

## Desarrollo de un protocolo de infección en raíz para cuantificación de resistencia genética a *Phytophthora cinnamomi*, en aguacate

E. Rodríguez Polanco<sup>1</sup>, N. Murcia Riaño<sup>2</sup>, M. Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. C.I Nataima, Espinal, Colombia.

<sup>2</sup>. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. C.I Palmira, Palmira, Colombia

### RESUMEN

La pudrición de la raíz causada por el oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands es el principal problema fitosanitario para la producción de aguacate en Colombia, ocasionando pérdidas entre el 30 y 50 % de las plantas en vivero y los primeros años de establecimiento del cultivo. El control de esta enfermedad ha tenido un éxito limitado, donde la resistencia genética de los portainjertos se vislumbra como la estrategia más eficaz. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo estandarizar un protocolo de infección en raíz con *P. cinnamomi* en patrones de aguacate para su aplicación como herramienta en la cuantificación de resistencia genética en patrones comerciales. Un experimento en vivero en plantas de aguacate Hass de 2 meses de edad provenientes de semilla fue establecido para determinar la dosis infectiva del patógeno y el método de inoculación a la raíz que reproduzca los síntomas de la enfermedad. Semillas de aguacate Hass fueron desinfectadas y germinadas en arena estéril, pasados 20 días después de la emergencia (DDE) trasplantadas a bolsas conteniendo sustrato estéril (turba, cascarilla de arroz, vermiculita y arena) en proporciones de 3:1:1/2:1/2 respectivamente. Micelio crecido granos de trigo estéril del aislamiento ARFRE-008 previamente caracterizado como virulento fue empleado como inóculo. Las dosis de inóculo evaluadas correspondieron a 1, 2, 3, 5 gr por kg de sustrato, la mitad de la dosis del inóculo fue aplicada al sustrato al momento del trasplante a la bolsa y la otra mitad una vez las plantas alcanzaron los 60 DDE. El tratamiento de herida a la raíz también fue realizado en el momento del trasplante a bolsa. Los síntomas foliares fueron evaluados a los 8, 15 y 60 días después del trasplante a bolsa y categorizados de acuerdo con la escala de Gabor y Coffey (1991). Los síntomas en raíz como porcentaje del daño visual, técnica línea intercepto, materia seca y porcentaje de recuperación de *P. cinnamomi* fueron evaluados a los 60 después del trasplante a bolsa. El ensayo fue establecido en un diseño de bloques completos al azar (DBCA), con arreglo factorial 2X4 (factor A = raíz con o sin herida y factor B= dosis de inóculo), con tres repeticiones y 9 plantas por unidad experimental, cada repetición tuvo su correspondiente testigo absoluto. Los datos fueron sometidos análisis de varianza y las medias comparadas por el test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Los resultados permiten concluir que la dosis de 5 gr de inóculo es la más adecuada para reproducir los síntomas de la enfermedad y la herida en la raíz no tuvo efecto en el desarrollo de los síntomas foliares, pero si en los síntomas y desarrollo radicular.

Palabras claves: *Phytophthora cinnamomi*, *Persea americana* L., Resistant rootstock.

### INTRODUCCIÓN

La causa de la pérdida de árboles de aguacate en diferentes etapas del cultivo es debida principalmente a la marchitez, enfermedad causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, Oomiceto perteneciente a la familia *Pythiaceae*, que afecta plantas de cualquier edad, causando marchitez de raíces y cáncer en el tallo (Andrade, 2012), ocasionando así la disminución en la productividad y longevidad de cultivos establecidos, lo que ha conducido a problemas sociales en las regiones que tienen el cultivo de aguacate como fuente de sustento (Durán Barón y Daza, 1999, citado por Jaramillo et al, 2009). En Colombia la identificación de materiales promisorio de aguacate por resistencia a este hongo, inicio previamente con la colecta de material criollo observado como resistente en zonas de alta presión de inóculo y un trabajo de ajuste de una metodología de inoculación por herida al tallo para la cuantificación de resistencia a *P. cinnamomi* (Ciat, 2009; Jaramillo, 2009). Por tanto este trabajo de investigación tiene como objetivo, el desarrollo de un protocolo de infección no invasivo que reproduzca de forma similar el proceso infeccioso de la raíz, permitiría estimar con mayor confiabilidad los niveles de resistencia a *P. cinnammomi* en plantas de aguacate, es así como este producto se orienta al ajuste de este protocolo, promocionando así, una herramienta que permitirá cuantificar con mayor precisión el nivel de resistencia a este patógeno en materiales nativos y foráneos apoyando el desarrollo de programas de mejoramiento genético futuros focalizados a identificar materiales con niveles superiores de resistencia. Durante el desarrollo de este producto parcial se estandarizaron metodologías de aislamiento, purificación, conservación, incremento de inóculo, protocolo de infección por herida al tallo y una prueba preliminar de inoculación artificial en raíz de *P. cinnamomi*, aunque debido al corto tiempo en que se desarrolló esta investigación se plantean resultados preliminares en el ajuste de este protocolo, es necesario la continuidad de esta investigación.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento del patógeno a partir de raíces afectadas y suelo:** Para el aislamiento del patógeno, se recibieron muestras de suelo y raíces procedentes de árboles con síntomas de la enfermedad en campo de los departamentos de Antioquia, Cauca, Cesar, Guajira, Huila, Tolima, Risaralda, Santander y Valle del Cauca (Figura1). El aislamiento de raíz, se realizó de tejido interno con síntomas, que fue desinfectado con hipoclorito al 1% y alcohol al 96%. Segmentos de raíz fueron sembrados en cajas de Petri con medio selectivo PDA+ antibióticos y fungicidas (39 g PDA, Ampicillin 5000 µg/L, Penicillin 8000 µg/L, Rifampicin 200 µg/L, PCNB 4000 µg/L, Benlate 400 µg/L, Hymexazol 5000 µg/L, Vancomycin 5000 µg /L, Polimycin 5000 µg/L, Merteck 300 µl). Para aislamiento a partir de suelo, se empleó la técnica de trampa con manzana verde. Las manzanas fueron desinfectadas previamente con alcohol del 96% e hipoclorito al 1%, se lavaron con agua destilada estéril, en cámara de flujo laminar, se introdujo una pequeña porción del suelo en el orificio formado con un sacabocados, finalmente las manzanas se colocaron en una cámara húmeda por tres días, hasta la aparición de necrosis del tejido de la superficie aladaña al orificio. El aislamiento a partir de suelo fue realizado también por la técnica de trampa en fragmentos de hoja de aguacate, fragmentos de 5 mm<sup>2</sup> fueron desinfectados con alcohol del 96% e

hipoclorito al 1%, se lavaron con agua destilada estéril e inmersos en una solución acuosa al 20% de suelo infectado con *P. cinnamomi*, durante 6 días en oscuridad. Los fragmentos fueron desinfectados nuevamente y sembrados en medio PDA+ antibióticos y fungicidas.



Figura 1. Síntomas en raíz de aguacate causados por *P. cinnamomi*, nótese el enrojecimiento del tejido.

Purificación y crecimiento en medio de cultivo: Los aislamientos de *P. cinnamomi* seleccionados por morfología de colonia, fueron purificados de bacterias, sembrándolos en cajas Petri que contenían solo la mitad de la caja con medio PDA+ antibióticos y fungicidas. Fragmentos de micelio con crecimiento del hongo fueron frotándose zig-zag por el área donde no había medio PDA+ antibióticos y fungicidas y colocados cerca al medio de cultivo para favorecer el crecimiento aéreo del oomicete e inhibir el crecimiento superficial de las bacterias. De igual manera el crecimiento de otro oomicetos como *Pythium* sp fue inhibido por repique de *P. cinnamomi* en PDA con Hymexazol (Tachigaren). Los aislamientos se conservaron en incubadora a 24°C por dos días, posteriormente se realizaron observaciones macroscópicas de colonia y microscópicas de estructuras para garantizar la pureza de los aislamientos. En algunos casos fue necesario reaislar de tejido o suelo para eliminar la contaminación principalmente por *Pythium* sp y bacterias.

**Identificación y caracterización de *Phytophthora cinnamomi*:** La identificación de *P. cinnamomi*, se realizó por caracterización morfológica macroscópica de crecimiento de la colonia (forma de roseta y tipo petaloide) y microscópica de las estructuras vegetativas y reproductivas (hifas coraloide, clamidiosporas globosas), (Drenth & Sendall, 2001), Figura 2.

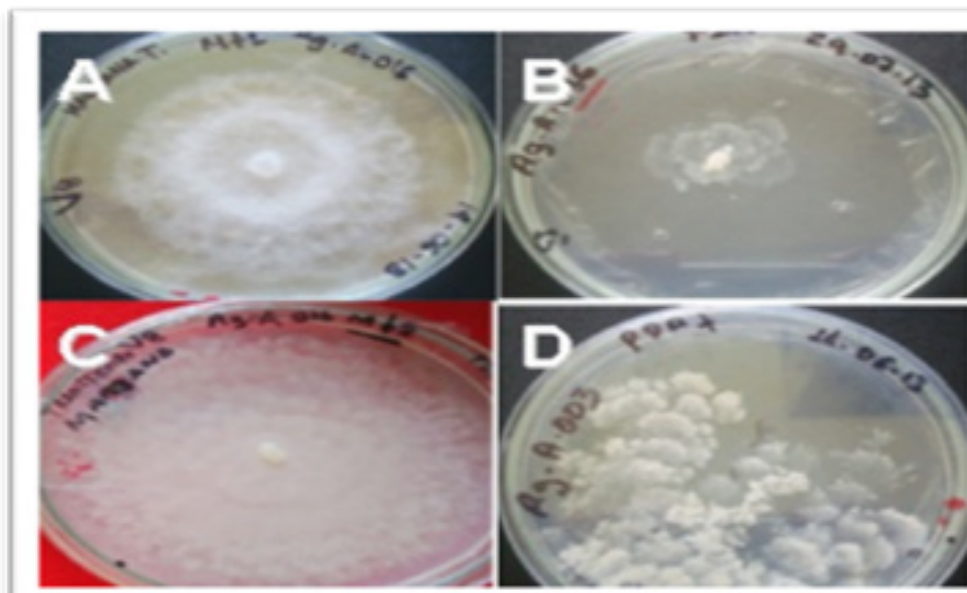


Figura 2. Crecimiento típico de una colonia de *P. cinnamomi*. A. Medio V8. B. Medio PDA. C y D. Medio PDA + Antibióticos y fungicidas.

**Conservación de los aislamientos de *P. cinnamomi* en laboratorio:** Los aislamientos puros y multiplicados en medio Agar-Avena se conservaron en tubos Eppendorf de 2 ml que contenía agua destilada estéril, en cada tubo se depositaron 10 discos de medio con crecimiento del hongo de 5 mm de diámetro, los tubos fueron sellados, rotulados y guardados a temperatura ambiente, sin exposición directa de luz (Figura 5).

**Multiplicación de micelio de *P. cinnamomi*:** La multiplicación de micelio de los aislamientos de *P. cinnamomi*, se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Drenth & Sendall (2001), con algunas modificaciones, 40 gr de avena o cebada en grano por separado se depositaron en botellas de vidrio en beaker de 200 ml previamente esterilizados. Se adicionaron 40 ml de agua destilada en cada uno y fueron selladas con papel aluminio. La semilla se dejó en remojo por 12 horas. Posteriormente el exceso de agua retiro y los beaker fueron esterilizados en autoclave a 121°C

y 21 lb de presión durante 30 minutos. Este proceso fue realizado dos veces. Cada beaker con el medio respectivo Trigo o avena, fue inoculado con 10 trozos de micelio de cada cepa, se sellaron y se conservaron en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente.

**Plantas de aguacate** de las variedades Hass, Anisado y Alvarado (semilla) fueron adquiridas en viveros comerciales de la región. Estas plantas fueron empleadas en los ensayos de inoculación al tallo y al sustrato. Para los ensayos de inoculación al sustrato, las plantas fueron arrancadas, la raíz desinfectada en una solución de hipoclorito al 0,1 % por un minuto, lavadas con agua destilada y sembradas en las bolsas de 1 kg con sustrato estéril compuesto por turba, cascarilla de arroz, vermiculita y arena, en relación 3:1:1/2:1/2).

**Selección de cepas patógenas de *Phytophthora cinnamomi* por inoculación al tallo:** la metodología de inoculación con micelio en herida al tallo descrita por Jaramillo *et al.*, 2009, fue empleada para clasificar las cepas de *P. cinnamomi* por virulencia. Plantas de la variedad Hass injertadas sobre patrón comercial procedentes de vivero fueron inoculadas con micelio por herida al tallo con 22 aislamientos de *P. cinnamomi*. Las plantas tenían tres meses de desarrollo aproximadamente. A cada planta le fue realizada una herida en el tallo, a una altura de 5 cm por encima del punto de injertación, dentro de la herida se colocó un disco de medio de 6 mm de diámetro con micelio de *P. cinnamomi*, posteriormente se cubrió la herida con parafilm (Figura 9). Las plantas testigo fueron inoculadas por herida con un disco de 6 mm de diámetro del medio Agar-Agua. Las cepas utilizadas como tratamientos (Tabla 1), se evaluaron por patogenicidad y virulencia mediante la medición del desarrollo de la necrosis en el área de la herida. Este experimento fue establecido en un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones y dos plantas como unidad experimental (UE); cada aislamiento correspondió a un tratamiento y cada repetición tuvo dos unidades experimentales como testigos absolutos. Los tratamientos y repeticiones, se distribuyeron aleatoriamente. Las plantas inoculadas se ubicaron en mesas aisladas del piso dentro de una casa de malla negra antipulgón con polisombra y cubierta de plástico, las bolsas se colocaron sobre platos plásticos para evitar el contacto entre ellas y para mantener la humedad constante del sustrato, se regaron cada dos días a capacidad de campo evitando el salpique entre ellas y para mantener las condiciones de humedad óptimas.

**Tabla 1. Cepas de *Phytophthora cinnamomi* aisladas de diferentes regiones productoras de aguacate en Colombia**

CEPA No.	CÓDIGO	DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	MUESTRA (Tejido)
1	Ag A-003	Antioquia	Rio negro	Raíces
2	Ag A-005	Tolima	Herveo	Raíces
3	Ag A-016	Huila	Sta María	Suelo
4	Ag A-027	Tolima	Alvarado	Suelo
5	Ag A-028	Tolima	Mariquita	Suelo
6	Ag A-031	Valle del Cauca	Palmira	Raíces
7	Ag A-034	Cauca	Piendamó	Raíces
8	Ag A-035	Cauca	El Tambo	Raíces
9	Ag A-036	Cauca	Cajibío	Raíces
10	Ag A-039 (037)	Santander	Girón	Suelo
11	Ag A-040	Risaralda	Tribunas Córcega	Suelo
12	5-3	Cesar	Montes de María	Suelo
13	5-8B	Cesar	Montes de María	Suelo
14	5-10	Cesar	Montes de María	Suelo
15	5-11	Cesar	Montes de María	Suelo
16	5-15B	Guajira	Montes de María	Suelo
17	5-16	Guajira	Montes de María	Suelo
18	5-17A	Guajira	Montes de María	Suelo
19	5-19	Guajira	Montes de María	Suelo
20	5-27	Cesar	Montes de María	Suelo
21	ARMA-006	Tolima	Mariquita	Suelo
22	ARAL-009	Tolima	Alvarado	Suelo
23	ARFRE-004	Tolima	Fresno	Suelo
24	ARFRE-008	Tolima	Fresno	Suelo
25	ARFRE-10	Tolima	Fresno	Suelo

Se tomaron las variables de medición del largo y ancho de la lesión en todas las plantas inoculadas y se realizaron cinco evaluaciones cada tres días durante 15 días a partir del día 5 después de la inoculación. Los valores obtenidos se multiplicaron para hallar el área de la lesión (cm<sup>2</sup>). Los resultados obtenidos se analizaron por medio del programa SAS versión 9.0 (Analytical Software), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple Duncan para determinar el mejor tratamiento. Adicionalmente, se realizaron observaciones de síntomas en la parte aérea, como decaimiento de las hojas, flacidez del tallo y decaimiento del tallo, necrosis, marchitez y la muerte total de la copa. Con los resultados obtenidos en las evaluaciones y el análisis estadístico, se seleccionaron las tres cepas más patógenas.

**Ensayos de infección artificial con sustrato inoculado en patrón Hass para determinación de la dosis de inóculo infectiva:** Para determinar la concentración de inóculo que reprodujera los síntomas de la enfermedad en plantas de aguacate, se estableció un ensayo de inoculación en raíces de plantas de aguacate Hass provenientes de semilla de dos meses de edad aproximadamente, proveniente de vivero y trasplantadas al sustrato (turba, cascarilla de arroz, vermiculita y arena, en relación 3:1:1/2:1/2). La inoculación al sustrato fue realizada de acuerdo con la técnica de Drenth & Sendall (2001), utilizando micelio multiplicado en granos de trigo del aislamiento más virulento ARFRE-008 (Figura 10). El ensayo fue establecido en un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 2X4 (factor A = raíz con o sin herida y factor B= dosis de inóculo), con tres repeticiones y 9 plantas por unidad experimental, cada repetición tuvo dos unidades experimentales como testigos absolutos. Las dosis de inóculo empleadas fueron (1, 2, 3, 5 gr/ kg de sustrato). Cada dosis empleada fue diluida en 250 ml de agua destilada estéril y aplicada en cada caso. La humedad del sustrato fue mantenida con riego periódico manteniendo una serie de ciclos húmedos y secos para reproducir las condiciones de humedad que favorecen el desarrollo del patógeno. Se realizaron observaciones a los 8, 15 y 60 días después de la inoculación de los síntomas de la copa, como decaimiento de las hojas, clorosis foliar, flacidez del tallo y decaimiento del tallo, necrosamiento, marchitez y muerte total de la planta de acuerdo con la escala previamente diseñada por Gabor y Coffey, 1991 (Figura 11). Se realizaron observaciones de síntomas de la copa, como decaimiento de las hojas, clorosis foliar, flacidez del tallo y decaimiento del tallo, necrosamiento, marchitez y muerte total de la planta; síntomas en raíz como porcentaje del daño (visual y técnica línea intercepción), materia seca y porcentaje de recuperación de *P. cinnamomi* (Kellam y Coffey 1984; Gabor y Coffey 1991; Andrade, 2012). Los resultados obtenidos se analizaron por medio del programa SAS versión 9.0 (Analytical Software), se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey para determinar el mejor tratamiento.

**Determinación de la conductividad eléctrica (CE) en segmentos de raíz:** el efecto de *P. cinnamomi* en el deterioro del tejido de raíz afectado por el patógeno fue determinado por medición de la CE de acuerdo con la técnica empleada por Garbor y Coffey, 1991. La CE de la solución con raíces de plantas de aguacate Criollo-Alvarado inoculadas y no inoculadas fue medida a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación con ayuda de un conductímetro. Este ensayo fue establecido en diseño experimental diseño completamente al azar (DCA) con 6 repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos se analizaron por medio del programa SAS versión 9.0 (Analytical Software), se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey para determinar el mejor tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aislamiento del patógeno a partir de raíces afectadas y suelo:** El crecimiento del micelio típico de *P. cinnamomi* en medio de cultivo PDA + antibióticos +fungicidas se observó cuatro días después de siembra (dds), la morfología de la colonia tipo roseta o camelia fue similar a la de *P. cinnamomi*, para la mayoría de los aislamientos. Fueron obtenidos 25 aislamientos de *P. cinnamomi* de los departamentos de Antioquia (Rio negro), Cauca (Piendamó, El Tambo y Cajibío), Cesar (Montes de María), Guajira (Montes de María), Huila (Santa María), Tolima (Alvarado, Fresno, Herveo y Mariquita), Risaralda (Tribunas de Córcega), Santander (Girón) y Valle del Cauca (Palmira). La técnica de la trampa con manzanas verde fue la más eficiente para el aislamiento de *P. cinnamomi*, permitió obtener aislamientos del patógeno tres días después de siembra en medio PDA+antibióticos +fungicidas. Además disminuyó considerablemente la contaminación con *Pythium* y bacterias. El medio PDA+ antibióticos +fungicidas favoreció el crecimiento del micelio ramificado tipo roseta o camelia, que facilita la rápida identificación de *P. cinnamomi*. Algunos aislamientos mostraron contaminación leve con bacteria, la purificación fue realizada con la prueba de la media caja con medio PDA+ antibióticos+ fungicidas, tres dds se logró obtener micelio libre de bacteria. Aislamientos que no pudieron ser purificados por esta técnica fueron descartados. Nuestros resultados corroboraron los reportes previos de literatura (Jeffers *et al.*, 1986 y Erwin *et al.*, 1996) que estandarizaron y recomendaron el medio PDA+ antibióticos +fungicidas como el más indicado para el aislamiento puro *P. cinnamomi*, por inhibir contaminación con otros hongos de suelo como *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* y la contaminación bacteriana.

**Purificación y crecimiento en medio de cultivo de *Phytophthora cinnamomi*:** Con algunas cepas fue necesario realizar constantes reaislamientos a partir de las muestras de suelo para poder eliminar la contaminación de agentes como *Pythium* sp. y crecimientos bacteriales. Los aislamientos fueron repicados en medio PDA+ hasta la mitad de la caja, hasta obtener micelio sin contaminación por bacteria, transferidos a medio PDA con Hymexazol para eliminar contaminación por *Pythium* sp, donde se observó el desarrollo del micelio característico de *P. cinnamomi*.

**Identificación y caracterización morfológica de *Phytophthora cinnamomi*:** Los aislamientos referenciados en la Tabla 1, desarrollaron colonias de micelio de forma petaloide después de cuatro días de siembra en PDA+, Medio V8 y PDA a 23°C (Figura 2) y de tipo roseta seis días después de siembra en Medio Agar Avena a 23°C (Figura 2), los resultados del montaje de placas con micelio y estructuras confirmaron el crecimiento de micelio coraloide, "hifas protuberantes" y clamidiosporas globosas.

**Multiplicación de *P. cinnamomi* en medio Trigo y medio Avena:** El crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* en medio trigo y medio avena contenido en beaker de 200 ml, presentó diferencias en el tiempo de colonización, algunas cepas mostraron más velocidad en la colonización, mientras que otras cepas presentaron crecimiento de micelio muy lento; después de tres semanas, pocos aislamientos con medio trigo o avena, habían sido colonizados completamente. El micelio crecido en avena presentó un color más blanco con relación al micelio crecido en trigo. De acuerdo con el peso obtenido por caneca (62 gr) y la relación de inóculo/sustrato (1 gr/1kilo) recomendado por Drenth & Sendall (2001) se obtuvo la cantidad de inóculo necesaria para incorporar en los ensayos de inoculación del sustrato.

**Selección de cepas patogénicas de *Phytophthora cinnamomi* por inoculación al tallo.** El ensayo realizado en Palmira indicó diferencias en los síntomas presentados en las plantas inoculadas con las 11 cepas evaluadas, indicaron diferencias en la agresividad de las cepas, medida como el incremento del área de la lesión necrótica en el sitio de inoculación, asociado con síntomas en la copa de la planta, como decaimiento de las hojas, flacidez del tallo y decaimiento del tallo, necrosamiento, marchitez, hasta la muerte total de la copa. Los tratamientos T1 (Ag A-003), T7 (Ag A-034) y T6 (Ag A-031) y T11 (Ag A-041) (Figura 14), presentaron más rápido desarrollo de la lesión en comparación con los demás tratamientos. En T11 (Ag A-041) la longitud de la necrosis alcanzó valores entre 15 cm y 20 cm y estuvo asociado con decaimiento, marchitez y muerte de la copa. De acuerdo con la prueba de rangos múltiples Duncan las 11 cepas se agruparon en tres grupos o niveles de patogenicidad



y permitió determinar que el T11 cepa Ag A-041 como el más agresiva con diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) frente a las demás cepas (Tabla 2). El T4 (Ag A-027) fue poco agresivo, ya que no produjo necrosamiento en las plantas. Las plantas testigos (T12) solo presentaron oxidación en el corte de la herida, la copa permaneció sana durante el desarrollo del experimento.

**Tabla 2. Selección de cepas patogénicas de *Phytophthora cinnamomi* por inoculación al tallo en aguacate Hass en el C.I.Palmira**

Aislamiento	Media	Grupo
Ag A-041	64,104	A
Ag A-003	12,03	B
Ag A-034	11,329	BC
Ag A-031	11,019	BC
Ag A-005	2,816	BC
Ag A-036	1,889	BC
Ag A-035	1,561	BC
Ag A-028	1,072	BC
Ag A-016	1,014	BC
Ag A-039	0,949	BC
Ag A-027	0,26	C
Testigo	0	C

Letras diferentes muestran diferencias significativas según el test de Duncan ( $P < 0.05$ ).

El experimento desarrollado en Nataima con 11 cepas de *P. cinnamomi*, indicó que la cepa ARFRE 008 fue la más virulenta con un de área necrótica mayor del 32.5% y 64 % con relación a los aislamientos siguientes 5-27 y 5-11, iguales entre sí a nivel estadístico ( $P \leq 0,05$ ). El desarrollo de la necrosis estuvo asociado con la presencia de síntomas en la copa como decaimiento, marchitez y muerte. Los aislamientos ARMA 006, 5-17A y 5-16 fueron considerados no patogénicos por no incrementar el desarrollo de la necrosis (Tabla 3).

**Tabla 3. Selección de cepas patogénicas de *Phytophthora cinnamomi* por inoculación al tallo en aguacate Hass en el C.I. Nataima**

Aislamiento	Media $\pm$ EE	Grupo
Testigo	25,5 $\pm$ 29,25	A
5-16	26,25 $\pm$ 29,25	A
5-17A	45,90 $\pm$ 29,25	A
ARMA006	47,60 $\pm$ 29,25	A
5-3	58,07 $\pm$ 29,25	A
ARFRE004	61,40 $\pm$ 29,25	A
ARFRE010	62,52 $\pm$ 29,25	A
ARAL009	67,60 $\pm$ 29,25	A
5-15B	103,54 $\pm$ 29,25	AB
5-11	111,67 $\pm$ 29,25	AB
5-27	215,46 $\pm$ 29,25	BC
ARFRE008	320,50 $\pm$ 29,25	C

Letras diferentes muestran diferencias significativas según el test de Duncan ( $P < 0.05$ ).

El reaislamiento del patógeno del tejido infectado permitió comprobar los postulados de Koch, verificando que el incremento en la necrosis del tejido correspondió al desarrollo del patógeno inoculado en el tejido. El medio selectivo PDA+ antibióticos + fungicidas fue empleado, los aislamientos mostraron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de *P. cinnamomi*, similar a lo reportado previamente por (Jeffers *et al.*, 1986 y Erwin *et al.*, 1996).

**Ensayos de infección artificial con sustrato inoculado en patrón Hass para determinación de la dosis de inóculo infectiva:** La presencia de herida en la raíz no tuvo efecto significativo en el desarrollo de los síntomas en la parte aérea, como tampoco en el porcentaje de recuperación del patógeno en la raíz (Tabla 4). El peso seco de la raíz y el daño en semilla disminuyeron significativamente en un 35% y 65 % respectivamente cuando hubo herida en la raíz, mientras que el porcentaje daño en raíz estimado visualmente y por la técnica de intercepto incremento en un 37 % y 35% respectivamente cuando se infringió daño a la raíz antes de la inoculación con *P. cinnamomi* (Tabla 4).

**Tabla 4. Infección artificial con sustrato inoculado con *P. cinnamomi* en patrón Hass con y sin herida a la raíz para determinación de la dosis de inóculo infectiva**

Herida a la raíz	Síntoma aéreo	Peso seco de raíz (gr)	Daño en semilla (%)	Raíz enferma (%)	Raíz enferma (% intercepto)	Recuperación de <i>P. cinnamomi</i> en raíz (%)
Con herida	1,19 ±0,05 A	9,28 ±1,09 A	0,600±0,34 A	3,75 ±0,23 A	33,26±1,83 B	10,03±1,56 A
Sin herida	1,06 ±0,05 A	14,42 ± 1,09 B	1,75± 0,34 B	1,40 ±0,23 B	24,31±1,83 A	6,53±1,56 A

Letras diferentes muestran diferencias significativas según el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Con relación a las dosis de inóculo utilizadas se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) en el peso seco de la raíz, el porcentaje de raíz enferma y de recuperación de *P. cinnamomi*. Diferencias significativas fueron observadas en el desarrollo del síntoma aéreo, daño a la semilla y daño en raíz determinado por la técnica de intercepto, donde las dosis de 3 y 5 gr estadísticamente iguales favorecieron el desarrollo de la enfermedad. Nuestros resultados indicaron que la realización de herida en raíz antes de la inoculación facilita la entrada del patógeno de manera similar a como ocurre en las condiciones del cultivo donde los periodos de sequía favorecen el rompimiento de raíz que facilitarían la entrada del patógeno una vez inicia el periodo de lluvias (Tabla 5). La técnica de herida en raíz ha sido empleada en evaluación de resistencia a *Fusarium* en otras especies (Osorio y Zapata, 2011), en aguacate no se encontraron referencias bibliográficas al respecto. Las dosis de inóculo de 3 y 5 gramos por kilo de sustrato a inocular permitieron la observación de síntomas iniciales de la enfermedad, no se observaron síntomas de muerte de plántula, este resultado es contrario a lo reportado por la literatura (Drenth y Sendall, 2001; Andrade 2012), donde se mencionan dosis de 1 y 2 gr como efectivas para inoculación de aguacate en ensayos de resistencia a *P. cinnamomi*, por tanto es necesario continuar ajustando la dosis que reproduzca también los síntomas finales de la enfermedad para la estandarización final del protocolo y su posterior utilización en la evaluación de resistencia genética a *P. cinnamomi* en aguacate.

**Tabla 5. Desarrollo de síntomas aéreos y radicales en patrones de aguacate Hass inoculados con dos métodos de inoculación artificial en raíz y con cuatro dosis de inóculo de *P. cinnamomi***

Dosis de inóculo (gr)	Síntoma aéreo	Peso seco de raíz (gr)	Daño en semilla (%)	Raíz enferma (%)	Raíz enferma (% intercepto)	Recuperación de <i>P. cinnamomi</i> en raíz (%)
1	1,00 ±0,07 A	11,89 ±1,73 A	0,75± 0,54 A	2,88 ± 0,37B	18,18 ±2,89 A	7,12 ±2,47 A
2	1,13±0,07 AB	11,92 ±1,73 A	0,75± 0,54 A	3,00 ± 0,37 B	28,06 ±2,89 AB	8,33 ±2,47 A
3	1,13±0,07 AB	10,46 ±1,73 A	1,380,54 B	3,25 ± 0,37 B	35,73 ±2,89 BC	8,75 ±2,47 A
5	1,25 ±0,07 B	13,06 ±1,73 A	3,00± 0,54B	2,75 ± 0,37 B	44,71 ±2,89 C	12,08 ± 2,47 A
Testigo	1,00 ±0,07 A	11,89 ±1,73 A	0,75± 0,54 A	1,00± 0,37 A	17,25 ±2,89 A	5,12 ± 2,47 A

Letras diferentes muestran diferencias significativas según el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Determinación de la conductividad eléctrica (CE) en segmentos de raíz:** La conductividad eléctrica incremento en un 70% cuando las raíces de aguacate criollo, fueron tratadas con *P. cinnamomi*, diferencias estadísticas significativas se observaron en los valores de CE por tratamiento el patógeno (Tabla 6). Este resultado correspondieron con lo reportado por Dolan y Coffey (1986) y Garbor y Coffey (1991), quienes afirmaron que el daño aparente en las plantas de aguacate en el campo, tiene relación directa con los valores de CE, por tanto esta técnica se podría emplear como otro parámetro de evaluación dentro del protocolo que continuar ajustando este proyecto de investigación.

**Tabla 6. Conductividad eléctrica (CE) en raíces de aguacate criollo con y sin adición de inóculo de *P. cinnamoni***

CE(Ms/Cm)	Media ± EE	Grupo
Sin inóculo	0,30 ±0,03	A
Con inóculo	0,98 ±0,03	B

Letras diferentes muestran diferencias significativas según el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que la dosis de 5 gr de inóculo como la dosis más efectiva para reproducir los síntomas de la enfermedad, no obstante es necesario ampliar el tiempo de evaluación, para hacer un seguimiento en el desarrollo de los síntomas aéreos y radicales que conllevan a la muerte de plantas.

Es necesario determinar si la herida en raíz permite la disminución en el tiempo de incubación y su influencia en la resistencia del patrón. Se debe continuar con el ajuste del protocolo y la futura caracterización de la resistencia a *Phytophthora cinnamomi* en materiales nativos de aguacate que apoyen la selección de portainjertos de aguacate criollos resistentes a el patógeno.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrade-Hoyos, P. 2012. Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de doctorado en ciencias con énfasis en Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México. 110 p.
- Chen, D. W., Zentmyer, G. A. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62: 397-402.
- Drenth, A., Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection. Brisbane Australia, 42 p.
- Dolan T.E., M.D.Coffey. 1986. Laboratory screening techniques for assessing resistance of four avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis.* 70:115-118.
- Erwin, D; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN, p. 270-271.
- Gabor, B.K., Coffey, M.D. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. *Plant Dis* 75: 118-129.
- Hurtado, T. E. 2010. Búsqueda de resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en germoplasma de *Capsicum* spp. Tesis M. Sc. Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. Colombia. 99 p.
- Jaramillo J., Mejía A., Villamizar P., Orozco M., Arenas A. 2009. Informe Final del Proyecto: Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a *Phytophthora* spp. CIAT, CORPOICA, PROFRUTALES. Palmira, Valle del Cauca, p. 40-44.
- Jeffers, NS; Martin, JB. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70:1038-1043.
- Kellam M. K., Coffey, M.D., 1984. Quantitative Comparison of the Resistance to *Phytophthora* Root Rot in Three Avocado Rootstocks. *Phytopathology* 75(2): 230-234.
- Osorio L.A., Zapata, J. 2011. Caracterización del agente causal de la pudrición de las raíces de la arveja (*Pisum sativum* L) enfermedad endémica en el municipio de Manizales-Caldas (Colombia). *agron.* 19(2): 33 – 43.
- Tamayo, P. 2008. Enfermedades y desordenes abióticos. En: Tecnología para el Cultivo de Aguacate. Rionegro, Antioquia, Colombia. Corpoica. P 155-195.





# ACTAS • PROCEEDINGS

## VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

[www.wacperu2015.com](http://www.wacperu2015.com)

