal cultivada (Mora *et al.*, 2007).

Las acciones para prevenir, manejar y controlar esta enfermedad han sido varias, entre las que destacan: poda de árboles enfermos, aplicación de materia orgánica al suelo (Larios *et al.*, 2007), uso de hongos antagónicos (Chet *et al.*, 1997; Yedidia *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2000 y Ahmed *et al.*, 2003), manejo adecuado de la fertilización y materia orgánica, y del riego y plagas (Téliz *et al.*, 1992; Téliz y Mora, 2007).

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue diseñar, aplicar y evaluar un programa de manejo integrado parcial del aguacate (MIA) para reducir la intensidad de *Phytophthora cinnamomi*, en un huerto de Uruapan, Michoacán. Paralelamente, el manejo de la enfermedad se comparó con un huerto en Salvador Escalante, Mich. Con surcos altos y alta densidad de árboles y en que se verificó la presencia de *P. cinnamomi* en raíces y suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en la huerta “El Salto 2”, ubicada a los 19°19'46.00''N y 102°05'40.00''O, a 1450 msnm, en la localidad de Matangarán, Mpio. de Uruapan. Esta huerta presenta un clima semicálido, subhúmedo, con lluvias en verano, las temperaturas medias máximas y mínimas son de 28 y 12°C, con una precipitación anual de 1450 mm (García, 1981). Los suelos son de tipo andosol, con una profundidad media de 1.5 m (INEGI, 1985).

El experimento consistió en dos tratamientos; uno con manejo integrado del aguacate (MIA) y el testigo sin manejo (SMIA) (Cuadro 1):

### 1. MIA:

- Poda de saneamiento y despunte de ramas al inicio del experimento.
- Aplicación de la cepa *Trichoderma harzianum* ( $1.92 \times 10^4$  conidios mL<sup>-1</sup>). Se diluyeron 250 mL de la cepa en 15 litros de agua y se asperjó con mochila aspersora manual en la zona de goteo cada dos meses (octubre 2010 a mayo 2011).
- Vermicompost (4 t ha<sup>-1</sup>). Se espolvorearon 25 kg por árbol en la zona de goteo en octubre de 2010 y enero de 2011.
- Fosfimax (5 L ha<sup>-1</sup>). Se diluyeron 32 mL de Fosfimax en 15 litros de agua y con mochila aspersora manual se inyectó al suelo en ocho puntos de la zona de goteo.

### 2. SMIA (testigo).

- Sólo poda de saneamiento y despunte de ramas al inicio del experimento.

Cada uno de los dos tratamientos se repitió en nueve árboles con síntomas de tristeza, en un diseño completamente al azar. Al inicio del experimento se eliminaron ramas muertas y se hicieron despuntes de ramas apicales para provocar un crecimiento lateral de ramas y un equilibrio entre el área foliar y el deficiente sistema radical. Muestras de suelo y de hojas se



analizaron al inicio y al final del experimento para determinar las propiedades físicas y químicas de los suelos y las propiedades nutrimentales de los árboles seleccionados. Se colectaron ocho submuestras de suelo en la zona de goteo a 0 – 20 cm de profundidad para formar una muestra compuesta por árbol, se escogió al azar en la parte media del dosel del árbol en cada punto cardinal una rama sin fructificar y se colectaron la tercera y cuarta hoja de cada rama para formar la muestra compuesta de hojas. Las variables evaluadas en suelo fueron: Textura, pH, M.O, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, Densidad aparente (Dap) y Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC). En las hojas se cuantificaron: N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B. El efecto de los tratamientos se relacionó con el porcentaje de raíces infectadas por *P. cinnamomi*, longitud de crecimiento de brotes vegetativos, formación de inflorescencias y amarre de frutos. Visualmente se evaluó la apariencia de los árboles enfermos de los dos tratamientos con una escala de severidad de la enfermedad del 0 al 5, donde 0 = árbol sano y 5 = árbol muerto. También se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson con 0.05 de significancia entre las variables originales en suelo y hoja.

### **Muestreo de raíces**

Se muestrearon raíces al inicio (octubre de 2010) y al final del experimento (junio de 2011), de árboles con síntomas de tristeza del aguacatero. La colecta se realizó a una profundidad de 0 – 20 cm en ocho puntos equidistantes de la zona de goteo de los árboles, cuatro puntos cercanos al tronco de los árboles a una distancia aproximada de 0.5 – 0.8 m y cuatro puntos en la periferia de la zona de goteo a una distancia aproximada de 1.5 – 2.0 m del tronco. Con pala recta se sacaron las muestras de suelo y se tamizaron por separado en una malla de 5 mm; las raíces separadas se colocaron en bolsas de polietileno previamente etiquetadas, obteniendo una muestra compuesta de 8 submuestras por árbol. A cada bolsa con raíces se le agregó aproximadamente 0.5 kg de

suelo húmedo y se transportaron al laboratorio de enfermedades de frutales del Colegio de Postgraduados.

### **Aislamiento de hongos**

Las raíces se lavaron con agua corriente y las puntas de raíces alimenticias se cortaron transversalmente en fragmentos de 5 mm de longitud, seleccionando los límites de tejido sano y tejido necrosado. En una cámara de flujo laminar los trozos de raíces se lavaron en hipoclorito de sodio al 1 % por un min. y se enjuagaron en tres pasos de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente estéril. Las raíces desinfectadas se sembraron en medio de cultivo selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, pcnb e himexazol) (Erwin y Ribeiro, 1996). Se sembraron 10 trozos de raíces en forma vertical en cajas Petri; cuatro cajas por muestra para un total de 40 raíces por árbol muestreado. Los aislamientos se incubaron a 28°C por tres días (Figura 1).

### **Identificación de oomycetos**

Los oomycetos que se aislaron con mayor frecuencia se identificaron morfológicamente según Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996 y molecularmente (Cenis, 1992). Se desarrollaron dos oomycetos, un *Pythium* sp. (10% de severidad) y *Phytophthora cinnamomi* (90% de severidad).

### **Identificación morfológica**

Los oomycetos que se aislaron con mayor frecuencia se identificaron como *Phytophthora cinnamomi* en base a la formación de hifas torulosas (Figura 2A) y con abundantes clamidosporas esféricas (Figura 2B). El crecimiento del micelio en PDA presentó un aspecto cameloide o de rosa (Figura 2C). Se observaron esporangios de forma ovoide a elipsoidal sin papila, con un ligero engrosamiento apical (Figura 2D) (Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996).

## **Identificación molecular**

El aislamiento de *P. cinnamomi* se hizo de fragmentos de raíces lavados, desinfectados y sembrados en papa-dextrosa-agar (PDA Bioxon<sup>®</sup>) adicionado con ampicilina (500 mg L<sup>-1</sup>), finalmente se incubaron a 25° C, en oscuridad total por 72 horas (Zentmyer 1980; Erwin y Ribeiro, 1996). El DNA genómico se aisló de micelio, a las 72 horas de su crecimiento en PDA a 25° C (Cenis, 1992). En un tubo Eppendorf de microcentrifuga de 2 mL se adicionaron 300 µl de buffer de extracción (Tris 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%) y 100 gr de micelio del oomiceto, colectado de la caja de cultivo con una espátula. El micelio se maceró con un pistilo cónico accionado con un motor manual inalámbrico marca Kontes modelo SF24837V a 200 rpm durante 3 min. Posteriormente se adicionaron al tubo 150 µL de acetato de sodio (3M, pH 5.2) y se incubó a -20° C por 10 min. Se centrifugó durante 5 min a 11,300 x g y se transfirió la capa superior acuosa a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, se adicionó un volumen igual de Isopropanol frío (4°C) con inversión gentil, y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. El DNA precipitado se sedimentó por centrifugación (11,300 x g por 5 min) desechando el sobrenadante y se lavó la pastilla en Etanol 70%, y nuevamente se centrifugó (11,300 x g por 5 min). La pastilla formada, se secó a temperatura ambiente durante 20 min, y se resuspendió en 50 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.0).

## **Amplificación por PCR de la región ITS**

La amplificación del gen 5.8S rDNA y la región conservada adyacente ITS2, se realizó con la pareja de iniciadores ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') y ITS4 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') (White *et al.*, 1990) en un volumen final de 25 µL de reacción de PCR. La misma contenía, 1x de amortiguador para PCR (10x, tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4) (Invitrogen), 0.2 mM de cada dNTPs, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Biogenica), 20 pmol de cada

iniciador (ITS3/ITS4), 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 20 ng del DNA objetivo. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Multigene y consistió en un primer paso de desnaturalización a 96°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C (temperatura de alineamiento) y 1.2 min a 72°C, y un paso final como extensión de 72°C por 10 min. El producto de amplificación (570 pb) se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 1% (p/v) teñidos previamente con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb (Invitrogen).

### **Secuenciación de la región ITS**

Los amplicones se purificaron y secuenciaron en MacroGen Corp (Rockville, MD, USA). Se les asignó clave para su identificación: R5, R14, R16, R18 y R23. Todas las secuencias se analizaron empleando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y posteriormente fueron comparadas en las bases de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y de Phytophthora database. El procedimiento molecular lo realizó la Dra. Blanca Nieves Lara Chávez en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Uruapan, Michoacán.

### **Severidad de la enfermedad en raíces**

El número de raíces con presencia de *P. cinnamomi* se dividió entre el número total de raíces sembradas por muestra de árbol (40 trozos) y se multiplicó por 100 (Figura 1).

### **Medición de brotes y conteo de inflorescencias y frutos**

Dos brotes vegetativos en la parte baja de los árboles, dos en la parte media y dos en la parte alta de la copa se midieron longitudinalmente cada mes, de noviembre de 2010 a junio de 2011. El conteo de inflorescencias y frutos se realizó en tres ramas, una en nivel bajo, medio y alto de los árboles MIA y testigos. Las medias se compararon por Tukey. Se hizo la prueba de Barlett

para homogeneidad de la varianza y los datos se transformaron (raíz<sup>2</sup>) para satisfacer el supuesto de homostacididad y de normalidad.

Paralelamente, el manejo de la enfermedad se comparó con un huerto en Salvador Escalante, Mich. con surcos altos (1.5-1.8m) y alta densidad de árboles (825/ha) y en el que se verificó la presencia de *P. cinnamomi* en raíces y suelo. Los surcos altos y la mayor porosidad consecuente mejoran el drenaje, además de que el fertiriego por microaspersión con bases técnicas favorecieron el desarrollo de los árboles a pesar de la presencia de *P. cinnamomi* en suelo y raíces.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características físicas y químicas del suelo en los dos tratamientos

Los suelos en los que se desarrolló el experimento presentaron texturas franco-arcillosas a arcillosas, con densidad aparente de  $1.1 \text{ t m}^{-3}$  y valores de capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 15.5 a 19.5  $\text{Cmol Kg}^{-1}$ ; pH ligeramente ácido (5.4 - 6.4). Estos valores coinciden con los reportados por Maldonado, *et al.*, (2007) para suelos de zonas aguateras de Michoacán y con los reportados por Wolstenholme (2007), como pH del suelo recomendado para el cultivo del aguacate (5.0 – 7.0). Son suelos muy ricos en materia orgánica (NOM-021-RECNAT-2000).

En general al inicio del experimento, el suelo presentó contenidos altos en la mayoría de los parámetros analizados (Cuadro 2). Los contenidos de nitrógeno se clasifican como muy alto en MIA y normales en SMIA. El Ca se encontró en niveles normales, Mn alto y Mg medio para MIA y SMIA. El P, K, Fe, Zn, Cu y B se clasificaron como muy altos en ambos tratamientos.

Al final del experimento el pH de los suelos presentó ligeras variaciones, no significativas (Figura 3) y favorables para el desarrollo de *P. cinnamomi* (Zentmyer, 1980). El ligero aumento del pH en el MIA puede deberse a la aplicación de vermicompost y cal (Durán y Henríquez, 2010). Aún con las aplicaciones de vermicompost el contenido de materia orgánica en el MIA bajó de muy rica a rica aunque más alto que el SMIA (Figura 4). El N se clasificó como bajo para los dos tratamientos al final del experimento (Maldonado, *et al.*, 2007). El N foliar en el MIA al inicio se clasificó como muy alto y en el SMIA normal, sin embargo al final se clasificó como bajo para ambos tratamientos a pesar de la aplicación de vermicompost en el MIA. Los niveles bajos de N foliar en el MIA probablemente se expliquen por un mayor crecimiento longitudinal de flujos vegetativos y un mayor número de frutos amarrados que el testigo (SMIA). El contenido de Ca en el MIA fue normal al final del experimento y bajo en el SMIA.

Al final del experimento, el K se clasificó como alto en el MIA y en el SMIA (al inicio muy alto). Salazar y Lazcano (1999) mencionaron que los excesos de K en el suelo pueden causar deficiencias de Ca o Mg en árboles de aguacate, lo cual coincide con los análisis foliares del experimento donde se observó que al inicio y al final del experimento el MIA y SMIA mostraron niveles bajos de Ca en las hojas. El P, Fe, Mn, Zn, Cu y B se clasificaron como muy altos al inicio y al final en MIA y SMIA.

El contenido foliar de Cu al inicio y al final fue alto en el MIA y alto al inicio y normal al final en el SMIA, según Embleton y Jons (1992) y Maldonado *et al.*, (2007). El P se encontró normal al inicio y bajo al final del experimento en el MIA, a pesar de la aplicación de fosfimax, posiblemente por la deficiencia del riego y del drenaje. El K, Mg, Fe y Mn mostraron concentraciones normales tanto en árboles MIA y testigos (SMIA). El Zn mostró contenidos normales al inicio y contenidos bajos al final del experimento en los dos tratamientos (MIA Y SMIA). El B se analizó solo al final del experimento y mostró contenidos bajos en los dos tratamientos (Cuadro 3). Según Maldonado *et al.*, (2007), las concentraciones altas de P están correlacionadas con las deficiencias de Ca en la plantas de aguacate, una fertilización alta en K favorece la deficiencia de B. Los resultados anteriores en los dos tratamientos se explican por los altos niveles de M.O. sin descomponer en el suelo, por los valores ácidos de pH y por la presencia de los iones aluminio activos que disminuyen la disponibilidad de calcio, zinc y boro (Aguilera y Salazar, 1998; y Maldonado, 2002).

Las correlaciones significativas de los parámetros analizados en suelo y hoja se presentan en el cuadro 4. El pH correlacionó positivamente con el Mg al inicio y al final del experimento, en ambos tratamientos. En el testigo (SMIA) el pH se correlacionó positivamente con MO, Ca, Mg, Zn y Cu, lo que significa que el pH es un factor limitante en la disponibilidad de muchos de los

nutrientes. La MO es otro factor determinante en la disponibilidad de nutrientes, producto de las tasas de mineralización (Pérez *et al.*, 2000), en el análisis la MO en SMIA, se correlacionó significativamente con P, Ca, Mg, Zn y Cu, además de la correlación con pH ya señalada. Otra correlación importante es la de los contenidos de Mg, Zn y Cu con el pH, MO, Ca y P, de donde se infiere que estas propiedades están directamente asociadas a la disponibilidad nutrimental de Mg, Zn y Cu en el suelo. Este proceso ha sido explicado por Aguilera y Salazar, (1998); y Maldonado, (2002), quienes mencionaron que los altos niveles de M.O. sin descomponer en el suelo, los pH ácidos y la presencia de iones aluminio activos disminuyen la disponibilidad de calcio y zinc. La aplicación de vermicompost influyó en la mayor disponibilidad de nutrientes y tuvo un efecto positivo en el aumento de longitud de brotes vegetativos y de amarre de frutos, sin embargo la materia orgánica se mantuvo en los mismos niveles (muy rica) al final del experimento. Otra correlación significativa encontrada es la de Ca con el Mg (0.81), la cual coincide con lo reportado por (Solís *et al.*, 1998) en análisis de hoja de aguacate.

### **Identificación molecular de *P. cinnamomi***

La identidad de las secuencias de los cinco aislados de raíces de aguacate fue de 100% para las primeras 10 secuencias homólogas de *Phytophthora cinnamomi* comparadas en el GenBank del NCBI, lo cual indicó que las secuencias analizadas en este estudio, coinciden totalmente con aislados de Florida (No. Accesoión: JF740089.1) y Brasil (No. Accesoión: HM041805.1), confirmando que se trata de la especie *P. cinnamomi*. Para mayor precisión, las cinco secuencias fueron sometidas en la base de datos de *Phytophthora* database (phytophthoradb, 2011), mostrando un porcentaje de similitud del 100% con 20 aislados de ese banco; entre estos se encuentran los aislados provenientes de E. U. A. (PD01208) y Australia (PD00777).



### **Severidad inicial y final de la tristeza del aguacatero**

La severidad inicial mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $Pr > F < 0.0001$ ); la severidad inicial fue mayor en los árboles con MIA, al final del experimento, la severidad aumentó significativamente en los árboles testigo (SMIA) y bajó en el MIA ( $Pr > F < 0.0001$ ) (Cuadro 5). Se deduce que los árboles con MIA respondieron favorablemente y redujeron su severidad.

### **Medición de longitud de brotes, conteo de inflorescencias y de frutos**

Se observó que el Manejo Integral Parcial del aguacate influyó significativamente en el mayor desarrollo de los brotes vegetativos de los árboles con MIA ( $Pr > F < 0.0001$ ). Las inflorescencias no mostraron diferencias entre los tratamientos ( $Pr > F < 0.8147$ ). Hubo un número significativamente mayor de frutos en los árboles con MIA ( $Pr > F < 0.0014$ ) (Cuadro 5).

## LITERATURA CITADA

**Aguilera M J J, S Salazar García (1998)** Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio en el rendimiento y tamaño de fruto de aguacate. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. INIFAP, Campo Experimental Uruapan, Michoacán, México. Folleto Técnico Núm. 12.

**Ahmed S, C Pérez Sánchez, M E Candela (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.

**Aguilera Montañez J L, S Salazar García (1996).** Efecto del Nitrógeno, Fósforo y Potasio en el rendimiento y tamaño del fruto de aguacate. INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Uruapan. Michoacán México. 24 p. (Folleto Técnico Núm. 12).

**Ahmed S, M Ezziyyani, C Pérez Sánchez, M E Candela (2003)** Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology 109: 418-426.

**APEAM, Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán A. C. (2011)** Disponible en: <http://www.apeamac.com/>, consulta realizada en septiembre de 2011.

**APROAM, Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate de Uruapan, Michoacán (2005)** Disponible en: <http://www.aproam.com/>, consulta realizada en mayo2011.

**Cenis J L (1992)** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research 20.9: 2380.

**Chet I, J Ibar, I Hadar (1997)** Fungal antagonists and mycoparasites. *In: The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Wicklow D T, B Soderstrom (Eds.). New York. Springer Verlag. pp: 165-192.

**Duran U L, Henríquez H C (2010)** El vermicompost: Su efecto en algunas propiedades del suelo y la respuesta en plantas. *Agronomía Mesoamericana* 21(1):85-93.

**Embleton T W, W W Jones (1972)** Development of nitrogen fertilizer programs for California avocados. *California- Avocado Society Yearbook* 56: 90-96.

**Erwin D C, O K Ribeiro (1996)** *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press. St. Paul Minnesota. 562 p.

**FAOSTAT, Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistical Databases (2011)** Producción País por Producto. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consulta realizada en septiembre de 2011.

**García E (1981)** Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Adaptado Para las Condiciones de la República Mexicana. 3ª Ed. Offset., Lario Ed. S.A. 252 p.

**INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (1985)** Síntesis Geográfica del Estado de Michoacán y Anexo Cartográfico. México, D.F.

**Labanauskas C K, L H Stolyzy, G A Zentmyer (1975)** The effect of root infection by *Phytophthora cinnamomi* and soil oxygen concentrations on total amount of nutrients. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 59: 110 – 116.

**Larios Guzmán A, I Vidales Fernández, M Tapia Vargas, F J Villaseñor Ramírez (2007)** Producción orgánica y aguacate orgánico. *In: Téliz-Ortiz, D. y A. Mora-Aguilera (Cords). El Aguacate y su Manejo Integral Parcial*. Segunda Edición. Editorial Mundi-Prensa. México, D. F. pp 235 – 264.

**Maldonado T R (2002)** Diagnóstico Nutricional para la Producción de Aguacate. Fundación Produce Michoacán, A. C., Morelia, Michoacán, México. 74 p.

**Maldonado T R, M E Álvarez, G Almaguer, A F Barrientos, R García (2007)** Estándares Nutricionales para aguacatero “Hass”. Chapingo 13: 103-108.

**Mora Aguilera J A, D Téliz Ortiz, G Mora Aguilera, J D Etchevers Barra (2007)** Tristeza del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*). In: Téliz Ortiz D, J A Mora Aguilera (Cords). El Aguacate y su Manejo Integral Parcial. Segunda Edición. Editorial Mundi-Prensa. México, D. F. pp: 192 – 202.

**NOM-021-RECNAT-2000, Diario Oficial de la Federación (2002)**. Norma que Establece las Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos. Estudio, Muestreo y Análisis. pp: 97-175

**Pérez Olvera M A, J D Etchevers, H Navarro G, y R Núñez E (2000)** Aporte de los residuos del cultivo anterior al reservorio de nitrógeno en tepetates. Agrociencia 34:115–125.

**Phytophthora database (2011)** Disponible en: <http://www.phytophthoradb.org/> (Consulta realizada en agosto 2011)

**SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2011)** Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx> (Consulta realizada en septiembre 2011).

**Salazar García S. (2002)** Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias e Instituto de la Potasa y el Fósforo. Querétaro, México. 165 p.

**Salazar García S, I Lazcano Ferrat (1999)** Diagnóstico nutricional del aguacate bajo condiciones de temporal. Rev. Chapingo Serie Horticultura Número Especial 5:173-184.

- Solís F J J, A F Barrientos, C A Pérez, M Rubí, M T Martínez, J C Reyes (1998)** Aplicaciones foliares de nitrato de calcio, su efecto en el contenido nutrimental de hoja y mesocarpio en aguacatero (*Persea americana Mili.*) cv. Hass. Revista Chapingo Serie Horticultura 4:113-117.
- Stamps D J, G M Waterhouse, F J Newhook, G S Hall (1990)** Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. Mycological Papers 162: 28 p.
- Téliz Ortiz D, J A Mora Aguilera (2007)** El Manejo Integral Parcial del aguacate. *In: El Aguacate y su Manejo Integral Parcial. Segunda Edición.* Téliz O D, A M Aguilera (Cords). Editorial Mundi Prensa, México, D. F. pp: 287-306.
- Téliz Ortiz D, J A Mora Aguilera, C Velázquez, R García, G Mora, P Rodríguez, J Etchevers, S Salazar (1992)** Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. Proceedings of Second World Avocado Congress. California, USA. pp: 79 – 87.
- Téliz Ortiz D, J F Marroquín Pimentel (2007)** Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. *In: El Aguacate y su Manejo Integral Parcial. Segunda Edición.* Téliz O D, A Mora (Cords). Editorial Mundi-Prensa. México, D. F. pp: 3 – 28.
- Vidales F J A (1999)** Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi Rands*), del aguacate (*Persea americana Mill. cv Hass*) Revista Chapingo Serie Horticultura 5. 255-259.
- White T J, T Bruns, S Lee, J W Taylor (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis M A, D H Gelfand, J J Sninsky, T J White (Eds.). Academic Press, Inc., New York. pp: 315-322.

**Wolstenholme B N (2007)** Ecología: El Clima y el ambiente edáfico. *In:* El Palto. Botánica, Producción y Usos. Whinley A W, B Schaffer, B N Wolstenholme (Eds.) Ediciones Universitarias de Valparaiso. Chile. pp. 75-101.

**Yedidia I, N Benhamou, I Chet (1999)** Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.

**Zentmyer G A (1980)** *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes. *In:* Phytopatological Monograph. The American Phytopatology Society 10. 95 p.

**ANEXOS**

**Cuadro 1. Prácticas de manejo aplicado a nueve árboles de aguacate con Manejo Integral Parcial del aguacate (MIA) y a nueve árboles testigo (SMIA) en Uruapan, Michoacán.**

PRÁCTICAS DE MANEJO	TRAT	2010					2011					FREC.	
		A	S	O	N	D	E	F	M	A	M		J
Muestreo de suelo	MIA	X										X	2
	SMIA	X										X	2
Poda	MIA			X									1
	SMIA			X									1
Aplicación de vermicompost	MIA			X			X						2
	SMIA												0
Aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i>	MIA			X			X		X		X		4
	SMIA												0
Aplicación de Fosfimax	MIA			X	X		X	X		X			6
	SMIA												0
Encalado: 4 kg árbol <sup>-1</sup>	MIA										X		1
	SMIA										X		0

MIA = Manejo Integral Parcial del aguacate SMIA= Testigo

**Cuadro 2. Características químicas del suelo en árboles de aguacate con y sin Manejo Integral Parcial (MIA y SMIA) al inicio del experimento en Uruapan, Michoacán. Octubre de 2010.**

TRAT	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
	<-----%----->					<-----mg Kg <sup>-1</sup> ----->					
MIA	Ḳ	61.8	483.9	1636	2458	589.1	111.4	45.1	54.8	77.5	3.6
SMIA	Ḳ	29.1	481.0	1640	3675	764.3	69.7	29.2	45.4	30.8	3.5

Ḳ=Media; MIA=Manejo Integral Parcial del aguacate; SMIA= testigo

**Cuadro 3. Contenido nutrimental en árboles de aguacate al inicio (Octubre de 2010) y al final (junio de 2011) de la aplicación del Manejo Integral Parcial del Aguacate en Uruapan, Michoacán.**

TRATAMIENTO		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
		%							mg Kg <sup>-1</sup>		
MIA	INICIO	2.05	0.12	0.96	0.77	0.36	124.94	40.41	44.18	147.83	
	FINAL	0.91	0.06	0.82	0.55	0.37	70.66	60.86	17.97	129.29	21.82
SMIA	INICIO	1.79	0.12	0.93	0.62	0.33	125.29	22.93	48.66	108.61	
	FINAL	0.99	0.09	1.00	0.47	0.34	170.11	13.82	19.74	131.76	25.0

MIA = Manejo Integral Parcial del aguacate; SMIA = Testigo



**Cuadro 4. Coeficientes de correlación de Pearson con 0.05 de significancia en muestras de suelo al inicio (Octubre de 2010) y al final (Junio de 2011) del MIA. Uruapan, Michoacán.**

VARIABLE		MO	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
pH	MIA	I	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	
		F	-	-	-	0.7	-	-0.8	-	-	-	
	SMIA	I	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	
		F	0.9	-	-	0.8	0.7	-	-	0.8	0.7	-
MO	MIA	I	1	-	-	0.7	-	-	-	0.7	-	
		F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SMIA	I	1	-	-	-	-	-	-	0.7	-	
		F	1	0.7	-	0.9	0.7	-	-	0.8	0.7	-
P	MIA	I	-	1	-	-	-	0.7	-	-	0.7	
		F	-	1	-	0.7	-	-	-	0.8	-	-
	SMIA	I	-	1	-	-	0.8	-	-	0.7	0.8	-
		F	-	1	-0.7	0.8	0.7	0.8	-	0.7	-	-
Ca	MIA	I	-	-	-	1	0.8	-	-	-	-	
		F	-	-	-	1	0.9	-	-	-	-	
	SMIA	I	-	-	-	1	-	-	-0.7	-	-	
		F	-	-	-	1	0.7	-	-	0.8	0.8	-
Zn	MIA	I	-	-	-	-	-	-	1	0.9	-	
		F	-	-	-	-	-	-	-	1	0.7	-
	SMIA	I	-	-	-	-	-	-	-	1	0.8	-
		F	-	-	-	-	-	-	-	1	0.8	-

MIA = Manejo Integral Parcial del aguacate; SMIA = Testigo; I = Inicio; F = Final,

**Cuadro 5. Comparación de medias de las variables longitud de brotes, número de inflorescencias, amarre de frutos e incidencia de *Phytophthora cinnamomi* en las raíces de árboles de aguacate al final del MIA (Tukey, 0.05). Uruapan, Michoacán. 2011.**

VARIABLE	MIA	SMIA
Longitud media de brotes/árbol (cm)	8.43a	6.22b
Inflorescencias medias/árbol	13.17a	12.45a
Frutos amarrados/árbol	16.79a	7.13b
% de raíces infectadas/árbol (inicio)	37.92a	26.94b
% de raíces infectadas/árbol (final)	6.59b	30.24a

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)



**Figura 1. Trozos de raíces de aguacate sembrados en Cajas Petri con el medio selectivo PARPH.**

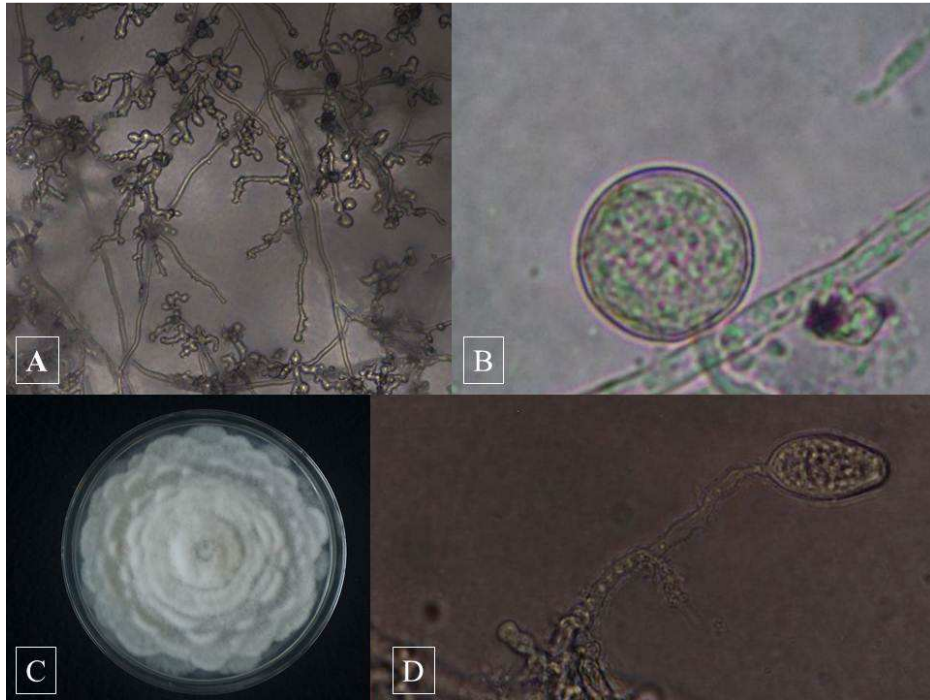


Figura 2. Estructuras morfológicas de *Phytophthora cinnamomi* Rands. A) Micelio cenocítico toruloso. B) Clamidospora esférica. C) Colonia cameloide. D) Esporangio ovoide sin papila.

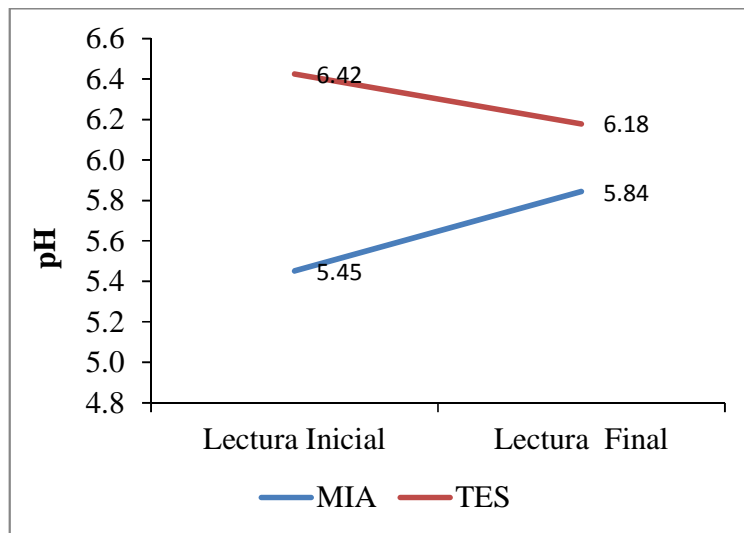
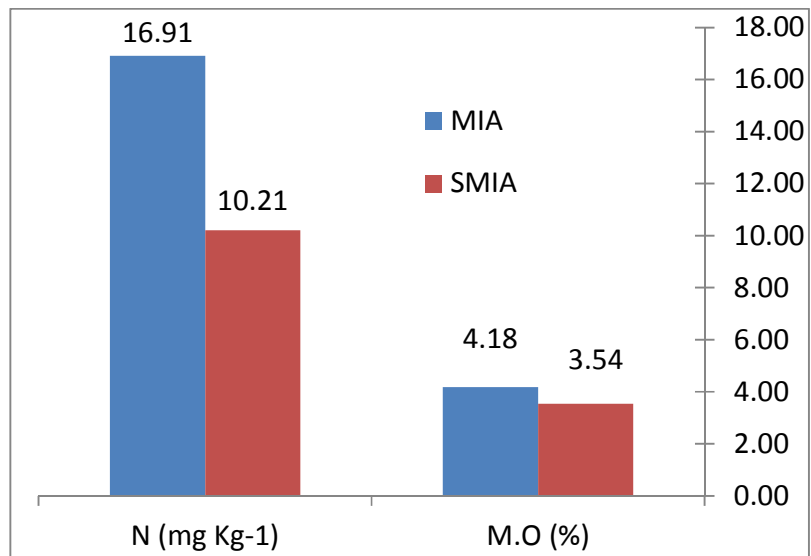


Figura 3. Lectura de pH inicial y final por tratamiento. Manejo Integral Parcial del aguacate (MIA) y testigo (SMIA). Uruapan, Michoacán. 2011.



**Figura 4. Contenido final de N y Materia orgánica (M.O) en árboles con MIA (Manejo Integral Parcial del Aguacate) y testigo (SMIA). Uruapan, Michoacán. 2011.**

## DETECCIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora cinnamomi* (Rands) EN EL CULTIVO DE AGUACATE

Dagoberto Fierro Corrales, MC

Colegio de Postgraduados, 2011

### RESUMEN

El estado de Michoacán es el principal productor y exportador de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill) en México y en el mundo y uno de sus principales problemas fitosanitarios es “la tristeza del aguacatero”, causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Para verificar la presencia de *P. cinnamomi* en las raíces de cinco árboles de aguacate con síntomas de la enfermedad, se aisló y purificó micelio a partir de sus raíces alimenticias. Posteriormente el patógeno se identificó morfológicamente como *Phytophthora cinnamomi* Rands con claves taxonómicas. La detección molecular se logró con la amplificación de la región espaciadora transcrita (ITS2) del DNA ribosomal de *P. cinnamomi* usando los iniciadores ITS3/ITS4, obteniendo un producto de amplificación de 570 pb, similares a las reportadas para este patógeno. Las secuencias de los productos amplificados presentaron un 99% de similitud con *P. cinnamomi* comparadas en la base de datos del GenBank del NCBI.

**Palabras clave:** *Persea americana* Mill, PCR, ITS, tristeza del aguacate, pudrición radical

## MOLECULAR DETECTION OF *Phytophthora cinnamomi* (Rands) IN AVOCADO

Dagoberto Fierro Corrales, MC

Colegio de Postgraduados, 2011

### ABSTRACT

The state of Michoacan is the main producer and exporter of avocado cv. Hass (*Persea americana* Mill) in Mexico and the world, and one of its main phytosanitary problems is the “tristeza del aguacatero”, caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. To verify the presence of *P. cinnamomi* in the roots of five avocado trees which exhibited characteristic symptoms of this disease, mycelium was isolated and purified from their roots. Prior to the isolation, they were identified morphologically as *Phytophthora cinnamomi* Rands according to taxonomic keys. The molecular detection was performed by the amplification of the internal transcribed section (ITS2) of the rDNA of *P. cinnamomi* using the ITS3/ITS4 primers, obtaining an amplification product of 570 pb, similar to those reported for this pathogen. The sequence of the amplified products presented a similarity of 99% with *P. cinnamomi*, compared with the data base of the GenBank of NCBI.

**Keywords:** *Persea americana* Mill, PCR, ITS, Tristeza del aguacate, root rot.

## INTRODUCCIÓN

La “tristeza del aguacate” es su principal enfermedad, su agente causal es el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Este patógeno tiene muchos hospederos y su distribución es mundial (Zentmyer, 1980; Sanabria, 2003). Se ha detectado en Australia (Old *et al.*, 1984), Sudáfrica (Linde *et al.*, 1999), E.U.A. (Coffey, 1992) y México (Téliz *et al.*, 1992), entre otros. En la actualidad, con la comercialización y difusión lograda, el cultivo de aguacate presenta gran importancia económica para México, por ser el principal productor a nivel mundial con 1'230,970 t, seguido por Chile, Indonesia, República Dominicana, Colombia, Brasil, Perú, E.U.A. y Kenia (FAOSTAT, 2011). La tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands), causa daños y pérdidas importantes (Téliz y Mora, 2007). En 1979 se estimaron 13 mil árboles dañados, en suelos pobres en materia orgánica; en 1994 se detectaron cerca de 100 mil árboles y en 1999 la severidad estimada subió a 550 mil árboles enfermos en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tingüindín, Los Reyes, Tancítaro, Peribán y Ziracuaretiro, con pérdidas estimadas en alrededor de 640 millones de pesos (Vidales, 1999). En el 2007 se estimó su presencia en todos los municipios productores en aproximadamente 5,500 ha, equivalentes al 5% de la superficie estatal cultivada (Mora *et al.*, 2007).

La identificación morfológica de *Phytophthora* requiere de cultivos puros a partir de plantas enfermas, claves taxonómicas, medios selectivos, etc. (Tsai *et al.*, 2006). Actualmente, las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), son ampliamente utilizadas para la detección de fitopatógenos debido a las ventajas de sensibilidad y rapidez en el proceso de las muestras (Martin *et al.*, 2000). Los genes del DNAr (DNA ribosomal) han sido empleados para analizar los principales eventos evolutivos ya que son regiones altamente conservadas, mientras que la región espaciadora transcrita o ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del DNAr (ITS1 e ITS2) es variable, de modo que se emplea para

encontrar similitud o diferencias entre especies (Lee *et al.*, 2000). Por lo tanto, la región ITS es ampliamente utilizada en la identificación de muchas especies de hongos y oomycetos debido a su utilidad sistemática y taxonómica (Chillali *et al.*, 1998).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue confirmar por PCR la identificación morfológica de *P. cinnamomi* en árboles con síntomas de clorosis, hojas pequeñas, defoliación parcial, necrosis y pudrición parcial o total de raíces alimenticias.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se colectaron 18 muestras de raíces de árboles de aguacate cv. Hass en la huerta “El Salto 2” ubicada a los 19°19'46.00''N y 102°05'40.00''O, a 1450 msnm, en la localidad de Matangarán, Mpio. de Uruapan, Michoacán. Este huerto presenta un clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano, las temperaturas medias máximas y mínimas son de 28 y 12° C, con una precipitación anual de 1450 mm (García, 1981). Los suelos son de tipo andosol, con una profundidad de 1.5 m. (INEGI, 1985). Las muestras de suelo compuestas se obtuvieron en ocho puntos de la zona de goteo del árbol, a una profundidad de 0-20 cm, las raíces alimenticias se separaron en un cernidor, y se almacenaron a temperatura ambiente, en bolsas plásticas, con suelo húmedo para su protección.

### Condiciones de aislamiento

Para el aislamiento del micelio de *P. cinnamomi* se empleó la técnica de Zentmyer 1980; Erwin y Ribeiro, 1996; Streets, 1982. Las raíces se lavaron con agua corriente y las puntas de raíces alimenticias se cortaron transversalmente en fragmentos de 5 mm de longitud, seleccionando los límites de tejido sano y tejido necrosado. En una cámara de flujo laminar los trozos de raíces se lavaron en hipoclorito de sodio al 1 % por un minuto y se enjuagaron en tres pasos de agua destilada estéril y se colocaron en sanitas estériles para eliminar el exceso de humedad. Las raíces desinfectadas se sembraron en medio de cultivo selectivo para *Phytophthora* PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, pcnb e himexazol) (Mitchell *et al.*, 1986). Se sembraron 10 trozos de raíces en forma vertical por caja Petri; cuatro cajas Petri por muestra para un total de 40 raíces por árbol muestreado. Los aislamientos se incubaron a 28° C por tres días en obscuridad total. Con el propósito de caracterizar morfológicamente e identificar la especie del género *Phytophthora* asociada a la tristeza del aguacatero se seleccionaron cinco aislamientos, los cuales

fueron transferidos a medios de cultivo PDA (Papa-dextrosa-agar, Bioxon®) con 500 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina. Se tomó únicamente las puntas de hifa de crecimiento del oomyceto, y se incubó a 28° C durante 72 h, para la colecta de micelio.

### **Extracción de DNA**

El DNA genómico se aisló de micelio, a las 72 horas de su crecimiento en PDA a 25° C (Cenis, 1992). En un tubo Eppendorf de micro-centrifuga de 2 mL se adicionaron 300 µl de buffer de extracción (Tris 200mM pH 8.5, NaCl mM, EDTA 25mM, SDS 0.5%) y 100 gr de micelio del oomyceto, colectado de la caja de cultivo con una espátula. El micelio se maceró con un pistilo cónico accionado con un motor manual inalámbrico marca Kontes modelo SF24837V a 200 rpm durante 3 min. Posteriormente se adicionaron al tubo 150 µL de acetato de sodio (3M, pH 5.2) y se incubó a -20°C por 10 min. Se centrifugó durante 5 min a 11,300 x g y se transfirió la capa superior acuosa a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, se adicionó un volumen igual de Isopropanol frío (4°C) con inversión gentil, y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. El DNA precipitado se sedimentó por centrifugación (11,300 x g por 5 min) desechando el sobrenadante y se lavó la pastilla en Etanol 70%, y nuevamente se centrifugó (11, 300 x g por 5 min). La pastilla formada, se secó a temperatura ambiente durante 20 min, y se resuspendió en 50 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0).

### **Amplificación por PCR de la región ITS**

La amplificación del gen 5.8S rDNA y la región conservada adyacente ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) se realizó con la pareja de iniciadores ITS3/ITS4 (White *et al.*, 1990) (Cuadro 1) en un volumen final de 12.5 µL de reacción. Contenía 1X de amortiguador para PCR (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4) (Invitrogen), 0.2 mM de cada dNTPs, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Biogenica), 20 pmol de cada iniciador (ITS3/ITS4), 1 U de *Taq* DNA polimerasa

(Invitrogen) y 20 ng de DNA objetivo. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Multigene y consistió en un primer paso de desnaturalización a 96° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 52° C (temperatura de alineamiento) y 1.2 min a 72° C, y un paso final como extensión de 72° C por 10 min. El producto de amplificación esperado (570 pb) se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 1% (p/v) en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), teñidos previamente con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de peso molecular la escalera de 100 pb (Invitrogen).

### **Secuenciación de la región ITS**

Los amplicones fueron purificados y secuenciados por la empresa Macrogen Corp (Rockville, MD, USA). Se les asignó clave para su identificación como se indica: R5, R14, R16, R18 y R23. Todas las secuencias se analizaron empleando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, posteriormente se compararon en las bases de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y de Phytophthora database. Para la elaboración del dendograma se alinearon las secuencias en ClustalX 1.83 y se empleó el NJplot para su visualización. El procedimiento molecular lo realizó la Dra. Blanca Nieves Lara Chávez en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Uruapan, Michoacán.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción de DNA

El DNA total obtenido de las cinco muestras de micelio mostró buena calidad e integridad (Figura 1) y su concentración puede considerarse un excelente rendimiento. En este procedimiento las paredes celulares se rompieron por la fuerza mecánica ejercida por el macerador de pistilo cónico y la mezcla del buffer de lisis. A pesar de que la mayoría de los protocolos para extracción de DNA consumen mucho tiempo porque implican muchos pasos para la lisis celular debido a la rigidez de la pared celular de hongos y oomycetos (Cardinali *et al.*, 2001), la eliminación de las proteínas, polisacáridos, el RNA, o de otros componentes celulares (Sambrook y Russell, 2001; Wangsomboondee y Ristaino, 2002; Mahuku, 2004), los niveles de pureza de las cinco muestras indicaron una mínima presencia de contaminantes, pues se encontraban en los rangos ideales de absorbancia ( $A_{260}/A_{280}$ ) de 1.6 – 1.9. Esto confirma la eficiencia del protocolo de extracción de DNA empleado para este estudio, así mismo, para los posteriores análisis moleculares se obtuvieron cantidades suficientes de DNA de calidad.

### Detección de *P. cinnamomi* por PCR

La detección de *P. cinnamomi* en muestras de raíz, se realizó mediante PCR empleando los iniciadores ITS3/ITS4, se obtuvo un producto de amplificación de 570 pb. Los resultados de la PCR indican que *P. cinnamomi* está presente en las cinco muestras de micelio aisladas de raíces de plantas de aguacate con síntomas de tristeza del aguacate de la huerta “El Salto 2” ubicada en el municipio de Uruapan, Michoacán (Figura 2).

En estudios recientes se han realizado diferentes análisis para la detección de *P. cinnamomi*, como la identificación tradicional basada en criterios morfológicos y culturales, esto es la observación directa e identificación por taxonomía (Hardham, 2005), la detección inmunológica (Cahill y Hardham, 1994) y los métodos de detección del DNA, los cuales son cada vez más

empleados por su rapidez, sensibilidad y especificidad (Weller-Alm *et al.*, 2000). Pruebas basadas en los ácidos nucleicos de secuencias específicas dentro de las regiones ITS entre los genes de DNAr se han utilizado para hibridar específicamente con *P. cinnamomi* (Bailey *et al.*, 2002). Por otro lado, se han diseñado iniciadores específicos del DNAr de la región ITS para amplificar el DNA de especies de *Phytophthora* (Drenth and Irwin, 2001; Lévesque *et al.*, 1998), esto ante la necesidad de determinar de manera rápida la especie implicada a estudiar. Además los iniciadores ITS3 e ITS4 han sido ampliamente utilizados para amplificar las regiones espaciadoras ITS de varias especies de hongos y oomycetos, debido a que son regiones altamente conservadas con regiones variables, haciendo que sean candidatos ideales para estudios de evolución molecular (Lee and Taylor, 1992). En resumen, las regiones ITS evolucionan rápidamente y pueden variar entre especies dentro de un género o entre poblaciones (Gardes *et al.*, 1991), por esta razón para este estudio fue gran utilidad la amplificación de dichas regiones, pues permitió determinar rápida y verazmente la presencia/ausencia del agente causal de la tristeza del aguacatero en raíces de aguacate con síntomas de tristeza en la región de Uruapan, Michoacán.

### **Secuenciación de la región ITS**

El porcentaje de identidad de las secuencias de los cinco aislados de raíces de aguacate, fue de 99% para las primeras 10 secuencias homólogas de *Phytophthora cinnamomi* comparadas en el GenBank del NCBI, lo cual indicó que las secuencias analizadas en este estudio, coinciden en un mayor porcentaje de similitud con aislados de Taiwán (No. Accesoión: GU111595.1; GU111591.1; GU111594.1), confirmando que se trata de la especie *P. cinnamomi*. Con el objetivo de tener mayor información, las secuencias objetivo fueron sometidas en la base de datos *Phytophthora* database, mostrando un porcentaje de similitud del 100% comparadas con 20 aislados de *Phytophthora cinnamomi*. Los números de accesoión PD01208 y PD00777, aislados

provenientes de E.U.A. y Australia respectivamente, indicaron que el porcentaje de similitud de identidad de la especie *P. cinnamomi* era homólogo a las secuencias objetivo.

El análisis filogenético mostró estrecha similitud entre las secuencias R14-ITS3, y R18-ITS3 que se agrupan en un mismo subclado (Figura 3), y que a su vez, forma un clado más grande en donde se agrupan los miembros de *Phytophthora cinnamomi*, los cuales se encuentran sometidos en el NCBI del GenBank. Estos resultados refuerzan la formación de un subclado similar entre las secuencias objetivo y *P. cinnamomi*, aunque cabe señalar, con la formación de un diferente subclado para las secuencias R5-ITS3, R16-ITS3 y R23-ITS3, que finalmente se agrupan en una misma rama del árbol filogenético evidenciando su similitud. Por otro lado, se observa que *Fusarium oxysporum* se ubicó en un clado externo de la raíz del árbol, lo cual indicó que no tenía ninguna similitud evolutiva entre las secuencias objetivo que fueron comparadas.

## LITERATURA CITADA

**Bailey A M, D J Mitchell, K L Manjunath, G Nolasco, C L Niblett (2002)** Identification to the species level of the plant pathogens *Phytophthora* and *Pythium* by using unique sequences of the ITS1 region of ribosomal DNA as capture probes for PCR ELISA. FEMS Microbiology Letters 207: 153-158.

**Cardinali G, A Bolano, S Martini (2001)** A DNA extraction and purification method for several yeast genera. Can. J. Microbiol. 34: 1025-1036.

**Cenis J L (1992)** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucl. Acids Res. 20 (9): 2380.

**Chahill D, A Hardham (1994)** A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. Phytopathology 84: 1284-1292.

**Chillali M, H. Ldder-Ighili, J J Guillaumin, C Mohammed, B L Escarmant, B Botton (1998)** Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. Mycol. Res. 102: 533-540.

**Coffey M D (1992)** *Phytophthora* root rot of avocado. In: Plant Disease of Fruit Crops. Kumar J, H S Chaube, U S Singh, A N Mukhopadhyay (eds) Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. pp: 423-444.

**Drenth A, J A G Irwin, (2001)** Routine DNA based diagnostic tests for *Phytophthora*. Rural Industries Research and Development Corporation 01 (36): 1-18.

**Gardes M, T J White, J A Fortin, T D Bruns, J W Taylor (1991)** Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany 69:180-190

**Hardham A R (2005)** *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6(6): 589-604.

**Lee S B, J W Taylor (1992)** Phylogeny of Five Fungus-like Protoctistan *Phytophthora* species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9(4): 636-656.

**Lee Y M, C Yong-Keel, M Byung-Re (2000)** PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. *The Journal of Microbiology* 38(2): 66-73.

**Lévesque C A, C E Harlton, A W De Cock (1998)** Identification of some oomycetes by reverse dot blot hybridization. *Phytopathology* 88: 213-222.

**Linde C, A Drenth, M J Wingfield (1999)** Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *European Journal of Plant Pathology* 105: 667-680

**Mahuku G S (2004)** A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 22, 71–81.

**Martin R R, D James, C A Lévesque (2000)** Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease. *Annual Review Phytopathology.* 38: 207-239.

**NCBI** National Center for Biotechnology Information. *In:* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulta realizada en octubre de 2011.

**Old K M, G F Moran, J C Bell (1984)** Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany* 62: 2016-2022.

Phytophthora database. *In:* <http://www.phytophthoradb.org/>

**Sambrook J, D W Russell (2001)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Sanabria H (2003)** La tristeza del aguacate y su control. *Horticultura global: revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola* 171: 61-62.

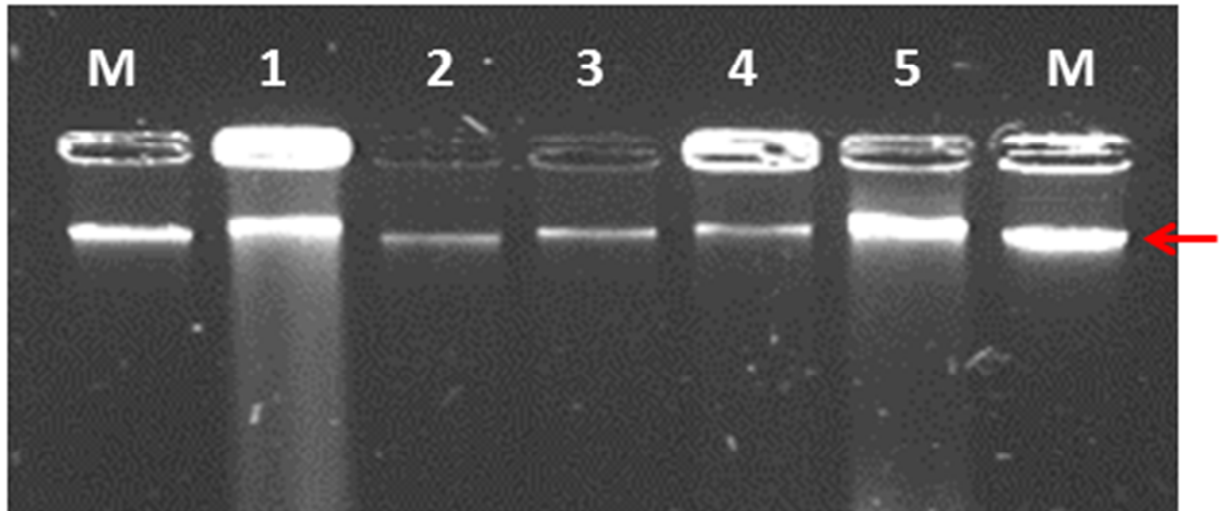


- Téliz D, A Mora, C Velásquez, R García, G Mora, P Rodríguez, J Etchevers, S Salazar (1992)** Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. Proceedings of Second World Avocado Congress: pp: 79-87.
- Tsai H L, L C Huang, P J Ann, R F Liou (2006)** Detection of orchid *Phytophthora* disease by nested PCR. Botanical Studies 47: 379-387.
- Wangsomboondee T, J B Ristaino (2002)** Optimization of sample size and DNA extraction methods to improve PCR detection of different propagules of *Phytophthora infestans*. Plant Disease. 86: 247–253.
- Weller A E, D Zheng, L Raskin (2000)** The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. Applied Environmental Microbiology 66, 4547-4554.
- White T J, T Bruns, S Lee, J W Taylor (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M A, D H Gelfand, J J Sninsky, T J White (eds). Academic Press, Inc., New York. pp: 315-322.
- Zentmyer G A (1980)** *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monogr. No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul, Mn. 96 p.

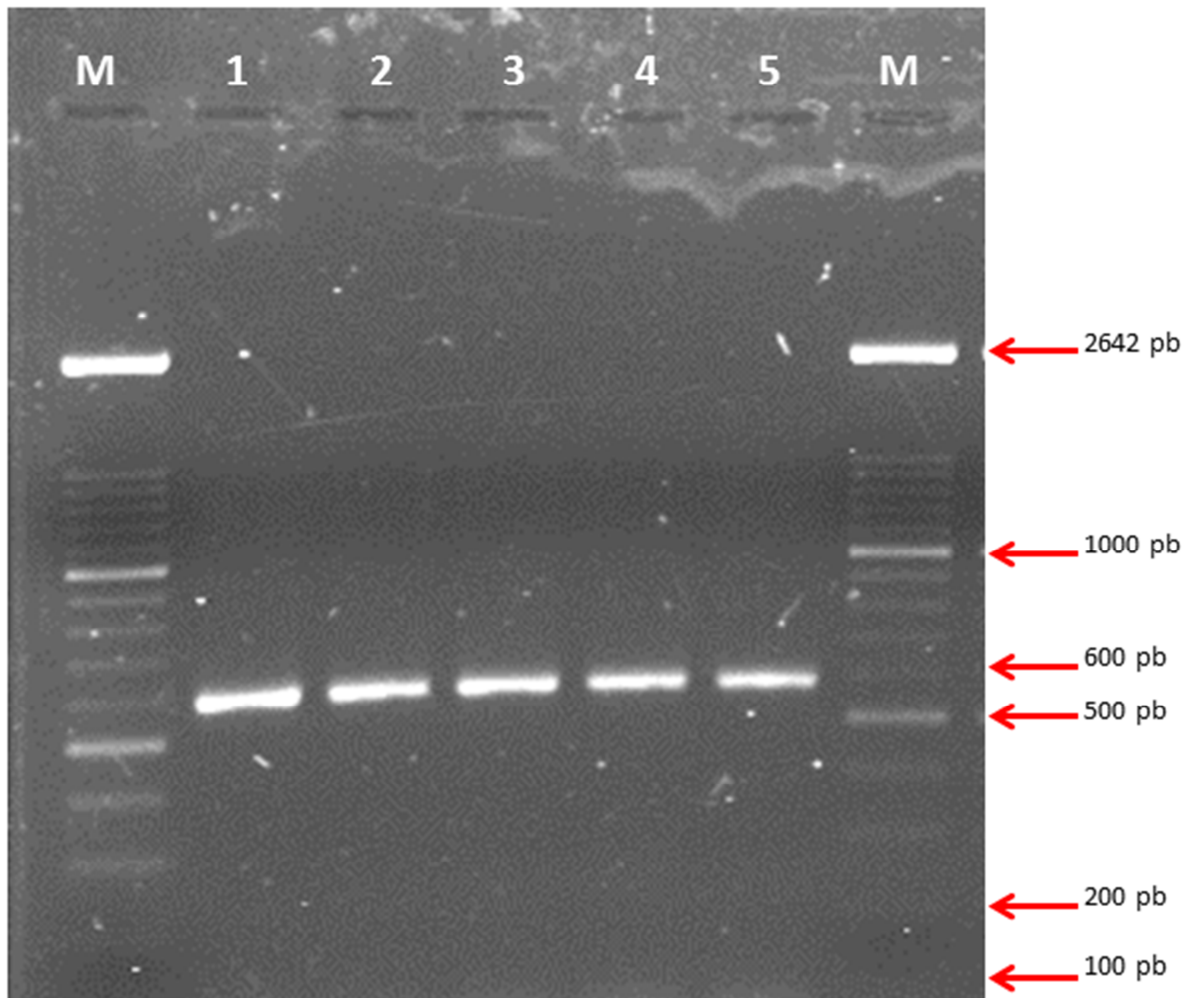
## ANEXOS

**Cuadro 1.** Secuencia de los iniciadores empleados para la amplificación de la región ITS.

Iniciadores	Secuencia de los iniciadores
ITS 3	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
ITS 4	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'



**Figura 1.** Electroforesis del aislamiento del DNA de cinco muestras de micelio de *Phytophthora cinnamomi*. El DNA fue separado en agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Líneas: M) marcador fago  $\lambda$  en concentración 100 ng/ $\mu$ L; 1) Muestra R5; 2) Muestra R14; 3) Muestra R16; 4) Muestra R18; 5) Muestra R23.



**Figura 2. Productos de amplificación de la PCR con los iniciadores ITS3/ITS4. Líneas: M) Marcador molecular 100 pb; 1) Muestra de raíces de aguacate R5; 2) R14; 3) R16; 4) R18; 5) R23.**

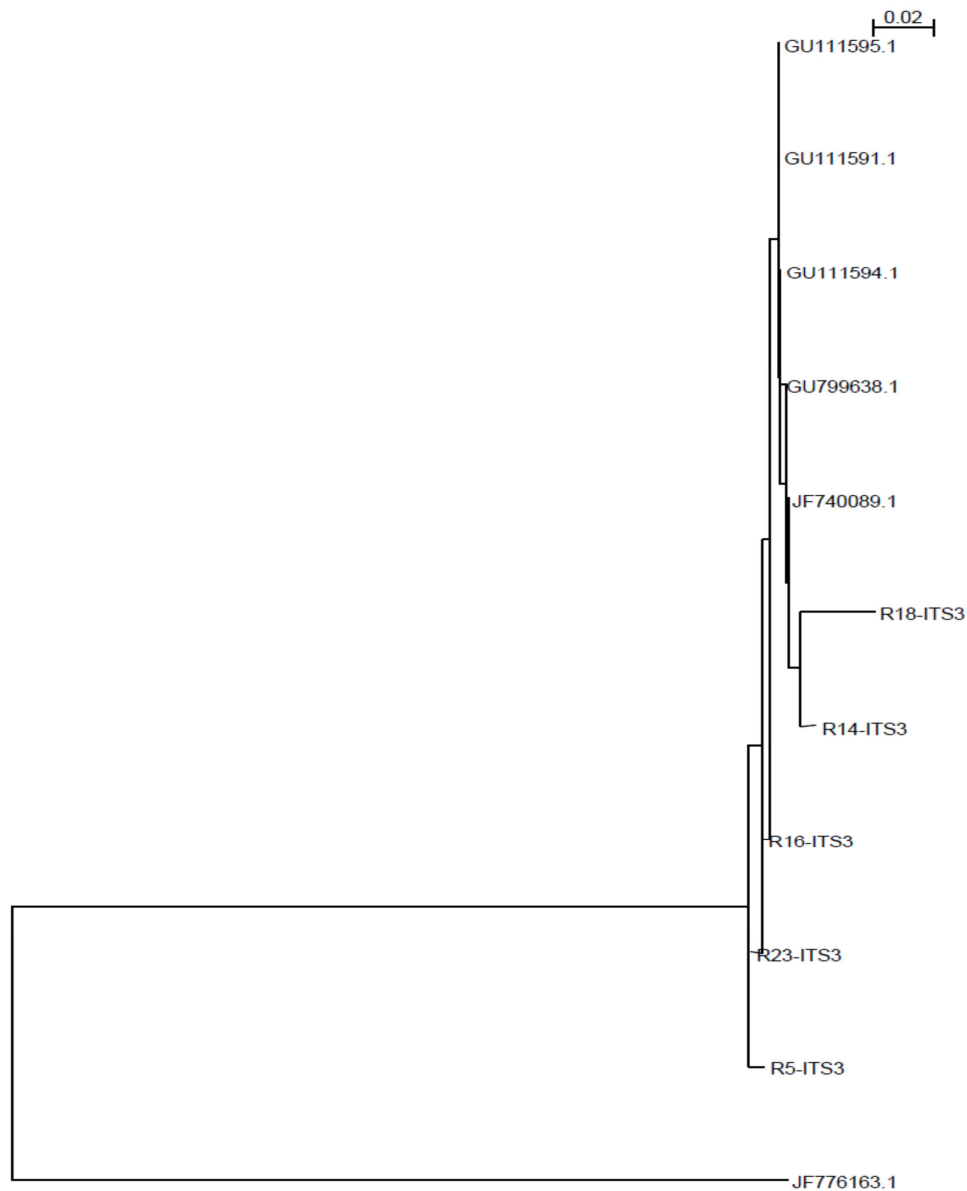


Figura 3. Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen ITS DNAr de las amplificaciones de *P. cinnamomi* para las cinco muestras de aguacate en comparación de alineamiento con diferentes aislados de *P. cinnamomi* de la base de datos del GenBank. La secuencia de *Fusarium oxysporum* se utilizó como grupo externo. El árbol está dibujado a escala con la longitud de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas para inferir el árbol filogenético.

## CONCLUSIONES GENERALES

El Manejo Integral Parcial del aguacate redujo la severidad de la tristeza del aguacatero en las raíces de los árboles tratados, lo cual permitió la formación de brotes más elongados y un mayor amarre de frutos en los árboles donde se aplicó el Manejo Integral Parcial del aguacate que en los árboles sin Manejo Integral Parcial. Sin embargo, no se observó recuperación del área foliar en ninguno de los dos tratamientos debido quizás al corto tiempo (ocho meses) en que se estableció el experimento.

Se verificó molecularmente la identidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands, asociado a la pudrición de raíces alimenticias de aguacate en el municipio de Uruapan.