

## **MICROPROPAGACIÓN Y PRUEBAS DE RESISTENCIA *IN VITRO* A *Phytophthora cinnamomi* DE MATERIALES DE AGUACATE RAZA MEXICANA**

R. López-Gómez<sup>1</sup>, M.A.Cortés-Rodríguez<sup>1</sup>, P.C. Herbert-Moreno<sup>1</sup>, J. de la Luz Sánchez-Pérez<sup>1</sup>, I. Vidales-Fernández<sup>2</sup>, S. Fernández-Pavía<sup>3</sup>, A. García-Chávez<sup>1</sup> y R. Salgado-Garciglia<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, CP 58060 Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México. Tel-Fax: (55) 443 3 26 57 88, Correo electrónico: lgomez@zeus.umich.mx

<sup>2</sup>Lab. de Biotecnología Vegetal, INIFAP Campo Exp. Uruapan, Ave. Latinoamericana, Uruapan, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, La Posta-Veterinaria, Morelia, Michoacán, México.

Del banco de germoplasma de aguacate raza Mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), en INIFAP Uruapan, se han seleccionado varios materiales (genotipos) mejorados por medios biotecnológicos, seis de ellos con supuesta resistencia al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* que requieren ser caracterizados y evaluados para determinar sus niveles de resistencia y propagarlos asexualmente. Es por ello que en el presente trabajo se planteó evaluar la resistencia de estos materiales de aguacate criollo contra *P. cinnamomi*, mediante bioensayos *in vitro*. Para la evaluación de los materiales se establecieron cultivos *in vitro* a partir de la siembra de yemas axilares y apicales de varetas, siguiendo los protocolos de asepsia, regeneración de brotes y enraizado de éstos, reportados previamente. Para determinar la resistencia, las plántulas *in vitro* fueron sometidas al ataque del oomiceto, con la aplicación de segmentos de micelio con clamidosporas en el sistema radical. El número de brotes y de raíces en cada genotipo de aguacate fue optimizado por modificación en las dosis de benciladenina y ácido indolbutírico, consiguiendo 5 brotes/explante en promedio para cada material y hasta tres raíces por brote. De los 6 materiales probados, solamente las accesiones JSP755 y JSP3 mostraron resistencia a la infección *in vitro* por *P. cinnamomi*, no detectando síntomas de caída de hojas (defoliación) ni proliferación de micelio en tejido vascular radical, lo cual se observó en los otros 4 materiales.

Palabras clave: *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*, oomiceto, tristeza del aguacatero.

## **MICROPROPAGATION AND *IN VITRO* RESISTANCE TESTS AGAINST *Phytophthora cinnamomi* OF MEXICAN-RACE AVOCADO GENOTYPES**

R. López-Gómez<sup>1</sup>, M.A.Cortés-Rodríguez<sup>1</sup>, P.C. Herbert-Moreno<sup>1</sup>, J. de la Luz Sánchez-Pérez<sup>1</sup>, I. Vidales-Fernández<sup>2</sup>, S. Fernández-Pavía<sup>3</sup>, A. García-Chávez<sup>1</sup> and R. Salgado-Garciglia<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, CP 58060 Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México Correo electrónico: lgomez@zeus.umich.mx

<sup>2</sup>Lab. de Biotecnología Vegetal, INIFAP Campo Exp. Uruapan, Ave. Latinoamericana, Uruapan, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, La Posta-Veterinaria, Morelia, Michoacán, México.

From the germplasm bank of Mexican-race avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) in INIFAP Uruapan (Michoacán, Mexico), several materials (genotypes) grown by biotechnological means have been selected, 6 of them have high potential resistance to the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. These materials are required to be characterized and evaluated to determine their resistance levels to the infection and propagate them asexually. For this reason, an evaluation for the resistance of these avocado materials against *P. cinnamomi*, using *in vitro* bioassays, was proposed. To evaluate these materials, *in vitro* cultures were established as from axillary and apical buds, following aseptic protocols, shoot regeneration and rooting protocols previously reported. In order to determine the resistance, *in vitro* plantlets were submitted to an oomycete attack with the application of mycelia segments with chlamidospores in the radical system. The number of buds and roots in each avocado genotype was optimized by modifying the doses of benzyladenine and indolebutyric acid, obtaining an average of 5 shoots per explant and up to 3 roots per bud. From the 6 genotypes tested, only accessions JSP755 and JSP3 showed resistance to *in vitro* infection by *P. cinnamomi*. These materials did not show any defoliation symptoms or proliferation of mycelia in radical vascular tissue.

KEY WORDS: *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*, oomycete, avocado root rot.

## 1 Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es en la actualidad uno de los cultivos más importantes en México, no solo por la cantidad de toneladas producidas, sino también porque es un cultivo que genera miles de empleos directos e indirectos y permite una alta entrada de divisas por la exportación de su fruto. Un árbol comercial de aguacate se compone de dos materiales vegetales, uno llamado portainjerto sobre el cual se injerta el otro llamado variedad (var.) o cultivar (cv.). De esta manera, el productor enfrenta dos tipos de problemas diferentes cuando de problemas fitosanitarios se trata, unos que afectan solo al portainjerto y otros que afectan solamente a la variedad injertada. Con el objeto de evitar la pérdida de árboles en huertos de aguacate, las tecnologías desarrolladas se han enfocado a la propagación homogénea de los materiales, a su conservación (*in situ*) y en lo referente al mejoramiento genético tradicional, se han buscado primeramente la manera de identificar materiales con características agronómicas importantes, para utilizarlos como portainjertos de variedades comerciales de aguacate. Los materiales criollos de cualquier especie vegetal son fuente de riqueza genética para el estudio, aislamiento e identificación de genes útiles para la generación de nuevas variedades.

El aguacate presenta enfermedades severas que en casos extremos provocan la muerte del árbol y en general, una disminución en la producción que varía del 10

al 40%, y una reducción en la calidad del fruto entre un 15 y 30%. La tristeza del aguacatero o pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands es una de las enfermedades más destructivas en los huertos de aguacate en todo el mundo y ha sido el factor económicamente limitante a la producción en países tales como Australia, México, Sudáfrica y los EUA, y otros setenta países (Sánchez-Pérez, 2001).

Debido a la existencia de un banco de germoplasma de aguacate criollo, en INIFAP Uruapan, y a que se cuenta con varios materiales mejorados por medios biotecnológicos, se han seleccionado 6 con supuesta resistencia al oomiceto *P. cinnamomi* que requieren ser caracterizados y evaluados, para seleccionar los resistentes y determinar sus niveles de resistencia.

Es por ello que en el presente trabajo se planteó evaluar la resistencia de estos materiales de aguacate criollo contra el oomiceto *P. cinnamomi*. La evaluación de los materiales se realizó con plántulas regeneradas *in vitro* por el cultivo de yemas axilares y apicales de las plantas en estudio, para lo cual se establecieron las condiciones de micropropagación. Las plántulas fueron sometidas al ataque del oomiceto, con la aplicación de segmentos de micelio con clamidosporas en el sistema radical para determinar la resistencia, seleccionando uno de los seis materiales, como resistente al ataque de *P. cinnamomi*, por no mostrar los síntomas visuales de marchitamiento y proliferación de micelio en tejido radical al ser inoculado.

## 2 Materiales y metodos

2.1 *P. cinnamomi* fue aislado de raíces necróticas de un árbol de aguacate raza mexicana injertado con el cultivar Hass, con síntomas de tristeza, ubicado en un huerto comercial de la zona aguacatera de Uruapan, Michoacán, México. El aislado fue caracterizado e identificado según claves establecidas.

Las accesiones de aguacate criollo JSP064, JSP755 y JSP3, son del banco de germoplasma de INIFAP-Uruapan, Michoacán, México; los materiales UV31, UV62 y UV78 fueron seleccionados con potencial resistencia a *P. cinnamomi* en trabajos previos y se mantienen bajo cultivos *in vitro* (Hernández-García, *et al.*, 2005).

2.2 Cultivos *in vitro*.- El establecimiento de los cultivo *in vitro* de las accesiones JSP064, JSP755 y JSP3 se realizó con el método de asepsia reportado por Vidales (2002), cultivando las yemas en el medio nutritivo MS (Murashigue y Skoog, 1962) con 0.3 mg/l de BA (benciladenina), después de 45 días se subcultivaron los brotes regenerados en medio MS con BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.5 mg/l) y AIB (ácido indol-3-butírico) (0.1, 0.2 y 0.5) mg/l para lograr la multiplicación clonal de cada accesión. El enraizado de éstos se obtuvo al cultivarlos en medio MS con 0.4 mg/l de AIB. Todos los cultivos se realizaron a 25°C y 16 h de luz ( $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Para los estudios requeridos en esta investigación se obtuvieron 10 plántulas para cada material.

2.3 Ensayos de inoculación *in vitro*.- Cada plántula mantenida en condiciones de cultivo *in vitro* (90 días de edad) se inoculó con 10 mL de una suspensión de micelio ( $1 \times 10^3$  clamidosporas/mL) obtenido de cultivos en medio líquido Papa-Dextrosa-V8 clarificado, por 24 h, en condiciones de asepsia. Posteriormente las plántulas tratadas fueron colocadas sobre papel filtro estéril para quitar el exceso

de agua e inmediatamente cultivadas *in vitro* en medio agar-agua (6 g/L agar) a 25°C ( $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 8 días. Las plantas testigo se trataron con 10 mL de agua estéril, el experimento se realizó con 6 réplicas para cada accesión o material en estudio.

2.4 Determinación de síntomas.- El efecto de la inoculación se evaluó determinando la proporción de raíces podridas, síntomas de la enfermedad (marchitamiento, clorosis y necrosis parcial o total de las hojas), así como los porcentajes de mortalidad. Los tratamientos se distribuyeron en forma completamente al azar con seis repeticiones y se consideró la plántula como unidad experimental.

### 3 Resultados y discusión

La proliferación de brotes fue optimizado para cada uno de los materiales de aguacate criollo mexicano, consiguiendo hasta 5 brotes por explante. Los materiales JSP064 y JSP3, respondieron con un mayor número de brotes en MS con 2.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de AIB; JSP755 en MS con 2 mg/L de BA y 0.2 mg/L de AIB; los materiales UV31, UV62 y UV78, en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de AIB. La brotación en estos materiales inició a los 30 días del cultivo con la producción máxima a los 90 días, datos que coinciden con los reportados por Vidales (2002). Todos los brotes enraizaron con hasta 3 raíces/brote en MS con 0.4 mg/l de AIB, consiguiendo con ello la formación de plántulas de los 6 materiales bajo estudio.

Plántulas de 90 días de cultivo *in vitro*, con 5 cm de altura, de dos a 4 hojas y con 3 raíces, fueron expuestas a la suspensión con clamidosporas de *P. cinnamomi* y a los 8 días de cultivo *in vitro* en agar-agua se observaron los síntomas para determinar resistencia de los diferentes materiales al patógeno. Los resultados mostraron que las plántulas de los materiales JSP755 y JSP3 no mostraron síntomas de la enfermedad, aún cuando hubo proliferación de micelio en el medio de cultivo. Estas plántulas fueron transplantadas a suelo a los 10 días del cultivo y durante su aclimatación (45 días en cámara húmeda) no mostraron síntomas de marchitamiento ocasionados por *P. cinnamomi*.

Sin embargo, las plántulas de los materiales JSP064, UV31, UV62 y UV78, presentaron 100% de mortalidad a los 15 días de cultivo *in vitro* después de la inoculación. Los síntomas principales fueron amarillamiento, epinastia y caída de las hojas, así como pudrición de raíz. Esto último fue comprobado con observación en microscopio óptico (20x), detectando en ellas la proliferación de micelio, indicativo de que los síntomas son debidos a la invasión del oomiceto.

En plantas testigo (no inoculadas) el porcentaje de pudrición de raíces fue en un 10% en promedio y en un 12.5% en los materiales que resistieron al ataque de *P. cinnamomi*. La pudrición observada en plantas testigo y consideradas resistentes, se debió posiblemente a la anoxia parcial de las raíces ocurrida durante el período de inoculación.

### 4 Conclusiones

La inoculación de las plantas *in vitro* fue eficiente en todos los parámetros evaluados, sobre todo en las susceptibles al oomiceto, debido a la presencia de *Phytophthora cinnamomi* en las raíces, lo cual desencadenó la enfermedad. Pero también para poder caracterizar la resistencia de materiales como ocurrió para

las plántulas de las accesiones JSP755 y JSP3. Las plántulas de estos materiales se mantienen bajo cultivo en invernadero para realizar las pruebas de resistencia bajo cultivo en suelo y comprobar la resistencia.

#### 5 Bibliografía

Hernández-García A., Vidales-Fernández I., López-Gómez R. y Salgado-Garciglia R. 2006 Mutagénesis *in vitro* en aguacate criollo raza Mexicana para selección de genotipos resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. 1ª. Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. 4-8 Sept., Mérida, Yucatán, México.

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 443-497.

Sánchez-Pérez J. de la L. 2001. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México.

Vidales F. I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento para la regeneración *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.): Embriogénesis somática y organogénesis. Tesis Doctoral, Universidad de Colima. 115p.

