

## **PROGRAMA DE SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTES A LA PODREDUMBRE BLANCA CAUSADA POR *Rosellinia necatrix* EN EL SUR DE ESPAÑA (1995-2007)**

A. Barceló-Muñoz<sup>1</sup>, T. Zea-Bonilla<sup>1</sup>, I. Jurado Valle<sup>1</sup>, I. Imbroda-Solano<sup>1</sup>, I. Vidoy-Mercado<sup>1</sup>, F. Pliego-Alfaro<sup>2</sup> y C. J. López-Herrera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria. Cortijo de la Cruz s/n. Churriana. 29140. Málaga. España. E-mail: araceli.barcelo@juntadeandalucia.es

<sup>2</sup>Dpto. de Biología Vegetal, F. De Ciencias, UMA. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. España. E-mail: ferpliego@uma.es

<sup>3</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080, Córdoba. España. E-mail: lherrera@cica.es

En este trabajo se presentan los resultados actuales del programa de selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix*, una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo en el sur de España.

Se han continuado realizando los tests de selección de material, mediante inoculaciones artificiales del patógeno sobre plantas procedentes de semillas en primera inoculación y sobre plantas preseleccionadas, multiplicadas *in vitro* o mediante estaquillado semileñoso convencional, en segunda inoculación. Durante este cuatrienio (2003-2006) se han sometido a primera inoculación 2.612 plantas procedentes de semillas de árboles locales aclimatados a la zona. Los clones supervivientes (preselecciones) han pasado, junto con las preselecciones de años anteriores, al programa de propagación para, una vez multiplicados vegetativamente, ser sometidos a la segunda inoculación con *R. necatrix*. El material superviviente (selecciones), está siendo plantado en una parcela infestada artificialmente con *R. necatrix* para su evaluación previa a la definitiva en plantaciones comerciales infestadas por el patógeno. Paralelamente, se ha continuado con la propagación de los árboles seleccionados en campo como "posibles escape", y con la evaluación de su tolerancia a *R. necatrix* mediante inoculaciones artificiales con el patógeno.

**Palabras clave:** *Persea americana*, germoplasma, inoculación artificial, patrones de aguacate, susceptibilidad.

## **SELECTION PROGRAM FOR AVOCADO ROOTSTOCKS TOLERANT TO WHITE ROT CAUSED BY *Rosellinia necatrix* IN SOUTHERN SPAIN (1995-2007)**

A. Barceló-Muñoz<sup>1</sup>, T. Zea-Bonilla<sup>1</sup>, I. Jurado Valle<sup>1</sup>, I. Imbroda-Solano<sup>1</sup>, I. Vidoy-Mercado<sup>1</sup>, F. Pliego-Alfaro<sup>2</sup> and C. J. López-Herrera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria. Cortijo de la Cruz s/n.

Churriana. 29140. Málaga. España. E-mail: araceli.barcelo@juntadeandalucia.es

<sup>2</sup>Dpto. de Biología Vegetal, F. De Ciencias, UMA. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. España. E-mail: ferpliego@uma.es

<sup>3</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080, Córdoba. España. E-mail: lherrera@cica.es

This paper shows the current results of the selection program for avocado rootstocks tolerant to white rot caused by *Rosellinia necatrix*, one of the most important diseases affecting this crop in Southern Spain. Tests for material selection have been carried out through artificial inoculations of the pathogen on seedlings from first-inoculation seeds as well as on preselected plants, multiplied *in vitro* or through conventional semi-woody cutting in second inoculation.

During this four-year period (2003-2006), 2,612 seedlings from seeds of local trees acclimatized to the zone have been subject to first inoculation. Pre-selected seedlings together with selections from previous years are being propagated to undergo a second inoculation, after their vegetative multiplication. Surviving selections are being placed on a plot artificially infested with *R. necatrix* for evaluation prior to a final one in commercial orchards infested by the pathogen. At the same time, propagation of trees selected from infested areas (escape trees) is being carried out to evaluate its performance following artificial inoculations with the pathogen.

**Keywords:** *Persea americana*, germplasm, artificial inoculation, avocado rootstocks, susceptibility.

## 1. Introducción

La podredumbre blanca de raíz de aguacate causada por *Rosellinia necatrix* Prill. (anamorfo *Dematophora necatrix* Hartig) es una enfermedad muy destructiva en numerosos cultivos (Khan, 1959; Szejnberg y Madar, 1980). En España, se detectó por primera vez en aguacate en 1987 (López-Herrera, 1989) y actualmente, la incidencia de *R. necatrix* en fincas con árboles sintomáticos es aproximadamente del 40%. El control de esta enfermedad se basa en prácticas culturales tales como, reducción del riego, zanjas de aislamiento, eliminación de malas hierbas y descalce de la base de los troncos. La solarización del suelo, aunque presenta ciertas limitaciones prácticas, también resulta muy efectiva pues este hongo es muy sensible a temperaturas altas (López-Herrera *et al.*, 1998; 1999a). En el control químico se han valorado distintos fungicidas sistémicos y de contacto, apareciendo fluazinam como un fungicida de contacto bastante efectivo y con una gran persistencia en suelo (López-Herrera y Zea-Bonilla, 2007). En el control biológico se han seleccionado distintas cepas de *Trichoderma* spp. por su efectividad tanto *in vitro* (Ruano *et al.*, 2003) como *in vivo* (López-Herrera *et al.*, 1999b) y también se están utilizando, con resultados prometedores, *Pseudomonas* spp. (Pliego *et al.*, 2007). No obstante, el control de esta enfermedad se ha de realizar integrando distintos métodos de lucha; en este sentido resulta de gran interés disponer de portainjertos tolerantes a *R. necatrix* para su uso en la reposición de árboles enfermos y en la realización de nuevas plantaciones. En este trabajo se presentan los avances realizados en la investigación de selección de material de aguacate tolerante a esta enfermedad,

durante el cuatrienio 2003-2006, siendo continuación de los ya publicados anteriormente (López-Herrera *et al.*, 1999b; Pérez-Jiménez *et al.*, 2003).

## 2. Materiales y métodos

### *Evaluación de la tolerancia a la podredumbre blanca en material de semilla*

Se ha evaluado mediante inoculaciones artificiales la susceptibilidad de diverso material de aguacate ante la infección causada por *Rosellinia necatrix*.

En la Estación Experimental “La Mayora”, C.S.I.C. (Algarrobo-Málaga, España) se dispone de una parcela de árboles portainjertos de aguacate procedentes de semillas de origen diverso, utilizadas en las primeras plantaciones que se realizaron en el Sur de la Península. Estos árboles se utilizaron como fuente de semillas para el presente trabajo.

Las semillas procedían de árboles de esta parcela que no se habían testado con anterioridad y de 3 árboles (La Piscina, C.A. Bueno y Cónsula 9) que habían destacado por proporcionar, en diferentes años, unos elevados porcentajes de semillas que sobrevivieron a la 1ª inoculación con *R. necatrix*. Antes de la siembra, que se realizó en invierno, las semillas se desinfestaron superficialmente mediante lavado en agua a 50°C durante 30 minutos, seguidamente se sembraron en macetas de 5 l con un sustrato mezcla de arena:turba:tierra (1:2:1) previamente esterilizado con vapor de agua.

Seis meses después de la germinación, las plantas procedentes de estas semillas se inocularon con un aislado muy virulento de *R. necatrix* (López-Herrera *et al.*, 1999b). El inóculo de *R. necatrix*, trigo estéril colonizado por el hongo (3,75 g de trigo colonizado /l sustrato), se incorporó directamente en la maceta a diferentes profundidades. Estas inoculaciones se realizaron durante la primavera de cada año bajo umbráculo, intentando en la medida de lo posible que los distintos factores que afectan al desarrollo de la enfermedad (inóculo, material vegetal y condiciones ambientales), no fuesen diferentes entre experimentos.

Después de determinar la viabilidad del hongo en las raíces de las plantas supervivientes se transplantaron a bolsas de mayor tamaño. Estas preselecciones se dejaron crecer otros seis meses antes de pasar a la fase de propagación.

### *Multiplicación de material de semilla seleccionado*

Para confirmar la tolerancia observada tras una primera inoculación con *R. necatrix* en material procedente de semilla, se procedió a su multiplicación siguiendo dos técnicas distintas: micropropagación (Barceló-Muñoz *et al.*, 1990) o estaquillado semileñoso convencional (Hartmann *et al.*, 1997): estaquillas de 12 cm., con 3-4 hojas, se enraizaban bajo túnel de plástico en invernadero

climatizado, tras sumergir su base durante 10 s en una solución de ácido indolbutírico (5000 ppm).

Las copias de las preselecciones se dejaron crecer bajo umbráculo hasta alcanzar el tamaño fijado (125 cm) para realizar la 2ª inoculación artificial con *R. necatrix*.

#### *Material seleccionado en campo como escape*

De los 17 árboles asintomáticos seleccionados como “escape”, en manchas de enfermedad de distintas plantaciones de la costa sur de España que presentaban un alto grado de infestación por *R. necatrix*, nueve se han micropropagados (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 1997). Sus copias, cuando alcanzan 125 cm, son inoculadas artificialmente tal y como se ha descrito para el material de semilla.

#### *Evaluación del grado de tolerancia en maceta del material de semilla preseleccionado y del material adulto seleccionado en campo*

Las plantas propagadas vegetativamente procedentes de semilla o de árboles “escape”, cuando alcanzaron el tamaño anteriormente citado, se agruparon en los denominados **Grupos de inoculación** (Tabla 1) que se evaluaron siguiendo la misma metodología de inoculación utilizada en la primera fase. En este caso las plantas se mantuvieron en invernadero con condiciones de temperatura controlada. A partir de la aparición de los primeros síntomas, se realizaron lecturas semanales de síntomas aéreos. Tras 6 meses, se realizó la selección de las supervivientes, selecciones avanzadas, comprobándose la presencia de inóculo en suelo y de micelio en las raíces, aislándose el hongo en las raíces sintomáticas.

Tabla 1. Segunda inoculación de plantas supervivientes (“preselecciones”) en 1ª inoculación.

Año	Grupos de Inoculación	Total plantas inoculadas
2003	G-IV	54
2003	G-V	11
2003	G-VI	19
2004	G-VII	18
2004	G-VIII	59
2004	G-IX	106
2004	G-X	77
2005	G -XI	30
2005	G-XII	22
2005	G-XIII	53

*Evaluación del grado de tolerancia de las selecciones avanzadas tolerantes a R. necatrix en parcela infestada artificialmente*

Copias de las selecciones avanzadas han de ser evaluados en la siguiente fase del programa de selección, en condiciones de campo simuladas. Para ello se preparó en 2001, en el IFAPA, Centro de Churriana, (Málaga, España), una parcela, mediante relleno de una fosa de 1,5 m de profundidad y 14 x 12 m<sup>2</sup> de superficie, con suelo de estructura pizarrosa procedente de la zona de Vélez-Málaga donde se encuentra la mayoría de las plantaciones aguacateras de la provincia de Málaga. El suelo se roturó y abonó en fondo adecuadamente y posteriormente se solarizó mediante aplicación de cubierta plástica.

Para inocular artificialmente la parcela se plantaron en 2001 92 plantas de aguacate, cv. Topa-Topa, de 1 año de edad, muy susceptible a *R. necatrix* y se dejaron vegetar durante 3 años. Una vez que las plantas habían desarrollado convenientemente el sistema radicular se inocularon artificialmente con dos aislados muy virulentos (CH 53 y CH 320) de *R. necatrix*. La inoculación se realizó mediante la incorporación al sustrato de 18,75 g de semillas de trigo colonizadas /planta, de una mezcla (1:1) de ambos aislados del patógeno. A medida que las plantas se murieron se cortaron por la base del tronco y se mantuvo enterrado el sistema radicular manteniendo la humedad del suelo para incrementar el nivel de inóculo del *R. necatrix* en las raíces infectadas.

Las selecciones tolerantes obtenidas, procedentes de árboles escape o de semillas de distintos orígenes, una vez propagadas vegetativamente, se están plantando en huecos de la parcela entre los puntos de plantas inoculadas anteriormente, para ver su evolución en condiciones naturales de infección. El sistema radicular infectado de las plantas que no sobrevivan quedará incorporado al suelo, para incrementar el nivel de inóculo y las plantas

supervivientes serán seleccionadas definitivamente como tolerantes a *R. necatrix*.

### 3. Resultados y Discusión

Entre 2003 y 2006 se han recolectado semillas procedentes de los siguientes árboles:

2002: 20-XIX-La Cónsula 5; 18-XIX-La Cónsula 7; 33-XVIII, 27-XVIII-La Piscina; 23-XVIII-Alhaurín y 21-XVIII-La Cónsula 12.

2003: XVIII-17, XVIII-25, XVIII-28, XVIII-33, XIX-17, XIX-18, XIX-20, XIX-21, XIX-24, XIX-25, XIX-26, XIX-29, XIX-30, XX-17 y XX-40.

2004: XIX-17 Cónsula 9 y XVIII 28 A. Bueno.

2005: XVIII-27 La Piscina, XIX-17 Cónsula 9 y XVIII-28 A. Bueno.

Las preselecciones tolerantes a *R. necatrix* se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Plantas de semilla inoculadas en el periodo 2003-2006 y preselecciones tolerantes obtenidas.

Año	Plantas inoculadas	Preselecciones
2003	318	0
2004	604	4
2005	949	32
2006	741	4
TOTAL	2612	40

En las primeras inoculaciones realizadas en este cuatrienio se continúa detectando tolerancia en plantas procedentes de los tres árboles madre (La Piscina, C.A. Bueno y Cónsula 9) que habían destacado en años anteriores.

Tras la segunda inoculación, en este cuatrienio se ha seleccionado tres nuevas selecciones avanzadas: BG-108, BG-89 y BG-7. Además, uno de los árboles escape, BG 181, sobrevivió tras la inoculación artificial.

Tanto las selecciones avanzadas como los árboles posibles escape que han sobrevivido a las inoculaciones artificiales se plantaron en la parcela artificial (Tabla 3).

Los clones plantados en la parcela infestada, se reflejan en la tabla 2. Actualmente se está evaluando la supervivencia de dichas plantas.

Tabla 3. Selecciones plantadas en parcela infestada artificialmente.

Clones	Nº plantas inoculadas
BG 41	4
BG 42	6
BG 83	6
BG 181	6

En manzano, Lee *et al.* (2000) están realizando trabajos similares al nuestro para seleccionar portainjertos tolerantes a *R. necatrix* (Lee *et al.*, 2000); estos autores encuentran, en general, una alta susceptibilidad en las plántulas de semilla procedentes de la mayoría de los clones de la colección estudiados, sin embargo, al igual que nosotros, detectan clones de los cuales se obtienen plantas de semilla con una tolerancia consistente. En aguacate, la supervivencia detectada en determinadas descendencias de plantas madre localizadas en la parcela de la E.E. "La Mayora", parece indicar que estos clones son una fuente potencial de material para ser utilizado en el desarrollo de portainjertos tolerantes a *R. necatrix*; estos clones serán cruzados de forma dirigida en el futuro para incrementar la tolerancia en las plántulas procedentes de estos cruces.

#### Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a todos los que han colaborado en la realización de este trabajo: propietarios y encargados de fincas y personal técnico e investigador de "La Mayora" (C.S.I.C.), O.C.A. de Estepona, S.A.T. Trops, Procam y Micoma, del I.C.I.A de Canarias, Viveros Brokaw, y Susan Calzada Jurevičiute por su ayuda en la preparación del manuscrito. Esta investigación está financiada por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Proyectos INIA SC-98-042, RTA-02-023 y RTA-06-0027.

#### 4. Literatura Citada.

BARCELÓ-MUÑOZ, A. Y PLIEGO-ALFARO, F., 1997. Método para la micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) adulto. Oficina Española de Patentes y Marcas, Nº P9700700.

BARCELÓ-MUÑOZ A., PLIEGO-ALFARO F. Y BAREA J.M. 1990. Micropropagación de aguacate (*Persea americana*) en fase juvenil. Actas de Horticultura, Vol. 1: 503-506.

HARTMANN H.T., KESTER D.E., DAVIES F.T. Y GENEVE R.L. 1997. Plant Propagation. Principles and Practices. Prentice-Hall, New Jersey.

KHAN A.H. 1955. Biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* (Hart.) Bel. Biologia, 5: 199-425.

LEE S-M, KO K. Y ALDWINCKLE H. 2000. Resistance of selected *Malus* germplasm to *Rosellinia necatrix*. Fruit Varieties Journal, 54: 219-228.

LÓPEZ-HERRERA C.J. 1989. Podredumbres radiculares del aguacate en la Costa del Sol. Años 1987-88. In: Estudios de Fitopatología (J. del Moral, ed.). pp. 172-176. SEF/DGIEA, Badajoz.

LÓPEZ-HERRERA C.J., PÉREZ-JIMÉNEZ R.M., ZEA-BONILLA T., BASALLOTE-UREBA, M.J. Y MELERO-VARA, J-M. 1998. Soil solarization in established avocado trees for control of *Dematophora necatrix*. Plant Disease, 82: 1088-1092.

LÓPEZ-HERRERA C.J., PÉREZ-JIMÉNEZ R.M., BASALLOTE-UREBA M.J., ZEA-BONILLA T. Y MELERO-VARA J.M. 1999a. Loss of viability of *Dematophora necatrix* in solarized soils. European Journal of Plant Pathology, 105: 571- 576.

LÓPEZ-HERRERA C.J., PÉREZ-JIMÉNEZ R.M., BARCELÓ-MUÑOZ A. Y ZEA-BONILLA T. 1999b. Evaluación de patrones de aguacate por su tolerancia a la podredumbre blanca. Revista Chapingo. Serie Horticultura 5 Núm. Especial: 267-270.

LÓPEZ-HERRERA C.J. Y ZEA-BONILLA T. 2007. Effects of benomyl, carbendazim, fluazinam and thiophanate methyl on white root rot of avocado. Crop Protection, 26: 1186-1192.

PÉREZ-JIMÉNEZ R.M., ZEA-BONILLA T., IMBRODA-SOLANO I., PLIEGO-ALFARO F., LÓPEZ-HERRERA C.J. Y BARCELÓ-MUÑOZ A. 2003. Selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix*. Actas del V Congreso Mundial de Aguacate: 537-541.

PLIEGO C., CAZORLA F.M., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M.A., PÉREZ-JIMÉNEZ R.M., DE VICENTE A. Y RAMOS C. 2007. Selection of biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. Research in Microbiology. doi:10.1016/j.resmic.2007.02.011.

RUANO-ROSA D., DEL MORAL-NAVARRETE L. Y LÓPEZ-HERRERA C..J. 2003. Ensayos de control biológico de la podredumbre blanca del aguacate. Actas del V Congreso Mundial de Aguacate: 519-523.

SZTEJNBERG A. Y MADAR Z. 1980. Host range of *Dematophora necatrix* the cause of white root rot disease in fruit trees. Plant Disease, 64: 662-664.