

DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE DESARROLLO *IN VITRO* DE *Phytophthora parasitica* Dastur. EN AGUACATE “HASS”, EN LA ZONA AGUACATERA DE MICHOACAN, MEXICO.

C. Reyes-Amado¹ y L Morales-García²

1. Tesis de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH.

2. Profesor e investigador de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH. Paseo Lazaro Cárdenas Ezq Berlin s/n. Uruapan, Michoacán, México
Jluciano@prodigy.net.mx

El cultivo del aguacate prospera en diversas condiciones ecológicas del mundo. México ocupa el primer lugar como productor, en 1998 aportó el 69.2 % con un estimado de 2.3 millones de toneladas. Dentro de los problemas que afectan la producción de Aguacate destacan las enfermedades radicales como es el caso de la “Tristeza del Aguacatero causado por *Phytophthora cinnamomi*, que ocasiona daños del 8 al 15 % en plantaciones De síntomas similares a los ocasionados por *Phytophthora cinnamomi* se aisló a *Phytophthora parasitica* por lo que puede decir que este hongo causa síntomas similares a las de *Phytophthora cinnamomi* o bien esta asociado con *P. cinnamomi* en la sintomatología o de manera independiente causar síntomas similares, siendo el primer reporte de la presencia *P. parasitica* en aguacate en la región productora de aguacate en Michoacán, México. El presente trabajo tuvo el objetivo de determinar la temperatura *in vitro* de desarrollo de dos hongos de importancia económica por lo que se sometieron a siguientes temperaturas: 8 °, 14, 17, 21, 24, 28, 32, y 36 °C para los dos hongos.

Para *Phytophthora parasitica* a temperatura de 8° C no creció, la mejor temperatura fue de 24°C por el llenado en menos tiempo, seguido de 28 °, 21, 17, 32, y de 14 °C .A 36 °C no llenó la caja a pesar de que se dejó hasta 20 días.

También se aisló *Phytophthora parasitica* para inocular plantas de aguacate, la cual presentó los síntomas aproximadamente a los 30 días después de aparecer estos, las plantas quedaron totalmente defoliadas y por consiguiente la muerte.

TEMPERATURE DETERMINATION FOR OPTIMUM *IN VITRO* GROWTH OF *Phytophthora parasitica* Dastur. COLLECTED FROM ‘HASS’ AVOCADO IN MICHOACÁN, MEXICO

C. Reyes-Amado¹ and L Morales-García²

1. Tesis de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH.

2. Profesor e investigador de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH. Paseo Lazaro Cárdenas Ezq Berlin s/n. Uruapan, Michoacán, México
Jluciano@prodigy.net.mx

Avocado thrives under diverse ecological conditions, being Mexico the world’s top producer of this crop. In 1998, Mexico alone contributed with 69.2% of avocado world production, with a total estimate of 2.3 million tons. Among the several threats avocado production faces, root diseases are to be considered. Avocado root rot, caused by *Phytophthora cinnamomi* causes losses from 8% to 15% of avocado trees every year. The recently discovered *Phytophthora parasitica* causes symptoms similar to those caused by *P. cinnamomi* and might be

associated with the latter. This is the first report on *P. parasitica* as a root rot pathogen of avocado being present in the avocado-producing area of Michoacan, Mexico. This work was carried out in order to determine optimum temperature for *in vitro* growth of both *P. cinnamomi* and *P. parasitica*. Both fungi were exposed to 8°, 14°, 17°, 21°, 24°, 28°, 32°, and 36 °C. For *P. parasitica*, optimum and fastest growth was observed at 24 °C, followed by temperatures of 28°, 21°, 17°, 32°, and 14°C. Although *P. parasitica* was *in vitro* for 20 days, it could not fill the Petri plate at 36 °C; and it did not grow at 8°C. Healthy avocado plants were inoculated with *P. parasitica*, and about 30 days after inoculation, *P. parasitica* symptoms appeared on plants. Infected plants became totally defoliated and died soon after.

INTRODUCCIÓN. El cultivo del aguacate prospera en diversas condiciones ecológicas del mundo. México ocupa el primer lugar como productor de aguacate a nivel mundial con una aportación de 62 %. La superficie cosechada en México es de 100,000 has. Con una producción total estimada de 1, 100,000 ton (Ochoa, 2002) de los cuales el 85 % son cosechadas en Michoacán; en los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Tacambaro, Ario de Rosales, Salvador Escalante, Nvo. Parangaricutiro, Tingüindín, los Reyes, Tingambato, Ziracuaretiro y otros de lo cosechado, el 93 % se comercializa en el país y el resto en mercados internacionales, principalmente en Europa, Canadá, Japón y Estados Unidos (Morales y Ávila, 2002).

Este cultivo tiene además una gran importancia social, por su actividad se generan alrededor de 40,000 empleos directos y permanentes 25,000 empleos entre directos y estacionales y 60,000 estacionales por diversas actividades derivadas del proceso de la cadena productiva. Michoacán produce en promedio de 10 a 12 ton/ha., su potencial es de 20 a 30 ton/ha. sólo el 20 % de la producción reúne las características de calidad de exportación (Gutiérrez, 2004).

La expansión de este frutal en la región lo ha convertido en un monocultivo, situación que genera diversos problemas, entre ellos sobresale el alto costo de control fitosanitario. Hasta el momento, han sido detectados 25 microorganismos causantes de enfermedades, entre las que destacan las que atacan al sistema radicular (Morales y Ávila, 2002). *P. cinnamomi* causante de Tristeza del Aguacate afecta económicamente a muchos productores, esta enfermedad limita el desarrollo del árbol, reduce la producción y la calidad de la fruta y con ello incrementa los costos del cultivo, afecta directamente la rentabilidad (Mejía y Ramos, 2003).

Los factores ambientales que favorecen el desarrollo de los hongos son la temperatura, humedad relativa, lluvia, radiación solar, intensidad lumínica y viento, de los cuales los factores climáticos que influyen directamente en la liberación y dispersión de las esporas así como la severidad de los hongos son la temperatura y la lluvia. Por lo tanto es importante mediante el cultivo *in vitro* realizar un bioensayo que permita determinar la temperatura en la que se desarrollan mejor los patógenos que permitirá un manejo adecuado reduciendo el número de aspersiones y la cantidad de agroquímicos así como los daños ecológicos.

OBJETIVOS: Determinar la temperatura óptima de desarrollo de *Phytophthora parasitica*, *in vitro*.

HIPÓTESIS: Es posible mediante el cultivo in vitro, calcular las diferentes temperaturas en las que *Phytophthora parasitica* se desarrollan, bajo condiciones de laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA. Debido a las condiciones presentes en la región productora del estado de Michoacán el cultivo del aguacate presenta problemas que limitan la producción y comercialización tales como: mal manejo de podas, malos riegos, aspersiones inadecuadas en las plantaciones, daños de plagas y enfermedades en pre y postcosecha, poca organización entre los productores para la comercialización, introducción al mercado de fruta chica, así como el corte antes de su madurez fisiológica (Ortiz, 1998).

Las enfermedades que atacan al aguacate afectan la producción en un 40 % y ocupan un renglón importante por el número, intensidad y como factor que incrementa costos de producción, ya que se requiere de 6 a 7 aplicaciones de pesticidas para su control acompañado por prácticas culturales y de manejo. De las enfermedades que se consideran de importancia económica por afectar la calidad y la cantidad de la cosecha, se encuentra la Antracnosis, Roña, Anillamiento del pedúnculo, Tristeza del Aguacate y las enfermedades de postcosecha (Vidales, 1994, Morales 1997 y Kido 1997. Citado por Ortiz, 1998).

La Tristeza del Aguacate ha tomado importancia en la mayoría de los países productores de aguacate, ya que se encuentra presente casi en todos ellos, causando gastos para su prevención y tratamiento. La podredumbre de raíz del aguacatero, como el llamado entre algunos países adquiere interés por los daños que causa, desde la disminución en rendimiento, pérdida de árboles e incluso de huertos y de zona productoras. Afecta económicamente a muchos productores de aguacate que se encuentran con este problema porque limita el desarrollo del árbol, reduce la producción y la calidad de fruta, y con ello incrementando los costos del cultivo, en afcción directa a la rentabilidad (Mejía y Ramos, 2003).

Es una de las enfermedades más importantes y devastadoras en el mundo. En México, el hongo se ha detectado en las zonas aguacateras de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit y Morelos (Mora *et al.*, 2000). El primer escrito que describe a *Phytophthora* se acredita a Rands, en 1922 quien lo aisló de canchales de canela en Sumatrá, se reporta como habitante del suelo, se desarrolla en las raíces y base del tallo, ataca a más de 850 hospederos, tales como: aguacate, piña, pino, ciprés, coníferas, durazno, encino, macadamia, papaya, eucalipto, azalea. En Michoacán se encuentra en áreas localizadas en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tinguindin, Tacambaro, Los Reyes y Ziracuaretiro (Mejía y Ramos, 2003).

Pudre las puntas de las raíces con diámetro menor de 5 mm y produce una coloración café negruzca. Las raíces dañadas se quiebran fácilmente. La absorción de agua y su transporte ascendente se reducen y este es el origen de los síntomas en el follaje. Incluso es interesante observar que los árboles con tristeza tienen más agua en su alrededor que los árboles sanos, debido a que esa agua no es adsorbida por las raíces, enviada hacia arriba y transpirada por las hojas. Cuando el árbol pierde más agua por la transpiración que la absorbida por un sistema radical podrido por el hongo, empieza a mostrar los síntomas de marchitamiento de hojas o tristeza. La falta de agua en la planta, afecta la capacidad de las

hojas para formar la clorofila y por tanto causa la clorosis y amarillamiento del árbol. Las hormonas que controlan la caída de las hojas también se afectan por la deficiencia de agua y esto causa la caída prematura de hojas. El fruto que se infecta por salpique del agua o contacto con el suelo infectado presenta una pudrición firme de coloración café o negra (Mora *et al.*, 2000).

La nutrición del árbol se afecta; el nitrógeno se incrementa en los tejidos se detiene el movimiento del fósforo, hacia los tejidos y se afecta la absorción de magnesio, cobre, hierro. Estos problemas nutrimentales causan amarillamiento, follaje escaso y aborto de frutitos. Los árboles pierden progresivamente su vigor con el avance de la enfermedad, cuando están próximos a morir producen gran cantidad de frutos pequeños que son generalmente abortados antes de llegar a su madurez. En ataques severos el árbol muere (Mora *et al.*, 2000).

El patógeno no prospera a menos de 7.5°C y más de 28.5°C, pero bajo condiciones óptimas de humedad y temperatura, los esporangios se producen con abundancia y liberan gran cantidad de zoosporas (Mejía y Ramos, 2003).

El hongo sobrevive en el suelo por varios años en forma de abundantes clamidosporas en raíces o residuos de aguacate y de otras plantas cultivadas o en la maleza.

Las clamidosporas actúan como “semillas” de propagación y son resistentes a condiciones adversas al medio ambiente como sequía, temperaturas bajas, falta de alimento; cuando la temperatura sube y hay humedad excesiva por efecto de riegos pesados, abundante lluvia, por inundaciones, mal drenaje, las clamidosporas germinan dando origen al micelio. El micelio origina otras estructuras que son los esporangios que contienen en su interior un tipo de semillas llamadas zoosporas; tienen un movimiento propio se desplazan con agilidad sobre la superficie del agua e infectan raíces nuevas (Mora *et al.*, 2000)

Factores ambientales que favorecen el desarrollo de hongos son la temperatura, humedad, luz, nutrientes y el pH del suelo. Sus efectos en las enfermedades son el resultado de su influencia sobre el desarrollo y la susceptibilidad del hospedero, sobre propagación y actividad el patógeno o sobre la interacción entre ambos y de su efecto sobre el desarrollo de los síntomas de la enfermedad (Gutiérrez, 2004). *Phytophthora sp.* no prospera a menos de 7.5 °C y más de 28.5 °C, pero bajo condiciones óptimas de humedad y temperatura, los esporangios se producen con abundancia y liberan gran cantidad de zoosporas; al disminuir la temperatura 24 °C estas se diseminan a través del agua, causando una mayor infección (Mejía y Ramos, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS. El experimento se desarrollo en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicado en Uruapan, Michoacán.

Se tomaron muestras de raíz con síntomas de *Tristeza* en el huerto denominado “Zirapondiro” del municipio de Tancítaro misma que se ubica geográficamente entre los paralelos 19°21´ de latitud Norte y a los 102° 22´ de longitud Oeste del meridiano de

Grenwich, con una altitud de 3,342 msnm. El clima es subhúmedo, con influencia de frío de montaña presenta lluvias en verano. La precipitación varía alrededor de los 1600 mm anuales, concentrados en los meses de Junio a Octubre. El suelo es profundo, con buen drenaje, buena aireación, su pH es ligeramente ácido variando alrededor de 6.2, la temperatura media varia de 18.6 a 19.9 °C (Correa, 2003).

Se procedió a la siembra del material colectado para lo que se utilizaron raíces y frutos que presentaban síntomas característicos de estas enfermedades. Cada muestra fue lavada con agua y jabón para eliminar restos indeseables, se seleccionó el tejido dañado y con la ayuda de navaja y aguja de disección, la raíz se corto en secciones aproximadamente 2 mm de longitud. En cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA se depositaron cinco muestras dispuestas en cinco de oros bajo condiciones asépticas, las cajas fueron selladas individualmente con papel Kleen pack, se etiquetaron y colocaron en una incubadora a temperatura media de 20 °C.

La purificación e identificación del agente causal se realizó después de 3 a 4 días de la siembra de las muestras colectadas, las cajas Petri presentaban un desarrollo adecuado de colonias fungosas, se hizo una purificación sacando una porción del micelio en desarrollo dentro de la caja Petri y se colocó en otra con medio puro con el objeto de mantener la pureza del mismo. Una vez que se obtuvieron las colonias puras, se procedió a su identificación, se realizaron preparaciones fijas del micelio obtenidas de las cepas puras, en lactofenol azul para su observación en el microscopio compuesto. Para montar las preparaciones fijas se colocó una gota de lactofenol azul en el centro de un portaobjetos, depositando en está una muestra de micelio extraído bajo condiciones asépticas de una caja Petri invadida totalmente por los hongos causantes de la Tristeza del Aguacate, se cubrió la preparación con cubreobjetos, ayudándose con una aguja de disección para evitar la formación de burbujas; cubiertas las muestras se sellaron con barniz de uñas transparente y se procedió a la identificación realizando comparaciones con las claves de (Barnett 1972 y Frezzi 1950).

Se evaluó la temperatura óptima de crecimiento *in vitro* del hongo causante de la Tristeza del Aguacatero. En cajas que contenían PDA se sembraron discos de 5 mm de diámetro extraídos de cepas puras, se colocaron en el centro de la caja Petri, se sello con papel Kleen pack, se etiquetó y se sometió a diferentes temperaturas; 8, 14, 17, 21, 24, 28, 32 y 36 °C; con cinco repeticiones por cada temperatura, utilizando un diseño experimental completamente al azar, la unidad experimental fue una caja Petri; las muestras sometidos a 21, 24, 28, 32 y 36 °C se mantuvieron en incubación hasta que el hongo llenara la caja Petri. Las muestra sometidos a temperaturas mas bajas 8, 12, 14 y 17 °C se mantuvieron en refrigerador. Para la evaluación del efecto temperatura/crecimiento, se midió diariamente el desarrollo del hongo hasta el llenado de la caja Petri utilizando un vernier.

Las pruebas de patogenicidad. se realizaron inoculando el patógeno en plantas sanas previamente cultivado *in vitro* y así tener una solución de esporangios, la cual fue vertida sobre la tierra de cada bolsa de las plantas de aguacate. Para la esporulación de esporangios se utilizó extracto de suelo, el cual se preparó utilizando suelo extraído cerca de las raíces del árbol de aguacate. En 10 mL de agua destila destilada estéril se agregaron 5 g de suelo y se dejaron reposar 24 hr. Posteriormente en cajas Petri se colocaron 5 rodajas

con micelio del hongo, se vertió el agua de suelo con la finalidad de favorecer la formación de esporangios de *Phytophthora*.

RESULTADOS. El aislamiento del patógeno de la Tristeza del Aguacate, se logro en medios de cultivo PDA a partir de raíces infectadas colectadas en los huertos. Los aislamientos fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio

El hongo presentó micelio cenocítico con clamidosporas, colonia micelial en caja Petri de color blanco con aspecto estrellado, algodonoso; esporangióforos simples. Freís (1959), los esporangios no se producen en medio sólido, pero en extracto de suelo se producen con abundancia de forma ovoides, oval

Pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate éstas presentaron los primeros síntomas que caracterizan a la enfermedad a los 30 días de ser inoculadas, con un secamiento de las hojas, ramas de forma descendentes, hasta quedar totalmente desfoliada. Aislándose nuevamente el patógeno de las raíces de aguacate.

Las características que presentó el patógeno aislado de árboles con síntomas de tristeza y que dio positivo en las pruebas de patogenicidad no coincide con las estructuras reportadas para *Phytophthora cinnamomi*, por lo que se recurrió a claves de especies de *Phytophthora*. De acuerdo con las estructuras encontradas, el patógeno en estudio corresponde a "*Phytophthora parasitica*" lo que nos hace pensar que este hongo causa los mismos síntomas que *Phytophthora cinnamomi*, o bien pudiera estar asociado. Estos resultados son de gran importancia ya que sería el primer reporte de la presencia de *Phytophthora parasitica* en la región causando daños en árboles de aguacate, por lo que sería necesario realizar más estudios para su confirmación y tomar en cuenta esta información para el manejo de la enfermedad.

Desarrollo de *Phytophthora parasitica*. Las pruebas de patogenicidad para determinar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de *P. parasitica*, en medio de cultivo PDA, se obtuvo un mejor crecimiento cuando se incubó a temperatura de 24 °C llenando la caja a los 9 días, mostrando diferencia significativa aun con tratamientos con temperaturas cercanas a estas (28° y 21 °C) que llenaron la caja Petri en 10 y 12 días respectivamente. A temperatura de 8 °C no mostró ningún desarrollo después de haber sido sembrado el patógeno se inhibió cuando se sometió a tratamientos de temperatura de 36 °C ya que no alcanzó a cubrir la caja Petri, por lo que coincide con Ramos y Mejía (2003), quienes mencionan que *Phytophthora* sp no prospera a menos de 7.5° y más de 28.5 °C en campo. se efecto su crecimiento cuando se incubó a temperatura de 14 °C, 17, 32 °C ya que el patógeno tardó en llenar la caja Petri (24, 21, y 20 días respectivamente).

CONCLUSIONES. De acuerdo con los resultados obtenidos de este estudio se concluye: Se identificó a *Phytophthora parasitica* causando síntomas similares a los de *Phytophthora cinnamomi*, lo que constituye el primer reporte en la de este patógeno en el cultivo del Aguacate. En las pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate inoculadas con *P. parasitica* se obtuvieron síntomas a los 30 días de la aplicación del patógeno. La temperatura

óptima de desarrollo de *P. parasitica* fue de 24°C al llenar la caja Petri en menos tiempo seguido de 28°, 21 °C., el crecimiento se vio afectado cuando se incubó a temperatura de 8° y 36°C.