

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* Rands DE LA FRANJA AGUACATERA DE MICHOACÁN, MÉXICO.

M.B.N. Lara-Chávez, H. Guillén-Andrade, J. A. Vidales-Fernández, M. Gutiérrez-Contreras, J. López-Medina, M. E. Ángel-Palomares y T. Chávez-Bárceñas.

Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas s/n Uruapan, Michoacán, CP 60190. México. Correo electrónico: blara12001@yahoo.com.mx

En el estado de Michoacán se concentra la mayor extensión de aguacate de México y del mundo. No obstante ello, uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo, es la enfermedad llamada “Tristeza del aguacatero”, causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. La diversidad genética del agente causal es desconocida; esto ha limitado la generación de estrategias eficientes de control. Con el propósito de conocer la diversidad genética del fitopatógeno, se colectaron raíces de árboles de aguacate afectados por *P. cinnamomi* Rands, los aislamientos del oomycete se realizaron en el medio nutritivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), y se recultivaron en el medio nutritivo V8. Un total de 60 aislados provenientes de toda la franja aguacatera, fueron analizados. La caracterización morfológica indicó que la forma de la colonia en picos algodonosa fue del 20 %, arrosetada sin formar picos 15 %, algodonosa arrosetada 20 %, arrosetada 10 %, camelia abierta 5 %, sin formar la flor de la camelia 5 %, camelia abierta formando la flor 10 % y arrosetada concéntrica 20 %. Se llevó a cabo una caracterización molecular a nivel de ADN, para lo cual se utilizó un juego de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región espaciadora interna 1 (ITS1) del ADN nuclear ribosomal de *Phytophthora* spp. Se obtuvieron productos de amplificación con un tamaño aproximado de 750 pb. Los amplicones secuenciados presentan una identidad máxima de 95% con ITSs de *P. cinnamomi* al realizar un análisis tipo BLAST de las secuencias de nucleótidos (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

Palabras claves: aguacate, tristeza del aguacatero, *Phytophthora cinnamomi*.

CHARACTERIZATION OF *Phytophthora cinnamomi* Rands ISOLATES FROM THE AVOCADO-PRODUCING AREA OF MICHOACAN, MEXICO

M.B.N. Lara-Chávez, H. Guillén-Andrade, J. A. Vidales-Fernández, M. Gutiérrez-Contreras, J. López-Medina, M. E. Ángel-Palomares and T. Chávez-Bárceñas.

Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas s/n Uruapan, Michoacán, CP 60190. México. e-mail: blara12001@yahoo.com.mx

Michoacan State concentrates the greatest area for avocados in Mexico and worldwide. Nevertheless, one of the main phytosanitary problems on avocado culture is the fungal disease avocado root rot, caused by *Phytophthora*

cinnamomi Rands. The genetic diversity of the causing- pathogen is unknown; this has limited the generation of effective pathogen control strategies. With the aim of determining the genetic diversity of this phytopathogen, avocado roots affected by *P. cinnamomi* Rands were collected; oomycete isolates were obtained on PDA (Potato-Dextrose-Agar medium) and re-cultured on V8 medium. A total of 60 isolates from the whole avocado-producing area of Michoacan were analyzed. The morphological characterization indicated variations in the colony growth shape of different isolates: cotton-like with sharp tips (20 %), rose-like without sharp tips (15 %), cotton and rose-like without tips (20 %), rose-like (10 %), open camellia-like (5 %), no-camellia formation (5 %), open-camellia forming a flower (10 %) and concentric rose-like (20 %). In order to perform a molecular DNA characterization, a set of oligonucleotides designed for the amplification of the Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) region of the nuclear ribosomal DNA of *Phytophthora* spp. was employed. Products of amplification of approximately 750 pb were obtained. Sequenced amplicons presented a maximum identity of 95 % with *P. cinnamomi* according to a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) analysis of the nucleotide sequences.

Keywords: avocado, avocado sorrow, *Phytophthora cinnamomi*.

1 Introducción

En el estado de Michoacán, México, el cultivo del aguacate se encuentra establecido en una “franja” que abarca 30 municipios, los que varían de superficie plantada. Esta región es considerada la mayor productora de aguacate en el mundo, sin embargo presenta factores que limitan su producción y afectan su calidad, destacando la presencia de enfermedades de tipo fungoso como la llamada tristeza del aguacatero, ocasionada por *Phytophthora cinnamomi*, siendo está, por su importancia y distribución en la región, una limitante en la producción de este importante frutal. Los primeros reportes de la enfermedad en el estado fueron en 1979 con 13 mil árboles dañados en suelos pobres en materia orgánica. En 1994 se detectó que la enfermedad estaba distribuida en cerca de 100 mil árboles en suelos de tipo andosol. En 1999 se encontraron 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; Mora *et al.*, 2000).

Pese a su gran importancia, hasta la fecha no se cuenta con información sobre la diversidad genética y patogénica de su agente causal de la tristeza del aguacatero. Esto último, es fundamental para el desarrollo de estrategias eficientes de control así como para poder elaborar programas de mejoramiento genético de portainjertos con atributos de resistencia a esta enfermedad. El objetivo de este estudio es generar conocimiento sobre la diversidad genética y patogénica de *P. cinnamomi* que pueda ser utilizada en el diseño de estrategias de control eficiente en la región aguacatera de Michoacán.

2 Materiales y Métodos

Las colectas de raíces infectadas por *P. cinnamomi* se hicieron en las zonas con condiciones ambientales contrastantes, determinadas previa caracterización agroclimática de la franja aguacatera del estado de Michoacán. Las raíces se colectaron de árboles que presentaban los síntomas característicos de la enfermedad (Figura 1), y se hizo de acuerdo con las técnicas descritas por Zentmyer (1980) Téliz y Mora (1997). Los aislamientos y multiplicación de las cepas se hicieron de acuerdo con los criterios y metodología descrita para *P. cinnamomi* por Zentmyer (1980).



Figura 1. Síntomas ocasionados por *P. cinnamomi* en árboles de aguacate en campo, (A); necrosamiento en raíz (B).

Figure 1. Symptoms caused by *P. cinnamomi* in avocado trees in the field, (A); necrosis in roots (B).

Caracterización morfológica de *P. cinnamomi*. Los procedimientos para la caracterización fueron los descritos por Zentmyer (1980), Donald y Olaf (1996), Santiago (1992) y Hernández (1999), que incluyen características de la colonia, del micelio y presencia de anillos radiales, las cepas se colocaron a una temperatura controlada de 24 °C para determinar su desarrollo óptimo.

Caracterización molecular de *P. cinnamomi*. Para la extracción de ADN genómico de *P. cinnamomi* se utilizó un protocolo de extracción de ADN total modificado a partir del previamente reportado por Liu *et al.*, (1995). La principal variación al protocolo original consistió en precipitar el ADN con 0.25 volúmenes de AcNa 3M y cinco volúmenes de etanol absoluto frío e incubar a -20 °C durante una hora antes de recuperar por centrifugación a 130,000 rpm durante 10 minutos.

Amplificación del ITS 1 de ADNr de *P. cinnamomi* por PCR. Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR fueron los oligonucleótidos conservados ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) utilizados para amplificar la región ITS1 de varias especies, por estar diseñados en una región altamente conservada; así

como un par de oligos diseñados para la amplificación específica de la región ITS1 del ADNr del género *Phytophthora*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con aproximadamente 10 a 50 ng de ADN; dNTPs 0.8 mM de cada uno; MgCl₂ 2 mM; amortiguador de reacción de *Taq* polimerasa 1X (Invitrogen); 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 10 pmol de cada oligonucleótido utilizado. Las condiciones de amplificación consistieron en una incubación inicial a 94°C (2 min) para desnaturalizar, seguida de 40 ciclos de 94°C (30 s), 60°C (30 s), 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (10 min). En algunos casos se realizó una digestión del ADN total previamente a la reacción de PCR, para lo cual se digirió 100 a 200 ng de ADN con 2 U de la enzima *EcoRI* en una reacción de 10 µl. Una vez digerido el ADN, se tomaron 5 µl para utilizarlos en la reacción de PCR.

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa a 1 y 1.2 % a 80-100 volts durante 30 a 60 minutos.

3 Resultados y Discusión

Se caracterizaron morfológicamente un total 60 cepas. Se observó una gran variabilidad morfológica que incluyó cepas que formaron camelia abierta, camelia en picos y algunas cepas con crecimiento algodonoso y cerrada; camelia cerrada, en picos; arrositada y concéntrica. No se observaron cambios en el color de la colonia, ni al reverso, tampoco en el medio nutritivo. La velocidad promedio de desarrollo fue de 14.5 días al llenado de caja y con un promedio de desarrollo de 3.4 cm. En la Figura 2, se presenta una fotografía de cinco formas diferentes observadas en las cepas de *P. cinnamomi*.

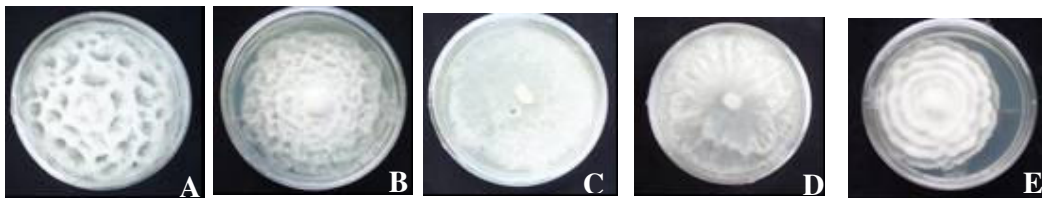


Figura 2, Característica morfológicas de cepas de *P. cinnamomi*. En picos algodonosa (A), arrositada (B), camelia sin formar la flor de camelia (C), camelia abierta formando la flor (D) y arrositada concéntrica (E)

Figure 2. Morphological characteristics of *P. cinnamomi* stumps. Cotton-like with sharp tips (A), rose-like (B), Camellia with no-camellia formation flower (C), open-camellia forming a flower (D) and concentric rose-like (E).

Amplificación de un fragmento de ITS 1 del ADNr con oligos conservados. Se obtuvo el ADN total de las 60 cepas de *P. cinnamomi* aisladas. Al utilizar los oligonucleótidos conservados ITS1 e ITS4 se obtuvo un amplicón de aproximadamente 900 pb (Figura 3A), sin embargo este par de oligonucleótidos únicamente permitió la amplificación de aproximadamente el 50 % de las reacciones, en diversas condiciones de amplificación ensayadas. Aunado a esto se evaluó la eficiencia de amplificación del juego de oligos Phy1 y Phy2, obteniendo un amplicón de aproximadamente 750 pb a partir de muestras de ADN de diez cepas (Figura 3B).

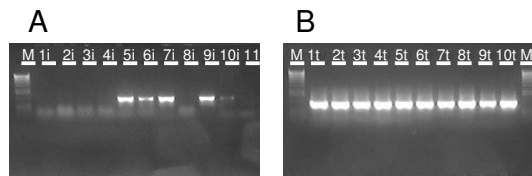


Figura 3. Amplificación de un fragmento del gen ribosomal de ADN nuclear ITS 1 de *P. cinnamomi*. Utilizando los oligonucleótidos conservados (ITS1 e ITS4) (A); Utilizando los oligonucleótidos Phy1 y Phy2 (B).

Figure 3. Amplification of a fragment of the nuclear ribosomal DNA ITS1 from *P. cinnamomi*. Using conserved primers (ITS1 AND ITS4) (A); using primers Phy1 and Phy2 (B).

En las restantes 50 cepas los amplicones presentaron aparentes variaciones ligeras en tamaño al resolverlos en un gel de agarosa (Figura 4). Se secuenciaron siete amplicones de diversos tamaños (Figura 4, carriles marcados con asterisco), las secuencias obtenidas presentaron una identidad máxima de 95 % con ITSs de *P. cinnamomi* de acuerdo a un análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

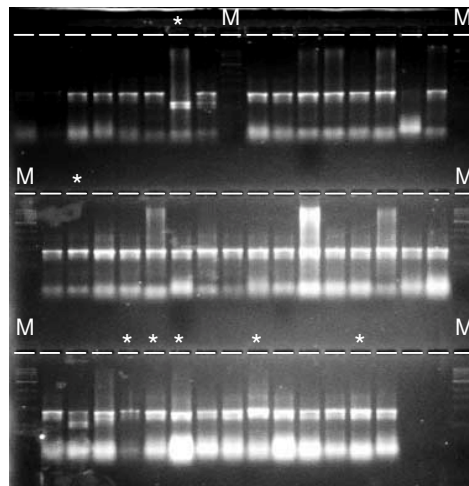


Figura 4. Amplificación de un fragmento del gen ribosomal del ADN nuclear ITS 1 de *P. cinnamomi*.

Figure 4. Amplification of a fragment of the nuclear ribosomal DNA ITS1 from *P. cinnamomi*.