

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE AGUACATE RAZA MEXICANA  
CON RESISTENCIA A *Phytophthora cinnamomi* Rands**

**PRESENTA**

**ENRIQUE IGNACIO SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**MARZO 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE AGUACATE RAZA MEXICANA  
CON RESISTENCIA A *Phytophthora cinnamomi* Rands**

**PRESENTA**

**ENRIQUE IGNACIO SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**MARZO, 2018**

**SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE AGUACATE RAZA MEXICANA CON  
RESISTENCIA A *Phytophthora cinnamomi* Rands**

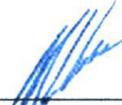
**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**COMITÉ PARTICULAR**



---

**D.C. Adriana Gutiérrez Díez  
Director**



---

**D.C. Alejandro Facundo Barrientos Priego  
Codirector**



---

**D.C. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto  
Asesor**



---

**D.C. Humberto Rodríguez Fuentes  
Asesor**



---

**D.C. Salvador Ochoa Ascencio  
Asesor externo**



---

**D.C. Adriana Gutiérrez Díez  
Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación**

## DEDICATORIA

*A mis queridos padres, Juanita y Enrique,  
a mi hermana, Elizabeth.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por todas las atenciones y facilidades otorgadas durante mis estudios de maestría.

A la D. C. Adriana Gutiérrez Díez por su confianza, consejo, apoyo y paciencia durante mis estudios de maestría y especialmente durante el desarrollo y preparación de esta tesis.

Al D. C. Alejandro Facundo Barrientos Priego. a la D. C. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto, al D. C. Salvador Ochoa Ascencio y al D. C. Humberto Rodríguez Fuentes por su consejo, compromiso, conocimiento y apoyo desinteresado.

A los maestros del programa de maestría de la FA-UANL, por la formación, el apoyo y los consejos.

Al Proyecto del Banco de Germoplasma de la Red de Aguacate por financiar parte de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada durante mis estudios de maestría (CVU: 739046)

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipótesis.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo General.....	3
1.2.2. Objetivos Específicos.....	3
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Importancia Económica del Aguacate.....	4
2.2. Clasificación Taxonómica del Aguacate.....	4
2.3. Descripción Botánica de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> .....	5
2.4. Origen y Distribución del Aguacate Raza Mexicana.....	6
2.4.1. Requerimientos Agroclimáticos.....	7
2.4.2. Adaptación Ecológica.....	8
2.5. Enfermedades del Aguacate.....	9
2.6. Importancia Económica de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.....	11
2.7. Clasificación Taxonómica de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	12
2.8. Características Morfológicas.....	12
2.9. Ciclo Biológico.....	13
2.10. Sintomatología.....	15
2.11. Control de la Enfermedad.....	16

2.12. Métodos de Evaluación de la Resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en <i>P. americana</i> .....	18
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
3.1. Ubicación del Experimento.....	21
3.2. Material Vegetal.....	21
3.2.1. Propagación por Semilla.....	22
3.3. Material Patogénico.....	22
3.4. Identificación de la Actividad de Enzimas Degradadoras de la Pared Celular (EDPC) de Aislados de <i>P. cinnamomi</i> .....	23
3.4.1. Índice de Degradación.....	24
3.5. Evaluación de la Resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Conductividad Eléctrica (CE).....	25
3.5.1. Incremento del Inóculo.....	25
3.5.1.1. Inoculación.....	26
3.5.2. Diseño Experimental.....	26
3.6. Evaluación de la Resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Inoculación de Plántulas.....	26
3.6.1. Incremento del Inóculo.....	27
3.6.1.1. Inoculación.....	27
3.6.2. Variable Respuesta de las Plántulas.....	28
3.6.3. Diseño Experimental.....	30
3.6.4. Detección de <i>P. cinnamomi</i> en Plántulas.....	30
3.6.4.1. Detección visual.....	30
3.6.4.2. Detección molecular.....	31
3.6.4.2.1. Extracción, integridad, cuantificación y calidad del ADN...	31
3.6.4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
3.6.4.2.3. Secuenciación de fragmentos.....	33
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
4.1. Identificación de la Actividad de Enzimas Degradadoras de la Pared Celular (EDPC) de Aislados de <i>P. cinnamomi</i> .....	34

4.2. Evaluación de la Resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Conductividad Eléctrica (CE).....	38
4.3. Evaluación de la Resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Inoculación de Plántulas.....	41
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>54</b>
<b>8. APÉNDICE.....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Actividades enzimáticas y sustratos.....	23
2	Interpretación del valor de ID (Gutiérrez-Soto <i>et al.</i> , 2015).....	25
3	Mezcla de reacción para PCR.....	32
4	Programa térmico para PCR.....	33
5	Análisis de varianza.....	39
6	Valores de ABCPE, ABCPEr para genotipos de aguacate y escala de susceptibilidad a <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	45
7	Resultados de la prueba de $X^2$ de plántulas de aguacate inoculadas con <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	47
1A	Amortiguador de extracción.....	68
2A	Solución de lavado 1: 76 % EtOH, 0.2 M NaOAc.....	68
3A	Solución de lavado 2: 76 % EtOH, 10 mM NH <sub>4</sub> OAc.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Modificado de Dann <i>et al.</i> , 2013).....	15
2	Escala de severidad de daños en parte aérea por <i>P. cinnamomi</i> , 0= plántula sana; 1= daño leve (plántula con ligero decaimiento de hojas); 2= daño medio (plántula con decaimiento medio de hojas); 3= daño severo (plántula con decaimiento total de hojas e inicio de muerte apical); 4= daño muy severo (plántula con 90 -100 % de área foliar muerta, tallo verde) y 5= plántula muerta...	29
3	Hidrólisis de sustrato para cada actividad enzimática de dos aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	34
4	Valores obtenidos en los índices de degradación de enzimas para ambos aislados de <i>P. cinnamomi</i> .....	35
5	Cambio en la conductividad eléctrica de los genotipos a través del tiempo. A) y C) 12 genotipos de aguacate evaluados para resistencia con dos aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Pc1 y Pc2, respectivamente. B) y D) genotipos sin inocular con Pc1 y Pc2.....	39
6	Medias de conductividad eléctrica para raíces de genotipos de aguacate sometidos a <i>Phytophthora cinnamomi</i> . Letras diferentes marcan diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$ ).....	40
7	Medias de conductividad eléctrica para los aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . Letras diferentes marcan diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$ ).....	41

8	Aparición de síntomas de la enfermedad en plántulas de aguacate. A) y B) Plántulas inoculadas, C) Plántulas sin inocular, con <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	42
9	Avance de la enfermedad causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i> en los genotipos de aguacate evaluados a través del tiempo.....	43
10	Proporción de plántulas de aguacate asintomáticas por genotipo a <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	46
11	Comparativa de daño causado por <i>Phytophthora cinnamomi</i> en plántulas de aguacate.....	48
12	Crecimiento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A) Cultivo puro, B) y C) Crecimiento de micelio a partir de raíces.....	49
13	Verificación de la integridad del ADN de siete muestras. Carriles 1-7 = ADN de raíz y carril M = marcador de peso molecular de 1 Kb. Gel de agarosa al 1 %.....	49
14	Fragmentos amplificados mediante de PCR. Carril1 = testigo positivo de <i>P. cinnamomi</i> , carriles 2-7 = fragmentos amplificados a partir de raíz, carril 8 = testigo negativo y carril M = marcador de peso molecular de 100 pb. Gel de agarosa al 2 %.....	50
15	Alineación de las secuencias de <i>Phytophthora cinnamomi</i> con el algoritmo Clustal-W en el programa GENtle V.1.9.4.....	50

## NOMENCLATURA

A	Absorbancia
ABCPE	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad
ABCPEr	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad relativa
a. C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Calcio
CE	Conductividad Eléctrica
cm	Centímetros
CM	Cuadrado medio
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
°C	Grados centígrados
bdH <sub>2</sub> O	Agua bidestilada
dNTP	Deoxinucleotidotrifosfato
EDPC	Enzima degradadora de la pared celular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EST	Expressed Sequence Tag (Etiqueta de secuencia expresada)
EtOH	Etanol
Fc	Estadístico F calculado
g	Gramo
gl	Grados de libertad
h	Hora
ha	Hectárea
HCl	Ácido Clorhídrico
H <sub>2</sub> O	Agua
ID	Índice de degradación
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramo
L	Litro
LPV	Large peripheral vesicles (Vesículas periféricas grandes)
m	Metro
M	Molar
meq	Miliequivalente

MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mS	Milisiemen
MW	Molecular weight (Peso molecular)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
NaCl	Cloruro de sodio
NaHSO <sub>3</sub>	Bisulfito de sodio
NaOAc	Acetato de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pc1	Aislado de <i>Phytophthora cinnamomi</i> 1
Pc2	Aislado de <i>Phytophthora cinnamomi</i> 2
PDA	Agar papa dextrosa
pH	Potencial de hidrogeno
ppm	Partes por millón
PVC	Policloruro de vinilo
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SC	Suma de cuadrados
Sig	Significancia
t	Tonelada
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerasa
TE	Tris EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
v	Volumen
V	Voltio

## RESUMEN

La pudrición de raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, es la principal enfermedad que afecta al cultivo del aguacate a nivel mundial. El uso de portainjertos resistentes permite el establecimiento del cultivo en condiciones de infestación por *P. cinnamomi*. El presente estudio tuvo por objetivo general el seleccionar genotipos de aguacate raza Mexicana del sur del estado de Nuevo León resistentes a *P. cinnamomi*. Las actividades enzimáticas tipo xilanasa, pectinasa, amilasa, celulasa y ligninasa se identificaron en dos aislados de *P. cinnamomi* (Pc1 y Pc2). Se evaluó la resistencia en progenies de diez genotipos de aguacate raza Mexicana a dos aislados de *P. cinnamomi* mediante conductividad eléctrica y frente a un aislado por inoculación en plántulas.

En la identificación de actividades enzimáticas se encontró positivo el aislado Pc2 para tipo pectinasa, amilasa, xilanasa y celulasa, mientras que el aislado Pc1 sólo presentó tipo pectinasa y amilasa. En la evaluación de resistencia mediante conductividad eléctrica no se encontró efecto en la interacción genotipos x aislados, pero si diferencias significativas entre genotipos y entre aislados. Los genotipos no mostraron un nivel de conductividad igual o menor que el genotipo 'Duke 7' (genotipo moderadamente resistente) por lo que se consideraron susceptibles. El aislado Pc2

fue el más patogénico al inducir significativamente un mayor aumento de la conductividad eléctrica ( $p < 0.05$ ). En la evaluación para resistencia por inoculación de plántulas, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados. El genotipo 'Todo el Año' fue el más resistente al presentar un 70 % de plántulas asintomáticas, seguido por el genotipo 'Plátano' con un 40 %. Los genotipos 'María Elena', 'Silvestre' y 'Hass', fueron los más susceptibles al presentar una mortalidad del 100 %. Se concluyó que: el genotipo 'Duke 7' es susceptible al aislado Pc2 a pesar de estar considerado como moderadamente resistente, el genotipo 'Hass' es susceptible al aislado Pc2, y los genotipos 'Todo el Año' y 'Plátano' al presentar un 70 % y 40 % de plántulas asintomáticas, son fuente de resistencia a *P. cinnamomi* y pueden ser utilizados en programas de mejoramiento de portainjertos.

## ABSTRACT

The root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands, is the main disease that affects avocado cultivation worldwide. The use of resistant rootstocks allows the establishment of the crop under conditions of *P. cinnamomi* infestation. The objective of this study was to select Mexican race avocado genotypes from south of Nuevo Leon state with resistance to *P. cinnamomi*. Enzymatic activities such as xylanase, pectinase, amylase, cellulase and ligninase were identified for two isolates of *P. cinnamomi* (Pc1 and Pc2). The resistance in progenies of ten Mexican race avocado genotypes to Pc1 and Pc2 was evaluated by electrical conductivity, also to Pc2 isolate by inoculation in seedlings.

In the identification of enzymatic activities, the isolate Pc2 resulted positive for pectinase, amylase, xylanase and cellulase activities, whereas the isolate Pc1 just presented pectinase and amylase type activities. In the evaluation of resistance by electrical conductivity, no effects were found on the interaction genotypes x isolates, but there were significant differences among genotypes and between isolates. The evaluated genotypes did not show an equal or lower level of electrical conductivity than 'Duke 7' (moderately resistant genotype) and the isolate Pc2 was found to be the most pathogenic during the means comparison ( $p < 0.05$ ). In the evaluation for resistance by inoculation of seedlings, the  $X^2$  test ( $p < 0.009$ ) shows significant differences among the

evaluated genotypes, being 'Todo el Año' the most resistant genotype with 70 % of asymptomatic seedlings, followed by the genotype 'Platano' with 40 %. The genotypes 'María Elena', 'Silvestre' and 'Hass' were the most susceptible with a mortality of 100 %. It was concluded that the 'Duke 7' genotype despite being considered as moderately resistant is susceptible to Pc2 isolate, the 'Hass' genotype is susceptible to Pc2, and the 'Todo el Año' and 'Platano' genotypes showed 70 % and 40 % of asymptomatic seedlings, respectively, being a source of resistance to *P. cinnamomi* and can be used in root-stock breeding programs.

## 1. INTRODUCCIÓN

La principal enfermedad que afecta los sistemas de producción de aguacate alrededor del mundo es la pudrición de raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands (Hardham, 2005). En México, es una de las principales limitantes en la producción de aguacate, en el estado de Puebla se han observado incidencias del 75 % de los árboles afectados; en Querétaro ocasionó la desaparición del cultivo. En Michoacán en 1979 se encontraron trece mil árboles afectados, 13 años después en 1994 se encontraron cien mil árboles afectados, posteriormente en 1999 la severidad ascendió a 550 mil árboles afectados, causando una pérdida de 640 millones de pesos y evidenciando un creciente incremento de la enfermedad (Rodríguez, 2015).

Los métodos de control para este patógeno son el químico, el biológico, y las buenas prácticas culturales; sin embargo, los intentos de control presentan algunas limitaciones y es necesario implementar medidas sustentables que permitan enfrentar la enfermedad de manera más duradera. Una alternativa es el uso de portainjertos resistentes a *P. cinnamomi*, aunque tras décadas de investigación apenas se ha logrado introducir un nivel moderado de resistencia en algunos genotipos. De las tres razas de aguacate utilizadas como portainjertos, la raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) ha mostrado tener mayor tolerancia e incluso resistencia moderada a *P. cinnamomi* (Sánchez, 2007; Gómez y Apaza, 2015).

Actualmente existen en el mercado diferentes portainjertos que se caracterizan por ser parcialmente resistentes o tolerantes a *P. cinnamomi*, tales como 'Barr Duke', 'Duke 6', 'Duke 7', 'Duke 9', 'Thomas' y 'Toro Canyon', todos ellos de la raza Mexicana (Rodríguez, 2015). Gallo *et al.* (2007 a) reportaron portainjertos resistentes de la raza Antillana (*P. americana* var. *americana*), con una tasa de sobrevivencia entre el 89 - 100 % respecto a un 50 - 60 % de portainjertos como 'Duke 7' y 'Thomas'; sin embargo, los portainjertos de la raza Antillana no se adaptan a todas las condiciones climáticas y de suelo de México.

Debido a factores como la poca disponibilidad de portainjertos resistentes, así como la poca adaptación a los diferentes suelos y climas que algunos pueden presentar, existe la necesidad de búsqueda de genotipos que presenten resistencia y que puedan utilizarse como portainjertos comerciales. Una opción es recurrir a la base genética de *P. americana* var. *drymifolia*, buscando entre las accesiones de los bancos de germoplasma existentes en el país, otra es recurrir al escrutinio de materiales silvestres, debido a la amplia diversidad genética que se puede encontrar. Por lo que, encontrar algún genotipo que presente resistencia igual o superior al portainjerto de raza Mexicana 'Duke 7', que actualmente se utiliza como portainjerto moderadamente resistente, aportará un avance en el control de la enfermedad.

### **1.1. Hipótesis**

Al menos un genotipo de aguacate raza Mexicana del Sur del estado de Nuevo León es resistente a *Phytophthora cinnamomi* Rands.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

Seleccionar genotipos de aguacate raza Mexicana del Sur del estado de Nuevo León resistentes a *Phytophthora cinnamomi*.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar las actividades enzimáticas tipo xilanasa, pectinasa, amilasa, celulasa y ligninasa de dos aislados de *P. cinnamomi*.
2. Evaluar la resistencia en progenies de diez genotipos de aguacate raza Mexicana a dos aislados de *P. cinnamomi* mediante conductividad eléctrica.
3. Evaluar la resistencia en progenies de diez genotipos de aguacate raza Mexicana a un aislado de *P. cinnamomi* por inoculación en plántulas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Importancia Económica del Aguacate

México en 2016 produjo 1 889 353 t de aguacate con un valor económico de 30 265 millones de pesos, tuvo una superficie cosechada de 180 mil hectáreas con un rendimiento de 10.5 t·ha<sup>-1</sup>, manteniéndose como el primer productor de aguacate a nivel mundial. Los estados que más producción aportaron fueron Michoacán con un 83.5 %, Jalisco con un 6.4 % y el Estado de México con un 5 % (SIAP, 2017).

En 2016 se exportaron 1 032 294 t de aguacate por un valor de 2 317 millones de dólares, participando con un 46 % del valor de las exportaciones mundiales. Los tres principales países como destino de exportación fueron Estados Unidos de América, Japón y Canadá (SAGARPA, 2017).

### 2.2. Clasificación Taxonómica del Aguacate

Reino: *Plantae*

Subreino: *Viridiplantae*

Infrareino: *Streptophyta*

Superdivisión: *Embryophyta*

División: *Tracheophyta*

Subdivisión: *Spermatophytina*

Clase: *Magnoliopsida*

Superorden: *Magnolianaes*

Orden: *Laurales*

Familia: *Lauraceae*

Género: *Persea* Mill.

Especie: *Persea americana* Mill.

(ITIS, 2017)

El género *Persea* contiene alrededor de 85 especies, la mayoría se encuentran desde el Sur de los Estados Unidos de América hasta Chile. Las excepciones son *Persea indica* que se encuentra en las Islas Canarias (España) y probablemente otras del sur de Asia que se piensa pertenecen a *Persea* (Barrientos-Priego y López-López, 2002).

### **2.3. Descripción Botánica de *Persea americana* var. *drymifolia***

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un frutal perteneciente a la familia *Lauraceae* con un número cromosómico  $2n = 24$  (Barrientos-Priego y López-López, 2002). Se consideran tres variedades botánicas para esta especie conocidas como razas de importancia hortícola: la Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia* [Schltdl. Et Cham] S. F. Blake), la Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis* [L.O. Williams] Scora) y la Antillana (*Persea americana* var. *americana*) (Chanderbali *et al.*, 2008); estas variedades se caracterizan por el tamaño, forma y maduración del fruto, textura

y color de la cáscara, y tamaño de la semilla, entre otras diferencias (Rincón-Hernández *et al.*, 2011). La cruce entre estas distintas razas ha producido tipos de aguacate de importancia económica relevante como los son el aguacate 'Hass', 'Fuerte' y 'Bacon', entre otros (Acosta *et al.*, 2012).

Los árboles de aguacate raza Mexicana alcanzan los 15 m de altura, son de ramas ligeramente pubescentes con hojas de color verde oscuro intenso y brotes verdes claros o rojizos, son aromáticas como su corteza y madera, y presentan ápice agudo, superficie adaxial glauca; su inflorescencia es subterminal, múltiple, puede ser pubescente o no, presenta flores regulares en dicogamia protógina. Tiene de 3 a 6 frutos por racimo terminal, de 4 a 12 cm de longitud, de forma ovoide o ligeramente piriformes, exocarpio delgado liso y suave, y de color verde oscuro, café, negro o púrpura, su mesocarpio con olor a anís; semilla larga, ovada de superficie lisa o ligeramente rugosa y que puede estar adherida o suelta (Campos *et al.*, 2008; Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

#### **2.4. Origen y Distribución del Aguacate Raza Mexicana**

Según Kopp citado por Sánchez-Pérez (1999), el origen de las actuales formas de aguacate es incierto debido a su estrecha conexión con representantes de civilizaciones antiguas del área México-Guatemala-Honduras, quienes valoraban mucho sus frutos. De acuerdo con Sánchez-Pérez (1999) las razas Mexicana y Guatemalteca se originaron y domesticaron en las tierras altas de México y Guatemala,

respectivamente, mientras que la raza Antillana muy probablemente tuvo su origen en las costas del Pacífico de Centroamérica, desde Guatemala hasta Costa Rica.

En México, la evidencia más antigua del consumo de aguacate, fueron fósiles de semillas encontrados en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, datados entre los años 8000 a 7000 a.C. (Smith, 1966). De acuerdo con Williams (1976) los aguacates mexicanos fueron los primeros en ser utilizados como alimento por el hombre, incluso antes de que se desarrollara la agricultura y horticultura.

A nivel del continente americano, *P. americana* var. *drymifolia* se encuentra creciendo en México, Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Panamá. En México tiene una distribución en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz; crece en altitudes mayores a 1000 m en climas húmedos cálidos a semiáridos, se puede encontrar en sistemas de producción intensiva, huertas y huertas de traspatio, así como formando parte de la vegetación silvestre (Campos *et al.*, 2008).

#### **2.4.1. Requerimientos Agroclimáticos**

La temperatura para el cultivo del aguacate va de los 17 a 24 °C, la óptima alrededor de los 20 °C, con la cual alcanza su óptimo desarrollo, requiere regímenes pluviales de 1000 a 2000 milímetros de lluvia. Durante la época productiva, el riego localizado prolonga el periodo productivo, incrementando los rendimientos en alrededor del 30 % (SAGARPA, 2011).

Los tipos de suelos más recomendados para establecer el cultivo son los de textura ligera y profundos, bien drenados con un pH neutro o ligeramente ácidos de 5.5 a 7. También, se pueden cultivar en suelos arcillosos o franco arcillosos, siempre que exista un buen drenaje. El exceso de humedad es un medio que favorece la aparición de enfermedades de la raíz, fisiológicas y fúngicas. El terreno destinado al cultivo debe contar con buena protección natural contra el viento, porque este puede producir daños como: rotura de ramas, raíz y caída del fruto, especialmente cuando están pequeños, además, el viento reduce la humedad, las flores se deshidratan e interfiere con la polinización (SAGARPA, 2011).

La variedad Hass requiere una altitud de entre los 1200 a 1800 msnm, aunque también puede tolerar altitudes de hasta 2500 msnm dependiendo del clima presente, y una humedad relativa no mayor a 65 % (Garbanzo, 2010)

#### **2.4.2. Adaptación Ecológica**

La adaptación tropical de las tres razas ordenadas de mayor a menor es: Antillana, Guatemalteca y Mexicana. La raza Antillana se adapta desde el nivel del mar hasta 1000 m de altitud. Entre los 1000 y 2000 msnm se adapta la Guatemalteca, mientras que la raza Mexicana se desempeña mejor entre los 1500 a 3000 msnm; sin embargo, las tres razas pueden convivir y prosperar bien una junto a otra en partes de Israel y Marruecos, así como en otras partes del mundo (Sánchez-Pérez, 1999).

La raza Mexicana es originaria de tierras altas con altitudes de 2400 a 2800 msnm y es resistente al frío soportando temperaturas mínimas hasta de 2.2 °C. La

Guatemalteca es originaria de tierras entre los 800 y 2400 msnm, y puede ser cultivada donde las temperaturas mínimas superen los 4.5 °C. La raza Antillana es originaria de zonas bajas con altitudes menores a los 800 msnm con un índice térmico comprendido entre los 22 y 26 °C (Pérez-Santiago, 2008). El aguacate tipo Antillano que se caracteriza por su adaptación a condiciones tropicales y por su resistencia a la salinidad y clorosis, se cree que haya adquirido estas características al adaptarse al clima y suelos calcáreos, característicos de la Península de Yucatán y que el propósito de la domesticación se haya enfocado al tamaño del fruto (Galindo *et al.*, 2008).

## 2.5. Enfermedades del Aguacate

Según Sánchez (2007) en casos extremos el aguacate puede presentar enfermedades severas que 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 entre un 15 y 30 %.

Las enfermedades económicamente más significativas incluyen: la pudrición de raíz por *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi* Rands), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz., *C. acutatum*), la pudrición del pedúnculo (anamorfos de *Botryosphaeria* spp., *Thyronectria pseudotrichia* Schwein., *C. gloeosporioides*, *Phomopsis perseae* Zerova and *Fusarium decemcellulare* Brick., *F. sambucinum* Fuckel, *F. solani* Mart. Sacc., *Pestalotiopsis versicolor* (Speg.) Steyaert, *Bipolaris setariae* (Sawada) Shoemaker y *Rhizopus stolonifer*), la mancha negra del fruto (*Cercospora purpurea*), la verrugosis (*Sphaceloma perseae* Jenkins), la mancha de sol (*Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)), la podredumbre blanca (*Rosellinia necatrix* Prill.),

la pudrición radicular por *Phellinus noxius*, la marchitez del laurel (por el hongo *Raffaelea lauricola*, simbiote del escarabajo del laurel rojo *Xyleborus glabratulus*), los canchros por *Phytophthora* (*P. cinnamomi* Rands, *P. heveae* Thompson, *P. menzei* Browne, *P. palmivora* E.J. Butler) (Dann *et al.*, 2013).

Las de menor importancia son: la pudrición de raíz por *Armillaria* (*Armillaria* spp.), la verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb), cancro de tronco por *Dothiorella* (*Dothiorella* sp., *Botryosphaeria* sp.), cancro bacteriano (*Pseudomonas syringae* van Hall, *Xanthomonas campestris* Pammel), azúcar en el tronco “Black streak” (desconocido) (Dann *et al.*, 2013).

Las enfermedades como la quemadura foliar (*Xylella fastidiosa*), el oidio (*Oidium* sp.), la mancha plateada (*Mycosphaerella perseae* Miles), la mancha de asfalto (*Phyllachora gratissima* Rehm.), pudrición blanda bacteriana (*Pectobacterium caratovorum*), la mancha de hollín (*Stomiopeltis* sp. y *Akaropeltopsis* sp.), la fumagina (ascomicetos, *Capnodium* spp.), la mancha algal (*Cephaleuros virescens* Kunze), la enfermedad conocida en inglés como “pepper spot” (también causada por *Colletotrichum gloeosporioides*) y la “Duke 6 stem-pitting” (desconocido) generalmente son problemas menores que no impactan en la salud de la planta o en una reducción de la producción. Sin embargo, tanto la marchitez del laurel (en Estados Unidos) como la pudrición de la raíz por *Phellinus noxius* (en Australia del Este) están adquiriendo atención especial por su impacto letal, y desconocimiento sobre su epidemiología y manejo (Dann *et al.*, 2013).

Se reconoce a la “tristeza del aguacate” o “pudrición de raíz” como la enfermedad más devastadora a nivel mundial, es producida por *P. cinnamomi* y ataca la raíz del árbol, el cual se debilita y generalmente muere. Se ha reportado que esta enfermedad está presente en unos 70 países (Pegg *et al.*, 2002).

## **2.6. Importancia Económica de *Phytophthora cinnamomi***

*Phytophthora cinnamomi* está distribuido globalmente y puede infectar cerca de 3000 especies vegetales, causando un grave problema en la agricultura (Hardham, 2005). Es el agente causal de la enfermedad conocida como “tristeza del aguacate” o “pudrición de raíz” en el cultivo del aguacate *Persea americana* Mill., y es la enfermedad más grave de este cultivo a nivel mundial (Zentmyer, 1980). Se considera el principal factor limitante en la producción de países como: Australia, México, Sudáfrica y los Estados Unidos, además de otros setenta países (Ploetz *et al.*, 2002; Sánchez, 2007). En California, ha generado pérdidas del 60 a 75 % de los cultivos de aguacate, un estimado en pérdidas de 40 millones de dólares anuales (Coffey, 1987).

En México, en el estado de Puebla se han observado incidencias del 75 % de los árboles, en Querétaro ocasionó la desaparición del cultivo, mientras que en Michoacán en 1979 se encontraron trece mil árboles afectados; 13 años después en 1994 se encontraron cien mil árboles afectados, posteriormente en 1999 la severidad subió a 550 mil árboles afectados causando una pérdida de 640 millones de pesos mexicanos (40 millones de dólares americanos), evidenciando un creciente incremento de la enfermedad (Rodríguez, 2015).

## 2.7. Clasificación Taxonómica de *Phytophthora cinnamomi*

El reino *Chromista* o *Stramenopila* está formado por los Filos: *Oomycota*, *Hyphochytridiomycota* y *Labyrinthulomycota*. Según la última reclasificación taxonómica *P. cinnamomi* quedo ubicado de la siguiente manera (Hardham, 2005; Rodríguez, 2015).

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Chromista*

Filo: *Oomycota*

Clase: *Oomycetes*

Orden: *Peronosporales*

Familia: *Peronosporaceae*

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora cinnamomi*

## 2.8. Características Morfológicas

El micelio es cenocítico típicamente coraliforme, sus hifas son moderadamente ramificadas y con hinchamientos vesiculares siendo esta la principal característica que existe para diferenciar *P. cinnamomi* de otras especies de *Phytophthora*, el diámetro de la hifa varía de 8 a 25  $\mu\text{m}$ . El aspecto de la colonia en medio sólido es similar al de una camelia. Los esporangióforos son simples, los esporangios son no papilados, ovales u oval alargados, grandes con medidas de entre 23 y 63  $\mu\text{m}$  de largo por 15 a 30  $\mu\text{m}$  de ancho. Las esporas son apleróticas producidas heterotáticamente y es

posible obtener oosporas mediante cultivos puros en forma homotálica. Presenta abundantes clamidosporas esféricas, terminales e intercalares (Coria, 2009; Rodríguez, 2015).

*P. cinnamomi* presenta dos tipos de apareamiento, tipo A1 y tipo A2, donde cada tipo corresponde a una cepa de apareamiento, la cual produce células sexuales masculinas (anteridio) o femeninas (oogonio). El tipo de apareamiento predominante a nivel mundial es el tipo A2, lo cual indica que hay una limitada reproducción sexual dentro de esta especie. El estado sexual de *P. cinnamomi* se forma cuando los dos tipos de apareamiento se presentan, cada cepa de apareamiento presenta una condición de producción de células sexuales diferentes a la otra, la cepa con anteridios se une a la cepa con oogonios y se forma la oosfera. Los oogonios miden en promedio 40 µm de diámetro, los anteridios anfígenos miden 18 µm de ancho por 20 µm de largo, algunos anteridios pueden ser bicelulares, y muchas de las oosporas son pleróticas a 35 µm (Andrade, 2012; Rodríguez, 2015).

## **2.9. Ciclo Biológico**

*P. cinnamomi* puede crecer saprófitamente en el suelo y persistir en el suelo o material vegetal infectado como clamidosporas y en menor medida, como oosporas. Cuando prevalecen las condiciones que favorecen el crecimiento, el patógeno entra en el ciclo de esporulación asexual. Hifas somáticas forman esporangios multinucleares que se rompen y liberan 20 a 30 zoosporas uninucleadas biflageladas. Las zoosporas sin pared se enquistan, formando quistes con pared que germinan y penetran en la planta.

Dentro de 2 o 3 días en un hospedero susceptible, se forman esporangios en la superficie de planta. El ciclo asexual puede repetirse muchas veces en rápida sucesión, amplificando rápidamente el potencial de inóculo en el área infectada (Hardham, 2005).

Las raíces estimulan la germinación de las clamidosporas mediante la secreción de sustancias químicas, así como la atracción de las zoosporas a las puntas de las mismas. Una vez que penetra, pudre las raíces y afecta la absorción de agua. La cantidad de raíces es disminuida. El patógeno en las raíces continúa su desarrollo vegetativo en forma de micelio, forma esporangios que germinan e infectan directamente nuevas raíces. Los esporangios producen zoosporas, las cuales migran hacia la región subapical de nuevas raíces. Las clamidosporas son la fuente de inóculo primario, el micelio, esporangios y zoosporas causan infecciones secundarias repetidas. Si las condiciones del suelo favorecen al patógeno, habrá una pudrición abundante de raíces y una disminución en la absorción de agua y nutrientes que el árbol necesita para mantener la turgencia, vigor y crecimiento del follaje, así como para la producción del fruto. Bajo estas condiciones se manifestarán síntomas de marchitamiento de hojas, defoliación y disminución de cantidad y calidad de frutos (Figura 1) (Coria, 2009).

Para la manifestación de la enfermedad las temperaturas ideales son las que se encuentran en un rango de 24 a 28 °C, ya que se presenta mayor producción de esporangios y mejores condiciones para la liberación y movimiento de las zoosporas hacia las raíces de las plantas (Andrade, 2012). Este patógeno puede afectar plantas

de aguacate sin importar la variedad ni estado de desarrollo de las plantas (Ramírez, 2013).

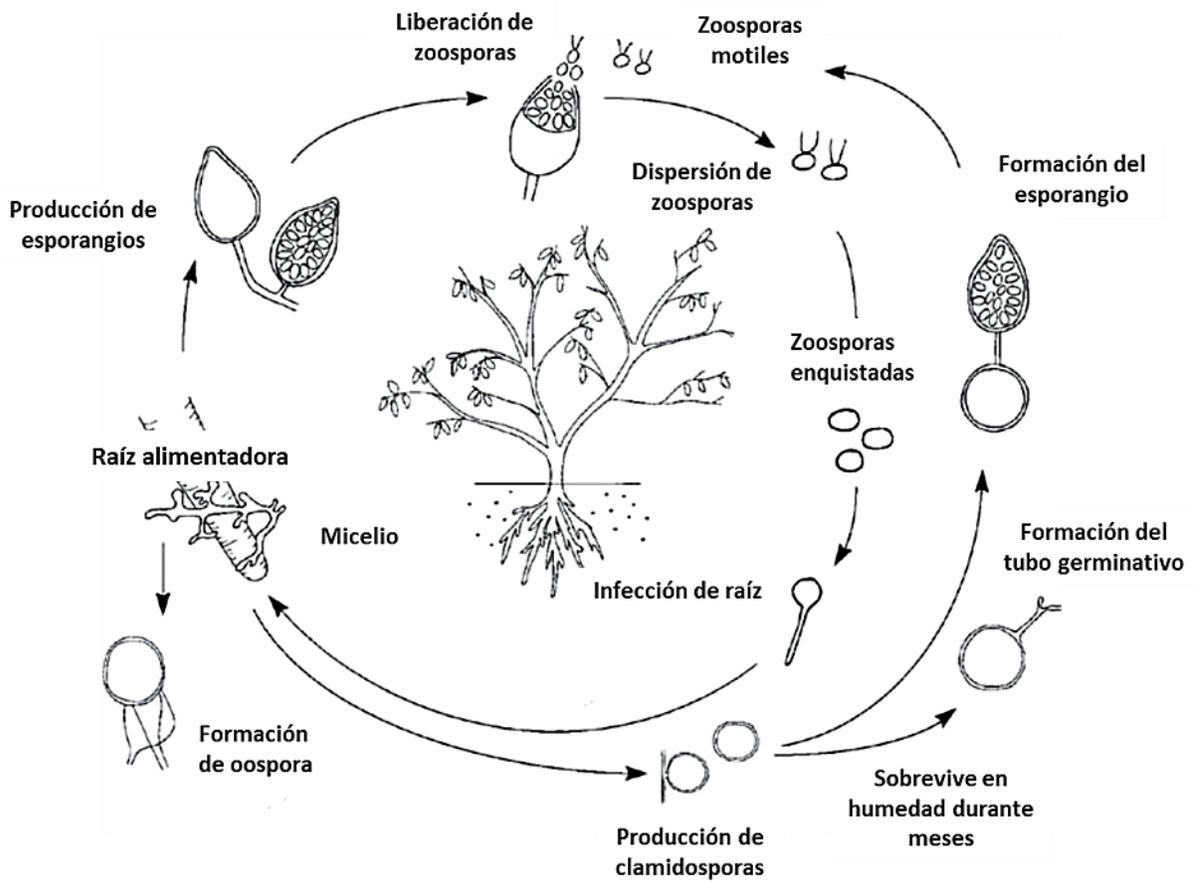


Figura 1. Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi* (Modificado de Dann *et al.*, 2013).

## 2.10. Sintomatología

Entre los síntomas causados por *P. cinnamomi* se incluyen una muerte regresiva de las ramas de los árboles, marchitez y amarillamiento de las hojas y finalmente una defoliación completa. Con frecuencia, cuando aparecen esos síntomas en la parte aérea de la planta, es porque muchas de las raíces alimentadoras ya han sido destruidas (Sánchez, 2007). Las raíces presentan una pudrición con el centro oscuro y consistencia quebradiza. La absorción de agua y su transporte ascendente se

reduce, lo que produce el origen de síntomas en la parte aérea. Cuando el árbol pierde más agua por transpiración que la absorbida por un sistema radical podrido por el hongo, empieza a mostrar signos de síntomas de marchitamiento de hojas o tristeza. La nutrición también se afecta. El nitrógeno se incrementa, se detiene el movimiento del fósforo hacia los tejidos y se afecta la absorción del manganeso, cobre y hierro. Estos problemas nutrimentales causan amarillamiento, follaje escaso y aborto de flores y frutos pequeños. Los árboles pierden progresivamente su vigor con el avance de la enfermedad, posteriormente se presenta una defoliación y el árbol termina por morir (Coria, 2009).

### 2.11. Control de la Enfermedad

Entre los métodos de control para esta enfermedad se encuentran:

- **Prevención:** la prevención de la propagación de la enfermedad implica principalmente la producción y distribución de material de vivero limpio. El problema es que las plantas infectadas pueden permanecer asintomáticas durante mucho tiempo y, por lo tanto, distribuirse (DAISIE, 2017).
- **Mecánico:** el potencial de la solarización del suelo para controlar el patógeno se ha demostrado en huertos infestados (Gallo *et al.*, 2007 b; DAISIE, 2017).
- **Químico:** la eficacia de algunos productos químicos, especialmente Fosetil-Al y el ácido fosfórico, ha sido probada contra *P. cinnamomi*; sin embargo, los tratamientos químicos no detienen por completo la enfermedad y ha quedado demostrada la resistencia de *P. cinnamomi* a estos fungicidas. La aplicación de fungicidas se puede considerar en algunas situaciones, por ejemplo, para

detener la extensión de la enfermedad o para preservar la flora amenazada (Coffey, 1985; Bezuidenhout *et al.*, 1987; DAISIE, 2017).

- **Biológico:** se ha demostrado que algunos suelos son "supresivos", es decir, que previenen la expresión de la enfermedad, lo que puede atribuirse a niveles más altos de microflora antagonista. El uso de agentes biológicos como *Trichoderma harzianum* ha mostrado la capacidad de reducir el progreso de la enfermedad. El "sistema Ashburner", basado en enmiendas al suelo y cultivos de cobertura para promover la supresión del suelo, se ha utilizado con éxito en los palmerales infestados (Lara-Chávez *et al.*, 2011; Ramírez, 2013; DAISIE, 2017).
- **Genético:** el uso de portainjertos que presenten resistencia a la enfermedad se tiene como alternativa sustentable a largo plazo. En la actualidad hay varios disponibles en el mercado, entre ellos están: el portainjerto 'Merensky 2' ('Dusa'®) que presenta un buen nivel de resistencia y una adecuada producción, el portainjerto 'Duke 7' que actualmente es considerado moderadamente resistente. El portainjerto 'Bounty' que presenta resistencia similar a la de 'Duke 7', y el portainjerto 'Velvick' que tiene una resistencia mediana a alta a *P. cinnamomi*. Hay portainjertos nuevos recomendados, como 'Zentmyer', 'Uzi', 'Steddom' y 'Julian' que también pueden estar disponibles. Hay que tener en cuenta que los portainjertos resistentes no son inmunes si son plantados o mantenidos en condiciones adversas y pueden ser eliminados por la combinación de condiciones adversas y el patógeno (Barrientos-Priego, 2017; Eskalen y Faber, 2017; DAISIE, 2017).

## **2.12. Métodos de Evaluación de la Resistencia a *P. cinnamomi* en *P. americana***

La resistencia a *P. cinnamomi* en genotipos de aguacate se ha buscado en los recursos fitogenéticos más conocidos del germoplasma que presenta resistencia. Los métodos empleados para determinar la resistencia de *P. americana* a *P. cinnamomi* se han venido desarrollando desde la década de 1950 con las investigaciones del Dr. Zentmyer y su grupo de trabajo en la Universidad de California Riverside, EE. UU., con materiales recolectados en diferentes países de América Latina (Zentmyer y Schieber, 1987, 1992).

La resistencia del aguacate a *P. cinnamomi* ha sido determinada mediante el uso de diferentes métodos tanto directos como indirectos, entre los cuales se encuentran el uso de soluciones nutritivas con material de infección, macetas y camas germinadoras con suelo infestado, callos de tejido inoculado, plantaciones en campos infestados y, con base en cambios de la conductividad eléctrica en recipientes con fragmentos de raíz inoculados con el patógeno (Salgado y Fucikovsky, 1996).

Dolan y Coffey (1986) desarrollaron una técnica de laboratorio utilizando inoculaciones con zoosporas de *P. cinnamomi*, para determinar la utilidad del tejido etiolado en la predicción de resistencia en portainjertos. Piezas de tallos etiolados fueron inoculadas de manera puntual con las zoosporas y el desarrollo del patógeno fue medido como longitud de la lesión, severidad de la lesión y recuperación del patógeno del tejido infectado. De igual manera se inocularon raíces generadas a partir del tejido etiolado para determinar si había correlación entre los tejidos de tallo etiolado y el tejido

radicular. Se obtuvo que, existía correspondencia entre los resultados obtenidos en tallo etiolado y raíces, por lo que la técnica era promisoría para la determinación de resistencia en portainjertos; sin embargo, después de repetir el experimento bajo condiciones de invernadero, se encontró que la técnica es útil para predecir resistencia, mas no tolerancia.

Zilberstein y Pinkas (1987) desarrollaron un método de escrutinio para diferenciar entre portainjertos de aguacate resistentes y susceptibles a *P. cinnamomi*. Fragmentos de puntas de raíz fueron incubados en agua bidestilada con una suspensión de zoosporas de *P. cinnamomi* a 24 °C en la oscuridad. El cambio en la conductividad eléctrica en la solución fue medido a las 24, 48 y 72 h después de la inoculación. Los portainjertos resistentes ('Duke 7' y 'G6') presentaron significativamente menor incremento en la conductividad eléctrica que los portainjertos susceptibles.

Ruíz-Rosado *et al.* (1992) evaluaron la resistencia de 'Duke 7' y 'Semil 34' a *P.cinnamomi* midiendo el crecimiento de micelio sobre callos, encontrando que en los callos de 'Semill 34' había una colonización completa por parte del micelio a los 4 días después de la inoculación, mientras que en los callos de 'Duke 7' se encontró un efecto inhibitorio en el crecimiento del micelio en tres de siete aislados de *P. cinnamomi*.

Dizon *et al.* (2000) utilizaron callos de tres cultivares de aguacate para predecir resistencia a *P. cinnamomi* mediante la atracción de micelio, encontrado que en los materiales resistentes el crecimiento del micelio se limitó a la parte inferior del callo,

mientras que en los cultivares susceptibles el micelio fue denso, profuso y prolífico, lo que mostró que este era un método efectivo para determinar resistencia.

Gabor y Coffey (1991) compararon métodos rápidos para evaluar resistencia a *P. cinnamomi* en diferentes portainjertos, probaron el método de cortes de brotes etiolados, cortes de raíces y sistemas de raíces intactas, encontraron que el mejor método fue el de sistema de raíces intactas debido a que se obtenían resultados mucho más cercanos a los obtenidos en pruebas de campo.

Drenth y Sendal (2001) recomiendan diferentes técnicas para evaluar la resistencia a *P. cinnamomi*, entre las que se encuentran:

1. Inoculación de esporangios en tejido de la hoja o fruta.
2. Inserción de micelio en los tallos de las plántulas jóvenes.
3. Inserción de piezas de agar con micelio en agujeros en el tallo adulto (leñoso) de las plantas.
4. Inoculación de suelo y siembra de plantas jóvenes en tierra infectada.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del Experimento**

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en un invernadero del Centro de Agricultura Protegida, y en los Laboratorios de Nutrición y Calidad de los Alimentos, de Biotecnología, y de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus de Ciencias Agropecuarias, en el municipio de General Escobedo, N.L. Además del Laboratorio de Genética de la misma Facultad en la Unidad Académica Marín, en el municipio de Marín, N.L.

#### **3.2. Material Vegetal**

Se utilizaron diez genotipos recolectados en los municipios de Aramberri y General Zaragoza, Nuevo León, México: 1) 'Bola', 2) 'Criollo 3', 3) 'Criollo 6', 4) 'Leonor', 5) 'María Elena', 6) 'Plátano', 7) 'Plátano Delgado', 8) 'Plátano Temprano', 9) 'Silvestre', 10) 'Todo el año'. Adicionalmente se incluyeron los genotipos 'Hass' (raza Mexicana x raza Guatemalteca, proveniente de semilla) como testigo susceptible (Ramírez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2017) y 'Duke 7' (raza Mexicana, de origen clonal) como testigo moderadamente resistente (Coffey, 1987).

### **3.2.1. Propagación por Semilla**

Para la obtención de las plántulas, se sembraron 20 semillas de aguacate de cada genotipo en contenedores de policloruro de vinilo (PVC) con capacidad de 2 L de sustrato, el cual consistió en una mezcla de “peat-moss”, perlita y vermiculita en proporciones 3:1:1.

Antes de la siembra, las semillas fueron lavadas con jabón y agua corriente, posteriormente se les retiró la cubierta seminal, se les hizo un raspado a los cotiledones excepto en la parte apical y basal de la semilla para promover la germinación y se trataron con solución de benomilo  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los contenedores se mantuvieron en el interior del invernadero hasta 7 meses después de la siembra. El riego de las plántulas se hizo con agua corriente.

La fertilización de las plántulas consistió en una primera aplicación de la fórmula 15 - 30 - 15 + Mg (1 %) + Zn (1000 ppm) + B (1000 ppm) durante el riego a razón de  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a los 4 meses después de la siembra, una segunda aplicación una semana después y una tercera aplicación un mes después de la primera aplicación. Al cumplirse los 6 y 7 meses después de la siembra se aplicó la fórmula 18-18-18 durante el riego a razón de  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **3.3. Material Patogénico**

Como material patogénico se utilizaron dos aislamientos de *P. cinnamomi*, donados por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio del Laboratorio de Fitopatología II, de la Facultad

de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Uruapan, México). Los aislados se hicieron crecer en placas Petri conteniendo medio de jugo V8® agar clarificado (200 ml·L<sup>-1</sup> de jugo V8®, 2 g·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, 15 g·L<sup>-1</sup> de agar y 800 ml·L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O bidestilada, clarificado por centrifugación) preparado de acuerdo con Zentmyer *et al.* (1976), incubado a 25 °C por cinco días en oscuridad.

### **3.4. Identificación de la Actividad de Enzimas Degradadoras de la Pared Celular (EDPC) de Aislados de *P. cinnamomi***

La detección en placa de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de componentes de la pared celular vegetal fue realizada con base en la metodología mencionada por Gutiérrez-Soto *et al.* (2015). El medio base consistió en: 0.1 % triptona, 0.01 % extracto de levadura, y 2 % agar, el cual fue suplementado con diferentes fuentes de carbono o colorantes según la actividad enzimática a revelar. En el Cuadro 1 se mencionan los diferentes tipos de actividad enzimática a revelar y el suplemento utilizado correspondiente.

Cuadro 1. Actividades enzimáticas y sustratos.

<b>Actividad</b>	<b>Sustrato</b>
Xilanasa	2 % Xilano
Pectinasa	2 % Pectina de cítricos
Amilasa	2 % Almidón
Celulasa	2 % Carboximetil celulosa
Ligninasa	0.02 % Poly-R478 + 0.2 % glucosa

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1.05 Kg·cm<sup>-2</sup> durante 15 min, después se vertieron en placas Petri. Una vez que los medios solidificaron, se inocularon con un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio tomado de

los márgenes de un cultivo de *P. cinnamomi* con 5 días de crecimiento en medio Jugo V8® agar clarificado (Zentmyer *et al.*, 1976).

Las placas Petri inoculadas se incubaron a 25 °C durante 3 días y se registró el diámetro de crecimiento y el diámetro de la zona degradación (zona de decoloración del medio) en milímetros. El revelado de xilanasa, pectinasa, amilasa y celulasa se realizó mediante la adición de solución de yodo de Gram sobre la placa. Para la detección de ligninasa fue registrada la depolimerización del Poly-R478 a los 3, 15 ó 30 días de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo placas sin inocular como testigos negativos, se evaluaron dos aislados de *P. cinnamomi* (Pc1 y Pc2).

### 3.4.1. Índice de Degradación

Con los datos registrados para cada uno de los ensayos con los diferentes aislados se calculó el Índice de Degradación (ID) mediante la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{\textit{diámetro de degradación}}{\textit{diámetro de crecimiento}}$$

Para la interpretación de resultados y la selección del aislado con mayor producción de enzimas degradadoras de los componentes de pared celular fue utilizado el Cuadro 2; donde de acuerdo con el valor de ID obtenido, bajo el supuesto de que a mayor actividad enzimática, el oomiceto tendrá una mayor capacidad para penetrar e infectar las plántulas.

Cuadro 2. Interpretación del valor de ID (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015).

Índice	Descripción
$\leq 1$	Área de reacción es menor o igual al área de crecimiento.
1.1-1.9	Área de reacción es mayor al área de crecimiento, pero no la duplica.
$\geq 2$	Área de reacción es mayor al doble del área de crecimiento.

### 3.5. Evaluación de la Resistencia a *P. cinnamomi* en Genotipos de Aguacate

#### Raza Mexicana Mediante Conductividad Eléctrica (CE)

Se utilizaron cinco plántulas de seis meses de edad por genotipo de aguacate, a cada plántula se le retiró el sustrato mediante inmersión en un contenedor con agua, después se tomaron seis fragmentos de raíz de 40 mm de longitud y se enjuagaron con agua bidestilada, cinco se depositaron en un vaso de 25 ml de capacidad con 20 ml de agua bidestilada, el sexto fragmento se colocó en un vaso con 20 ml de agua bidestilada sin inocular que se utilizó como testigo. Un doble testigo consistió en un vaso con 20 ml de agua bidestilada sin fragmentos de raíz que fue inoculado con la suspensión de micelio. Se probaron dos aislados de *P. cinnamomi* (Pc1 y Pc2).

#### 3.5.1. Incremento del Inóculo

Se prepararon cuatro matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio Jugo V8® líquido clarificado (200 ml·L<sup>-1</sup> de jugo V8®, 2 g·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, y 800 ml·L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O bidestilada, clarificado por centrifugación) preparado de acuerdo a Zentmyer *et al.* (1976). Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1.05 Kg·cm<sup>-2</sup> durante 15 min y se inocularon con ocho discos de 0.5 cm de diámetro tomados de los márgenes del cultivo con crecimiento de micelio. Se dejó crecer el micelio durante 7 días en oscuridad a 25 °C sobre un agitador orbital a 200 rpm.

### **3.5.1.1. Inoculación**

El contenido de dos matraces de cada aislado se homogenizó y se inoculó con 0.5 ml de suspensión de micelio ( $85 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de *P. cinnamomi* en cada vaso con fragmentos de raíz. Para determinar la concentración del oomiceto se tomaron dos volúmenes de 50 ml del homogenizado y se filtraron con un filtro Whatman® No. 1, y se dejaron secar a 60 °C hasta obtener un peso constante. Se determinó la concentración del oomiceto en peso seco sobre volumen. Se registró la conductividad eléctrica a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h con un conductímetro (HI9814, HANNA INSTRUMENTS, EE. UU.) para cada uno de los tratamientos, enjuagando la sonda con agua bidestilada entre la toma de cada lectura para evitar contaminación cruzada.

### **3.5.2. Diseño Experimental**

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial A x B, donde el factor A corresponde a los doce genotipos de aguacate y el factor B corresponde a los dos aislados de *P. cinnamomi*, dando un total de 24 tratamientos con cinco repeticiones cada uno. El análisis de varianza y la comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se realizó utilizando el programa estadístico Diseños Experimentales FAUANL v. 1.6 (Olivares-Sáenz, 2015).

## **3.6. Evaluación de la Resistencia a *P. cinnamomi* en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Inoculación de Plántulas.**

Se utilizaron doce plántulas de seis meses de edad por cada genotipo, a cada plántula se le retiró el sustrato mediante inmersión en un contenedor con agua, se le removieron

los cotiledones y se trasplantaron inmediatamente en un contenedor de 102 L de capacidad conteniendo como sustrato una mezcla de vermiculita y tierra para maceta en proporción 1:1. La tierra para maceta fue esterilizada en autoclave a 121 °C y 1.05 Kg·cm<sup>-2</sup> durante 2 h. En cada contenedor se sembraron doce plántulas equidistantes, una por cada genotipo. El riego de las plántulas fue realizado con agua de pozo procurando mantener el sustrato con humedad para favorecer la infección y aparición de los síntomas de la enfermedad.

### **3.6.1. Incremento del Inóculo**

Se prepararon 200 ml de medio Jugo V8® líquido clarificado (200 ml·L<sup>-1</sup> de jugo V8®, 2 g·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, y 800 ml·L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O bidestilada, clarificado por centrifugación) de acuerdo con Zentmyer *et al.* (1976) en diez matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1.05 Kg·cm<sup>-2</sup> durante 15 min y se inocularon cada uno con doce discos de 0.5 cm de diámetro tomados de los márgenes de un cultivo con crecimiento de micelio del aislado Pc2, el cual fue seleccionado con base en los resultados obtenidos en los ensayos de actividad enzimática y conductividad eléctrica. Se dejó crecer el micelio durante 13 días en oscuridad a 25 °C sobre un agitador orbital a 200 rpm.

#### **3.6.1.1. Inoculación**

El contenido de siete matraces fue homogenizado, las plántulas fueron inoculadas con 10 ml de este homogenizado, inyectando la solución al sustrato en la base de la plántula, a una distancia de 3 cm del tallo y a 10 cm de profundidad. Para determinar

la concentración de la suspensión del micelio, tres volúmenes de 10 ml del homogenizado se filtraron utilizando un filtro Whatman® No. 1, y se dejaron secar a 60 °C, hasta obtener un peso constante, la concentración de la suspensión de micelio utilizada fue de 128 mg·ml<sup>-1</sup>. A las 48 h después de la inoculación, las plántulas se sometieron a condiciones de inundación por un periodo de 48 h para favorecer el proceso infectivo de *P. cinnamomi*. Posteriormente se permitió el drenaje del exceso de agua vertiendo el infiltrado en un recipiente con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % antes de descartarla.

### **3.6.2. Variable Respuesta de las Plántulas**

Después de tres semanas de la inoculación, se evaluaron las plántulas cada tres días, durante 8 semanas. La variable evaluada fue la respuesta de las plántulas al daño en la parte aérea con base en una escala visual de severidad (Figura 2). Al finalizar la cuarta semana de evaluación, las plántulas se sometieron nuevamente a condiciones de inundación por un periodo de 48 h para reactivar el oomiceto y asegurar que las plántulas sobrevivientes, presentaran resistencia.

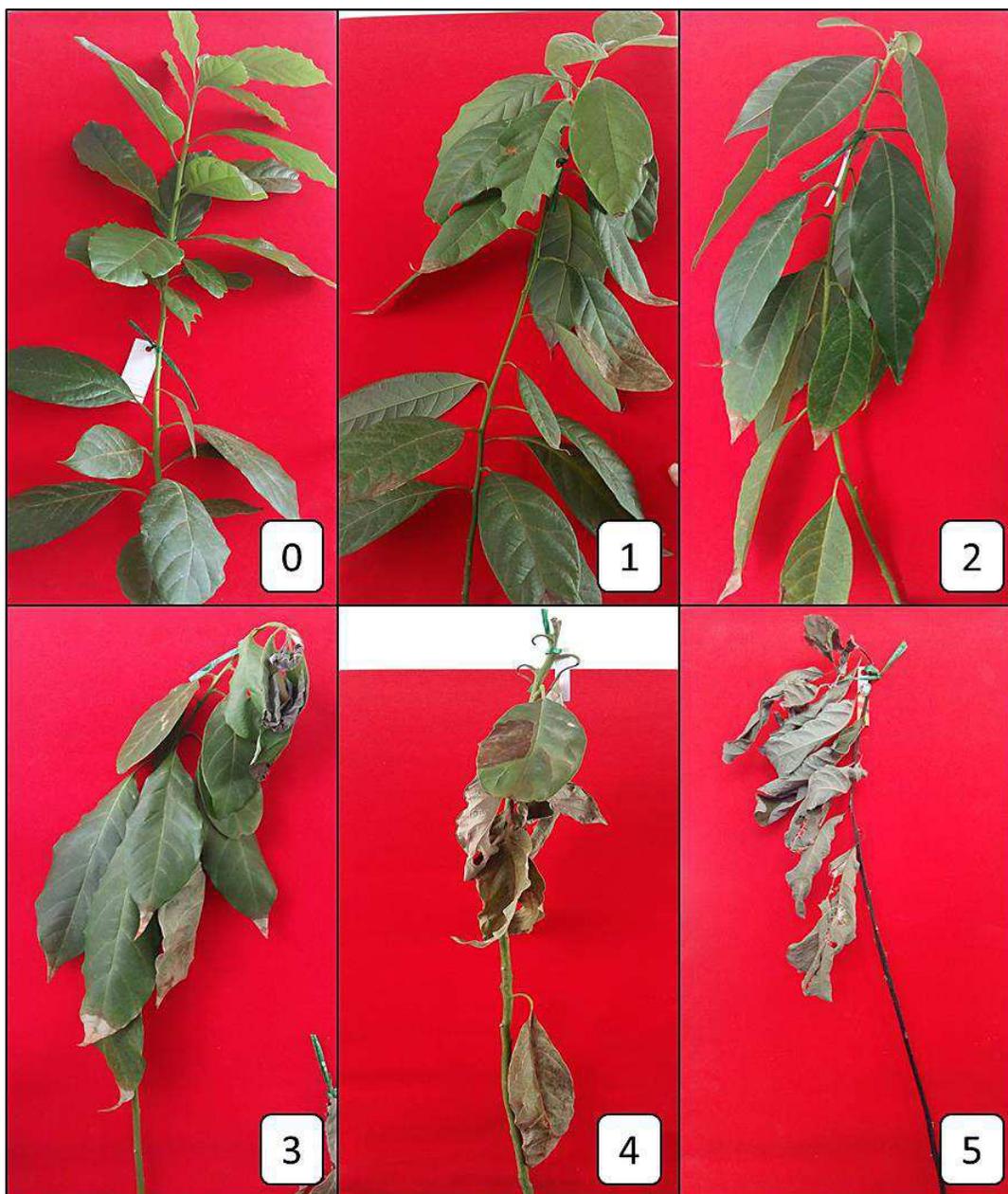


Figura 2. Escala de severidad de daños en parte aérea por *P. cinnamomi*, 0= plántula sana; 1= daño leve (plántula con ligero decaimiento de hojas); 2= daño medio (plántula con decaimiento medio de hojas); 3= daño severo (plántula con decaimiento total de hojas e inicio de muerte apical); 4= daño muy severo (plántula con 90 - 100 % de área foliar muerta, tallo verde) y 5= plántula muerta.

### **3.6.3. Diseño Experimental**

El diseño experimental que se empleó fue bloques completos al azar con diez repeticiones por tratamiento, el parámetro de bloqueo fue el número de nudos de la plántula. Con los datos obtenidos de la severidad del daño en la parte aérea se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y se construyó una escala de susceptibilidad para los genotipos evaluados a partir del área bajo la curva del progreso de la enfermedad relativa (ABCPEr), con los valores de la escala se clasificaron los genotipos como “resistentes (0-1.5)”, “moderadamente resistentes (1.6-3.0)”, “susceptibles (3.1-4.5)”, y “muy susceptibles (4.6-5)”. Los datos se analizaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, 2016. Los valores del número de plántulas muertas y de plántulas asintomáticas entre genotipos se contrastaron mediante la prueba de  $X^2$  (Andrade-Hoyos *et al.*, 2015) y se analizaron utilizando el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics versión 19.

### **3.6.4. Detección de *P. cinnamomi* en Plántulas**

La presencia del patógeno en raíces se verificó al finalizar el experimento por reaislamiento y detección molecular en extracto crudo de raíces.

#### **3.6.4.1. Detección visual**

A cada plántula se le cortaron cuatro fragmentos al azar de raíces de 1 cm aproximadamente, los cuales se lavaron con agua de grifo hasta eliminar los restos de suelo. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril, se les

retiró el exceso de humedad con papel absorbente estéril y fueron colocados en cajas Petri con medio de cultivo PDA acidificado y suplementado con antibiótico y fungicida (PDA 39 g·L<sup>-1</sup>, ácido tartárico 0.14 % p·v<sup>-1</sup>, amoxicilina 100 µg·ml<sup>-1</sup> y benomilo 10 µg·ml<sup>-1</sup>) e incubados a 25 °C durante una semana. Transcurrida la semana, se confirmó la presencia de *P. cinnamomi* mediante la observación en microscopio de las características morfológicas de su micelio (Zentmyer, 1980).

#### **3.6.4.2. Detección molecular**

La detección se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de fragmentos de raíz recuperada de seis plántulas sintomáticas, seis plántulas asintomáticas y seis plántulas testigo.

**3.6.4.2.1. Extracción, integridad, cuantificación y calidad del ADN.** El procedimiento para la extracción de ADN de raíces de aguacate se realizó con base en el protocolo modificado de Cheng *et al.* (1997) y Hoisington *et al.* (1994) (Apéndice 1), la cuantificación del ADN extraído fue determinada por espectrofotometría con el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.). Se cuantificó la absorbancia a 260 nm y la calidad fue determinada utilizando el cociente de la relación de las lecturas de la absorbancia de A 260 nm/A 280 nm proporcionado por el programa del equipo, considerando como ADN de calidad un coeficiente de entre 1.6 a 1.8. Para verificar la calidad e integridad del ADN se cargaron 10 µl de muestra teñida con 2 µl de solución GelRed™ (Biotium, EE. UU.) y 2 µl de amortiguador de carga, en geles de agarosa al

2 % con TBE 1X; la electroforesis se realizó a 80 V, durante una hora a temperatura ambiente.

**3.6.4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la amplificación del marcador molecular se utilizaron los iniciadores específicos para la especie diseñados por Kong *et al.* (2003), LPV3-F(5'-3')-GTGCAGACTGTCGATGTG y LPV3-R(5'-3')-GAACCACAACAGGCACGT, los cuales amplifican un fragmento de 450 pb de una región codificante para proteínas putativas de almacenamiento en las vesículas de las zoosporas. Los componentes de la mezcla de reacción y su concentración final se indican en el Cuadro 3, mientras que el programa térmico se indica en el Cuadro 4. Para confirmar la amplificación del fragmento esperado, se cargaron 10 µl de muestra del producto de PCR teñidos con 2 µl de solución GelRed™ (1:10 000) (Biotium, E.U.A) y 2 µl de amortiguador de carga, en geles de agarosa al 2 % con TBE 1X, la electroforesis se realizó a 80 V durante 1.5 h a temperatura ambiente.

Cuadro 3. Mezcla de reacción para PCR.

<b>Componente</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen por reacción (µl)</b>
ddH <sub>2</sub> O	-----	5.90
Buffer Taq 5X	1X	3.00
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 mM	1.20
dNTP mezcla 10 mM	0.4 mM	0.15
Tween® 20 %	0.01 %	0.15
Taq polimerasa (5U/µl)	0.5 U	0.10
Iniciador LPV3 F 6 µM	0.4 µM	1.00
Iniciador LPV3 R 6 µM	0.4 µM	1.00
ADN 10 ng/µl	25 ng	2.50
<b>Volumen Total</b>	-----	<b>15</b>

Cuadro 4. Programa térmico para PCR.

<b>1 ciclo de:</b>	<b>45 ciclos de:</b>	<b>1 ciclo de:</b>
95 °C x 2 min	95 °C x 30 s	72 °C x 5 min
	60 °C x 1 min	
	72 °C x 1 min	

**3.6.4.2.3. Secuenciación de fragmentos.** Para verificar la identidad del aislado recuperado, siete productos de PCR se purificaron utilizando el estuche comercial Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE. UU.) y se enviaron a secuenciar a la empresa Eurofins MWG Operon (EE. UU.). Para la secuenciación se utilizó el iniciador LPV3-F. Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa informático Chromas Lite V.2.6.1, se alinearon con los programas GENTle V.1.9.4 y CodonCode Aligner V.7.1.2, para determinar similitud entre fragmentos. Posteriormente, se analizaron las secuencias mediante comparación con la colección de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Identificación de la Actividad de Enzimas Degradadoras de la Pared Celular (EDPC) de Aislados de *P. cinnamomi*

En la Figura 3 se muestran los resultados de la detección e identificación de enzimas degradadoras de los componentes de la pared celular vegetal.

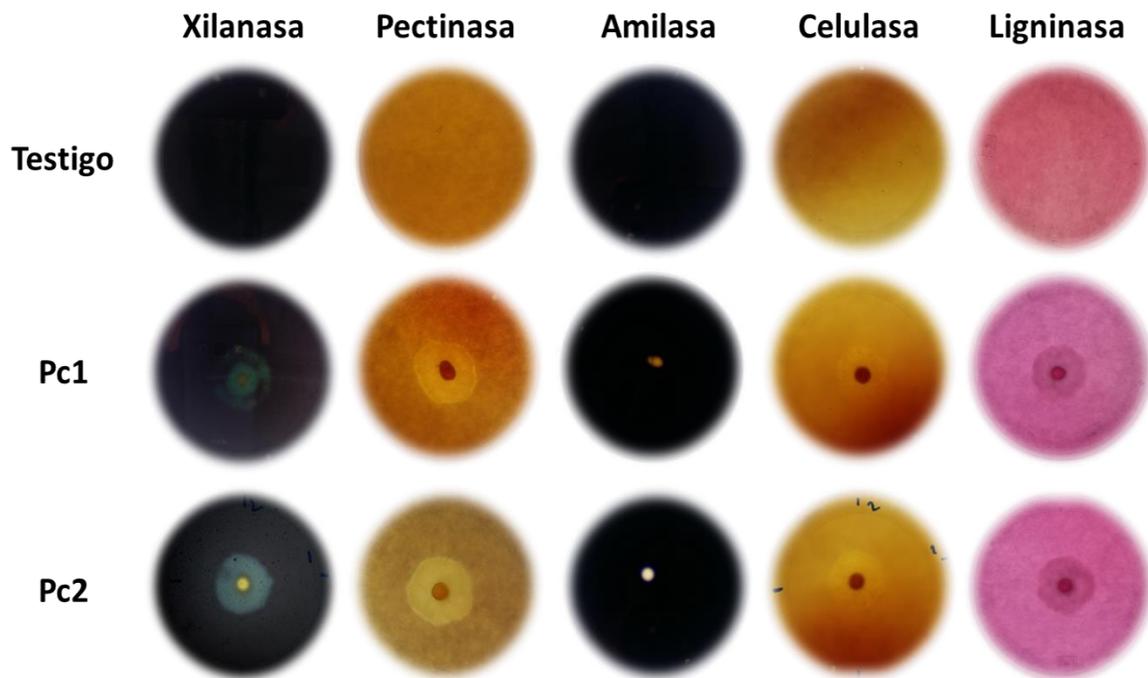


Figura 3. Hidrólisis de sustrato para cada actividad enzimática de dos aislados de *Phytophthora cinnamomi*.

Bajo las condiciones de cultivo, el aislado Pc1 fue productor de pectinasa y amilasa. En medio con xilano fue observada degradación parcial equivalente al área de crecimiento, sugiriendo baja producción de xilanasa. El aislado Pc2 fue productor de xilanasa, pectinasa, amilasa y celulasa. En ambos aislados no fue observada actividad lignolítica.

El aislado Pc2 presentó índice de degradación (ID) de  $\geq 1.0$  para xilanasa, pectinasa y celulasa (Figura 4). En el aislado Pc1 fue observada principalmente actividad hidrolítica de pectinasas (ID = 1.0). Ambos aislados mostraron baja actividad amilolítica (ID < 0.5).

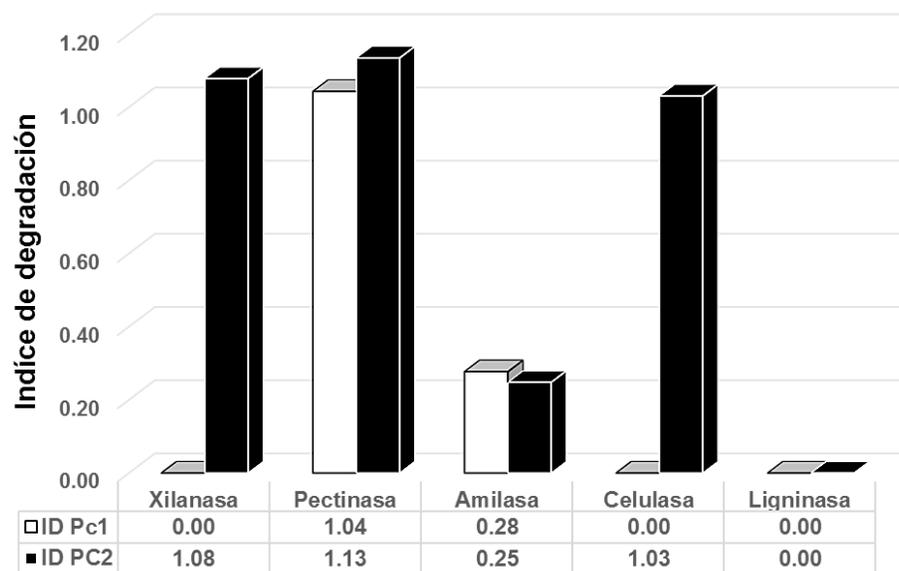


Figura 4. Valores obtenidos en los índices de degradación de enzimas para ambos aislados de *P. cinnamomi*.

El hecho de que en el aislado Pc2 se hayan detectado actividades pectinasa, amilasa, xilanasa y celulasa, en comparación con el aislado Pc1, que solo presentó tipo pectinasa y amilasa, podría implicar una ventaja en el proceso infeccioso de Pc2. Al

producir un mayor tipo de enzimas degradadoras de la pared celular, facilitaría la penetración del tejido vegetal por el oomiceto, debido a que existe una relación directa entre la patogenicidad y la producción de enzimas degradadoras de la pared celular por los fitopatógenos (Jia *et al.*, 2009).

En la pared celular primaria, microfibrillas de celulosa están unidas no covalentemente a hemicelulosa, y a su vez, la red de celulosa y hemicelulosa esta embebida en un gel de pectina; la pectina también es un componente de la lamela media que sostiene unidas a las células vegetales vecinas. Los fitopatógenos filamentosos penetran las células del hospedero a través de acción enzimática y presión mecánica, por lo que la pared celular es un factor clave en las interacciones planta-patógeno ya que puede constituir una barrera de penetración y colonización para el patógeno, así como estar involucrada en las respuestas de defensa del hospedero (Götesson *et al.*, 2002).

La mayoría de las investigaciones sobre enzimas degradadoras de la pared celular están concentradas en las pectinasas, ya que la degradación enzimática de la pectina debilita la pared celular y expone otros componentes a otras enzimas como celulasas y hemicelulasas, además de proveer recursos de carbono para el patógeno (Jia *et al.*, 2009).

Para degradar la pectina el patógeno produce un conjunto de enzimas depolimerizadoras. Una posible vía de degradación inicia con la de-esterificación de la pectina en metanol y ácido poligalacturónico por la enzima pectina metilesterasa. Después, las endo- y exo- poligalacturonasas continúan con el rompimiento de los

enlaces glucosídicos por hidrólisis mientras que las pectato liasas rompen el ácido poligalacturónico en oligogalacturonidos por beta eliminación. Otra alternativa de degradación es la pectina liasa que es hábil de depolimerizar pectina nativa vía beta eliminación en residuos galacturónidos metilados (Reignault *et al.*, 2008).

Por otro lado, las 1,3-B-glucanasas hidrolizan componentes de la pared celular de plantas y hongos. En oomicetos, las glucanasas han sido estudiadas a nivel bioquímico por su posible función en el crecimiento y bifurcación de puntas de hifa, donde se cree hay un balance delicado entre la síntesis de pared celular e hidrólisis (Meirinho *et al.*, 2010).

Hasta el momento, el conocimiento sobre enzimas degradadoras de la pared celular en *P. cinnamomi* es limitado. Sin embargo, se han encontrado algunos genes de *P. cinnamomi* u otras especies de *Phytophthora* con similitud significativa a enzimas degradadoras como las cutinasas, proteasas, endo- y exo- glucanasas y quitinasas, en bibliotecas de EST, y se les relaciona con facilitar la infección mediante el rompimiento de barreras físicas en las plantas (Huitema *et al.*, 2004). Algunos de estos genes que se han caracterizado a detalle, incluyen fosfolipasas (Nespoulous *et al.*, 1999), una B-glucosidasa/xilosidasa (Brunner *et al.*, 2002), exo-1,3-B-glucanasas y endo-1,3-B-glucanasa (McLeod *et al.*, 2003) y endopoligalactronasas (endoPGs) (Götesson *et al.*, 2002; Torto *et al.*, 2002)

## 4.2. Evaluación de la Resistencia a *P. cinnamomi* en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Conductividad Eléctrica (CE)

Los doce genotipos de aguacate mostraron un incremento en la conductividad eléctrica a través del tiempo cuando fueron inoculados con los aislados de *P. cinnamomi* (Figura 5), mientras que los testigos sin inocular presentaron la tendencia a ser estables, salvo los genotipos 'Duke 7' y 'Hass' que presentaron un pequeño incremento en su CE. Sin embargo, a partir de las 72 h se observó una reducción en el cambio de la CE en el genotipo 'Duke 7', además la CE en el genotipo 'Hass' tendió a estabilizarse en la inoculación con Pc1 y disminuyó cuando se encontraba inoculado con Pc2.

El genotipo 'Bola' fue el más susceptible al presentar el valor de incremento más alto de CE con  $0.640 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , seguido por 'Criollo 3' ( $0.594 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y 'Leonor' ( $0.566 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) para el caso de la inoculación con Pc1. En cambio, para la inoculación con Pc2 los genotipos más susceptibles fueron 'Leonor' con  $0.754 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 'Criollo 6' con  $0.668 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  y 'Plátano Temprano' con  $0.664 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . El genotipo 'Duke 7' se comportó como el más resistente al presentar el menor valor de incremento de CE tanto para el aislado Pc1 ( $0.044 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y Pc2 ( $0.238 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). A pesar de que el genotipo 'Hass' ha sido reportado como susceptible (Ramírez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2017), en este estudio se encontró que pudiera presentar cierto nivel de resistencia a *P. cinnamomi*, ya que para ambos aislados fue el segundo genotipo en presentar menor valor de incremento de CE después del genotipo 'Duke 7', con valores de  $0.364 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  para Pc1 y  $0.384 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  para Pc2.

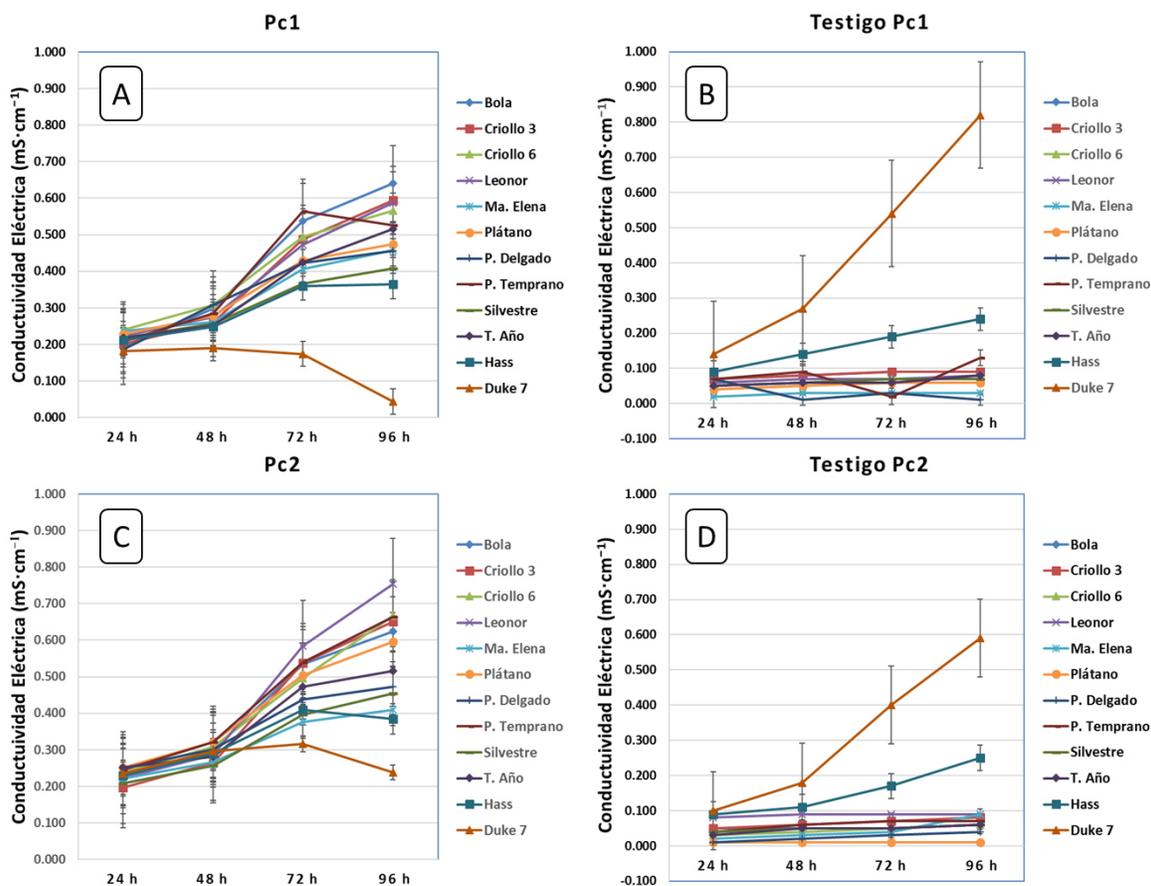


Figura 5. Cambio en la conductividad eléctrica de los genotipos a través del tiempo. A) y C) 12 genotipos de aguacate evaluados para resistencia con dos aislados de *Phytophthora cinnamomi* Pc1 y Pc2, respectivamente. B) y D) genotipos sin inocular con Pc1 y Pc2.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) para los genotipos de aguacate y los aislados de *P. cinnamomi*, mientras que para la interacción genotipos x aislados no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza.

<b>Factor</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Genotipos	11	2.408	0.219	20.966	0.000
Aislados	1	0.132	0.132	12.641	0.001
Genotipos x Aislados	11	0.163	0.015	1.419	0.177
Error	96	1.002	0.010		
Total	119	3.706			

Durante la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se identificó el genotipo 'Duke 7' como resistente al presentar el valor promedio más bajo de CE de los diferentes genotipos evaluados (Figura 6). Las diferencias presentadas por los genotipos en el nivel de susceptibilidad o resistencia pueden ser resultado de las diferencias que existen a nivel genético, fisiológico y bioquímico presentado por los genotipos y aislados de *P. cinnamomi*, así como su interacción con el ambiente.

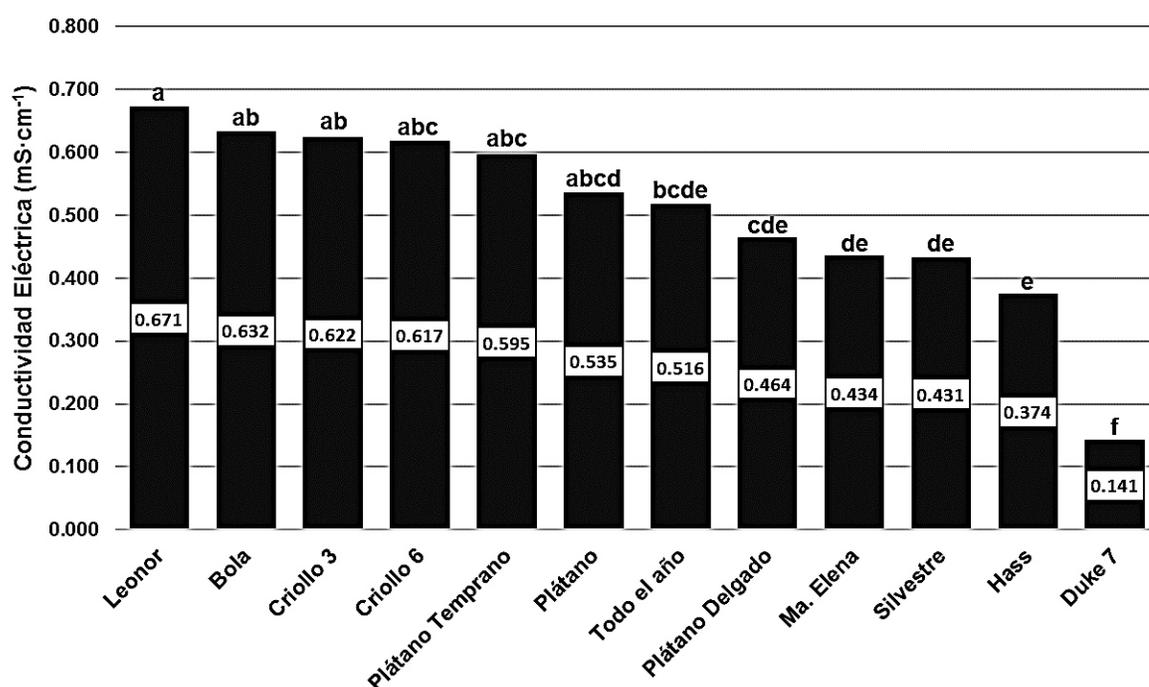


Figura 6. Medias de conductividad eléctrica para raíces de genotipos de aguacate sometidos a *Phytophthora cinnamomi*. Letras diferentes marcan diferencia significativa (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

Los resultados obtenidos para el genotipo 'Duke 7' coinciden a los reportados por Zilberstein y Pinkas (1987) y Salgado y Fucikovsky (1996), al corroborar dicho genotipo como resistente debido al bajo valor de CE que presentó respecto a los genotipos que resultaron ser susceptibles. El genotipo 'Hass' mostró un nivel de resistencia moderado, coincidiendo con lo reportado por Neilsen (2016); por otro lado, Smith *et al.*

(2011) indicaron que plántulas de 'Hass' propagadas clonalmente permanecen saludables en suelos con alta presión por *P. cinnamomi*.

El aislado Pc2 de *P. cinnamomi* se registró como el más patogénico al inducir un valor promedio de CE mayor que el aislado Pc1 (Figura 7). Las diferencias de patogenicidad entre aislados de *P. cinnamomi* han sido reportadas anteriormente y pueden ser el resultado de la variabilidad genética dentro de la especie (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2009, 2015).

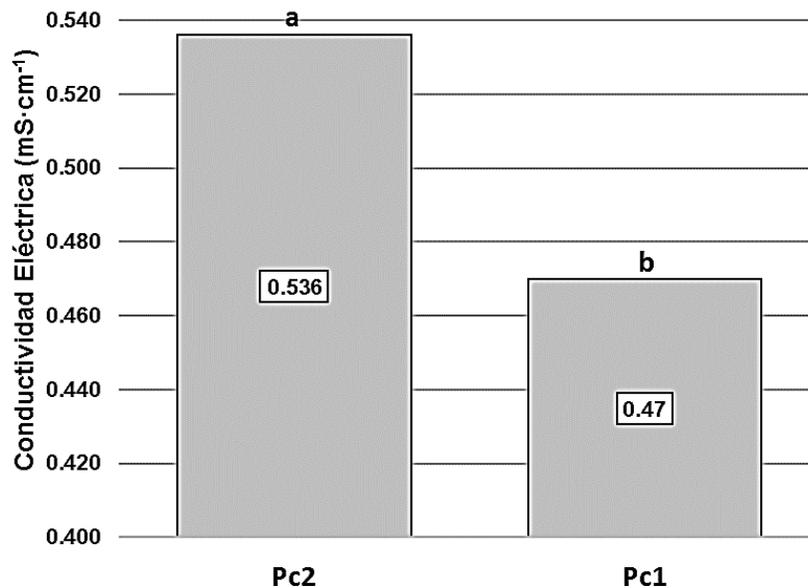


Figura 7. Medias de conductividad eléctrica para los aislados de *Phytophthora cinnamomi*. Letras diferentes marcan diferencia significativa (Tukey  $p \leq 0.05$ )

#### **4.3. Evaluación de la Resistencia a *P. cinnamomi* en Genotipos de Aguacate Raza Mexicana Mediante Inoculación de Plántulas.**

Los síntomas observados en algunas plántulas a las tres semanas después de la inoculación fueron decaimiento foliar general y aparición de necrosis en la parte apical

seguida de una muerte descendente que condujo al marchitamiento y defoliación. Las plántulas sin inocular no presentaron síntomas visibles de la enfermedad (Figura 8).

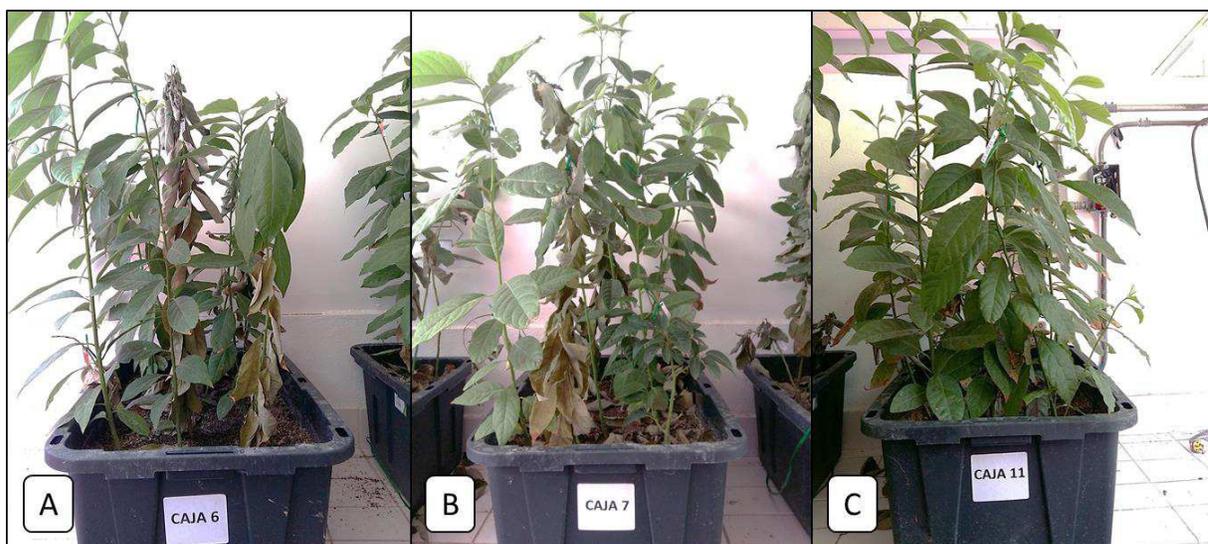


Figura 8. Aparición de síntomas de la enfermedad en plántulas de aguacate. A) y B) Plántulas inoculadas, C) Plántulas sin inocular, con *Phytophthora cinnamomi*.

Durante las primeras ocho semanas de evaluación, los genotipos que presentaron los valores promedio más altos de la escala visual de severidad fueron 'Criollo 3' con un valor 3.5, 'Hass' con un valor de 3.43 y 'Criollo 6' con un valor de 3.4 (Figura 9), quedando en evidencia la susceptibilidad de estos genotipos ante *P. cinnamomi*, el genotipo 'Hass' fue utilizado como testigo susceptible. El genotipo 'Todo el Año' presentó un valor de 0.8 mientras que el genotipo 'Plátano Delgado' presentó un valor de 1, manifestando su posible resistencia al patógeno. A partir de la novena semana, todos los genotipos presentaron un marcado incremento en los valores de la escala visual de severidad. El genotipo 'Todo el Año' fue el que presentó el menor valor promedio al final de 1.5, mientras que los genotipos 'Silvestre' y 'María Elena' con un

valor de 4.9 y 4.7, respectivamente. Los genotipos 'Criollo 3' y 'Duke 7' con un valor de 4.5.

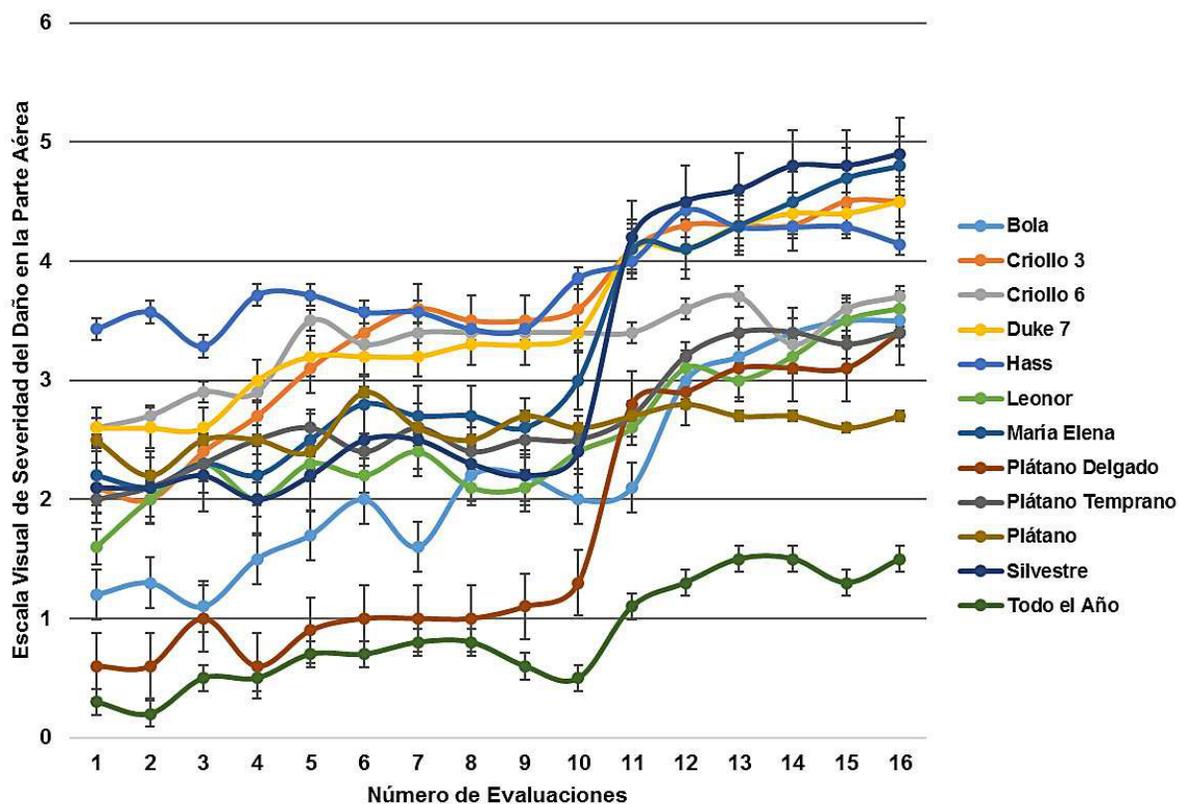


Figura 9. Avance de la enfermedad causada por *Phytophthora cinnamomi* en los genotipos de aguacate evaluados a través del tiempo.

En la clasificación de los genotipos según la escala de susceptibilidad obtenida a partir de los valores de ABCPE y ABCPEr para cada genotipo (Cuadro 6), el genotipo 'Hass' presentó el mayor valor de ABCPE (57.21) y quedó clasificado como muy susceptible con un valor de 5.0 en la escala de susceptibilidad, coincidiendo con lo reportado por Rodríguez *et al.* (2017) al ser el genotipo que presento mayor avance de la enfermedad en su experimento, así como con Ramírez *et al.* (2014) que lo indicaron como susceptible al patógeno en regiones de Colombia.

El genotipo 'Duke 7' a pesar de estar considerado como moderadamente resistente (Coffey, 1987), presentó el segundo valor más alto de ABCPE (52.65) quedando clasificado también como muy susceptible con un valor de 4.6. Zentmyer y Shieber (1987) indicaron que bajo condiciones severas de infección por *P. cinnamomi*, el genotipo 'Duke 7' puede ser afectado, Andrade (2012) indicó en su estudio de selección de portainjertos una mortalidad para 'Duke 7' del 75 %. Sin embargo, este resultado también se puede deber a que el agua de riego utilizada durante el experimento presentó concentraciones de  $3.12 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}^+$  y  $3.53$  de  $\text{Cl}^- \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$  (Apéndice 2), que de acuerdo con Castañeda (2009), estos niveles pueden provocar toxicidad y bajo riesgo de toxicidad, respectivamente, por lo que esta agua solo debe ser usada en cultivos con mediana o alta tolerancia a salinidad ya que provoca salinidad en el suelo y el genotipo 'Duke 7' es susceptible a salinidad. En otros estudios, se ha reportado que los portainjertos raza Mexicana son los más susceptibles a condiciones de salinidad (Lahav *et al.*, 1992; Shalhevet, 1999 y Oster *et al.*, 2007).

Los genotipos 'Criollo 3', 'Criollo 6', 'María Elena' y 'Silvestre' fueron clasificados como muy susceptibles ya que obtuvieron valores de 4.0 a 4.6, mientras que 'Plátano Temprano', 'Plátano' y 'Leonor' con valores de 3.3 a 3.5 se clasificaron como susceptibles. Los genotipos 'Bola' y 'Plátano Delgado' se clasificaron como moderadamente resistentes al presentar valores de 2.9 y 2.2, respectivamente.

El genotipo 'Todo el Año' fue el único en clasificarse como resistente en la escala de susceptibilidad al obtener un valor de 1.1. Dicho genotipo se caracteriza porque produce flores durante dos épocas del año, presenta frutos durante la temporada

considerada como normal para la mayoría de los genotipos (julio-agosto) y en temporada donde los genotipos tienen frutos en desarrollo (marzo-abril).

Cuadro 6. Valores de ABCPE y ABCPEr para genotipos de aguacate, y escala de susceptibilidad a *Phytophthora cinnamomi*.

Genotipo	ABCPE	ABCPEr	Escala de susceptibilidad	Nivel de resistencia
Todo el Año	12.90	0.0086	1.1	Resistente
Plátano Delgado	25.50	0.0170	2.2	Moderadamente resistente
Bola	33.15	0.0221	2.9	Moderadamente resistente
Leonor	37.80	0.0252	3.3	Susceptible
Plátano	39.00	0.0260	3.4	Susceptible
Plátano Temprano	40.60	0.0271	3.5	Susceptible
Silvestre	46.80	0.0312	4.0	Muy susceptible
María Elena	48.10	0.0321	4.2	Muy susceptible
Criollo 6	49.65	0.0331	4.3	Muy susceptible
Criollo 3	52.60	0.0351	4.6	Muy susceptible
Duke 7	52.65	0.0351	4.6	Muy susceptible
Hass	57.21	0.0381	5.0	Muy susceptible

ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad; ABCPEr: ABCPE relativa

Once semanas después de la inoculación se tuvieron un total de 27 plántulas asintomáticas consideradas como resistentes a *P. cinnamomi* de un total de 117 plántulas inoculadas. El 26 % de plántulas asintomáticas correspondió al genotipo 'Todo el Año', un 15 % al genotipo 'Plátano', un 11 % correspondió a cada uno de los genotipos 'Plátano Delgado', 'Plátano Temprano', 'Leonor' y 'Bola', mientras que un 7 % correspondió al genotipo 'Criollo 6' y un 4 % a los genotipos 'Criollo 3' y 'Duke 7' (Figura 10).

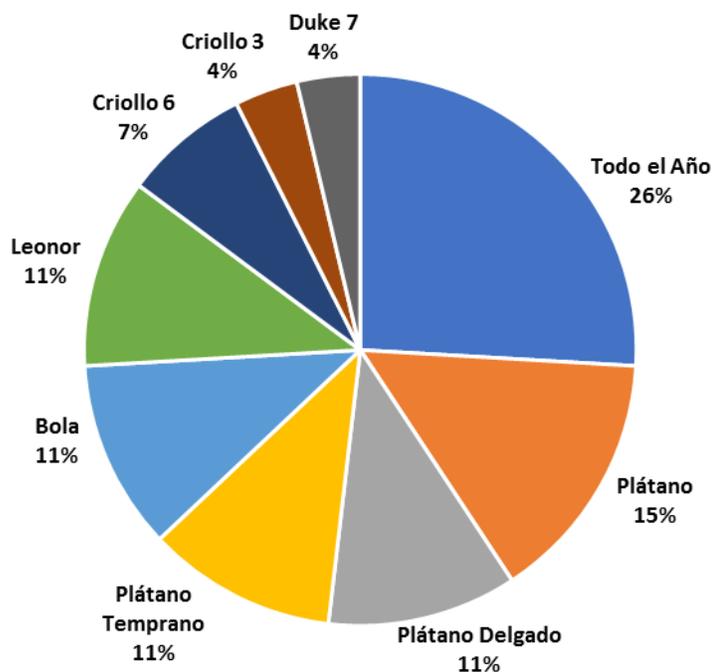


Figura 10. Proporción de plántulas de aguacate asintomáticas por genotipo a *Phytophthora cinnamomi*.

En la prueba de  $X^2$  ( $p < 0.009$ ) se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados (Cuadro 7). El genotipo 'Todo el Año' fue el más resistente al presentar un 70 % de plántulas asintomáticas, seguido por el genotipo 'Plátano' con un 40 %. Los genotipos 'María Elena', 'Silvestre' y el cultivar 'Hass', fueron los más susceptibles al presentar una mortalidad del 100 %. Las diferencias en los niveles de resistencia presentada entre los genotipos son resultado de la alta variabilidad genética encontrada en genotipos provenientes de semilla debido a de la polinización abierta (Andrade-Hoyos *et al.*, 2015). Cabe mencionar que factores como la diversidad patogénica presente en variantes genéticas de *P. cinnamomi* (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2015) y las interacciones entre estas y el hospedero en un ambiente propicio para el desarrollo de la enfermedad, también influyen en el nivel de resistencia presentado.

Cuadro 7. Resultados de la prueba de  $X^2$  de plántulas de aguacate inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*.

Genotipo	Plántulas inoculadas	Plántulas muertas		Plántulas asintomáticas	
		Número	(%)	Número	(%)
Todo el Año	10	3	30	7	70
Plátano	10	6	60	4	40
Plátano Delgado	10	7	70	3	30
Plátano Temprano	10	7	70	3	30
Leonor	10	7	70	3	30
Bola	10	7	70	3	30
Criollo 6	10	8	80	2	20
Criollo 3	10	9	90	1	10
Duke 7	10	9	90	1	10
Hass	7	7	100	0	0
Silvestre	10	10	100	0	0
María Elena	10	10	100	0	0

$X^2 = 25.177$ ,  $p < 0.009$

En la Figura 11 son mostradas las diferencias de daño causado por *P. cinnamomi* en las raíces de plántulas testigo, plántulas susceptibles, plántulas resistentes y plántulas sin inocular. Las plántulas testigo y susceptibles presentaron una marcada disminución en la cantidad de raíces secundarias respecto las plántulas sin inocular y las que presentaron resistencia.

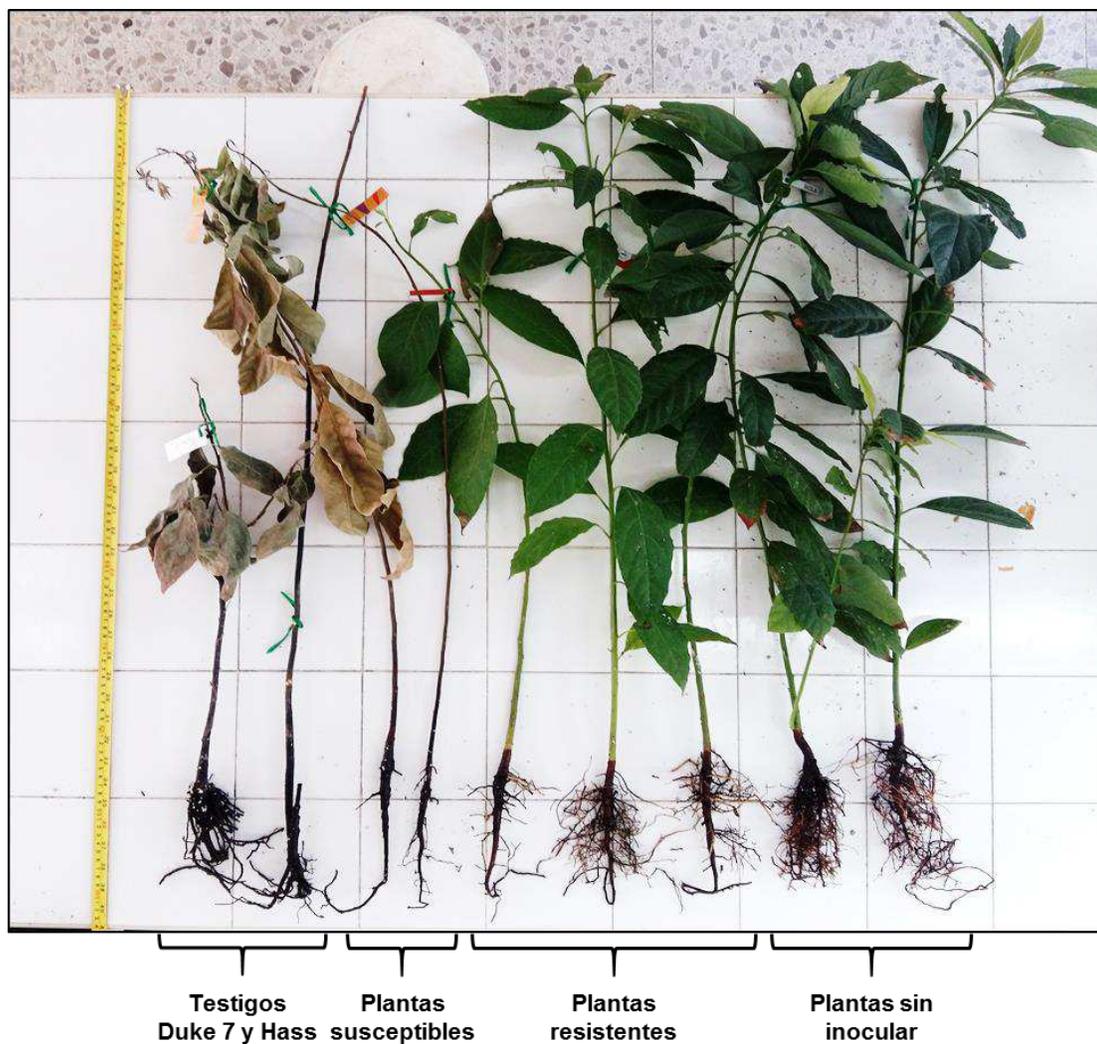


Figura 11. Comparativa de daño causado por *Phytophthora cinnamomi* en plántulas de aguacate.

La observación en microscopio de las raíces cultivadas en PDA acidificado suplementado con antibiótico y fungicida, permitió visualizar el crecimiento de un micelio cenocítico coraliforme típico de *P. cinnamomi*, dicho micelio presentó características morfológicas similares al micelio observado de *P. cinnamomi* de un cultivo puro que fue utilizado como referencia (Figura 12).

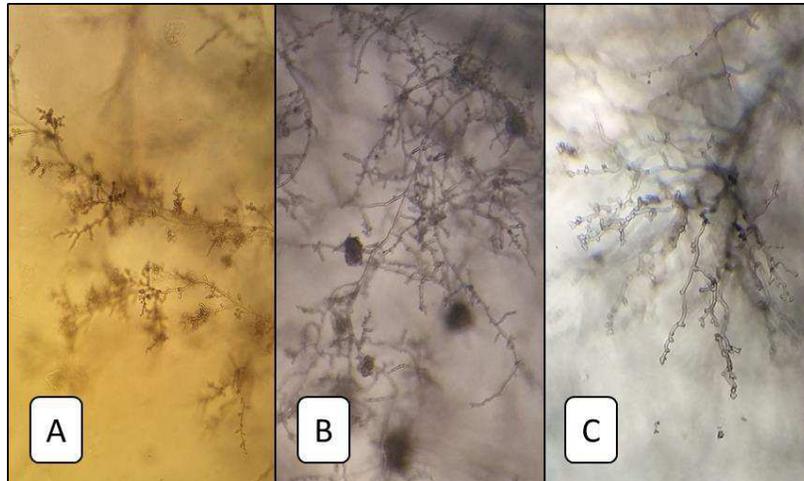


Figura 12. Crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*. A) Cultivo puro, B) y C) Crecimiento de micelio a partir de raíces.

En la extracción de ADN para la detección molecular de *P. cinnamomi*, la observación de una banda definida de alto peso molecular en la parte superior de los carriles del gel de agarosa mostró que el ADN no presentó degradación, por lo que se consideró como ADN integro (Figura 13). La concentración promedio fue de  $452 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , la calidad del ADN se confirmó al obtenerse un valor promedio de 1.83 en el cociente de la relación de absorbancia A 260 nm/A 280 nm (Cheng *et al.*, 1997).

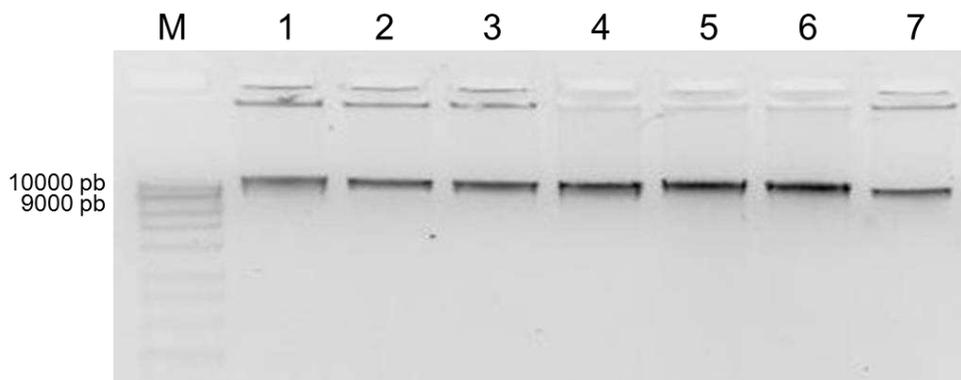


Figura 13. Verificación de la integridad del ADN de siete muestras. Carriles 1-7 = ADN de raíz y carril M = marcador de peso molecular de 1 Kb. Gel de agarosa al 1 %.

Mediante PCR se verificó el resultado de la detección visual de *P. cinnamomi*, encontrando productos de amplificación de tamaño cercano a 450 pb, similar a lo reportado por Kong *et al.* (2003) (Figura 14).

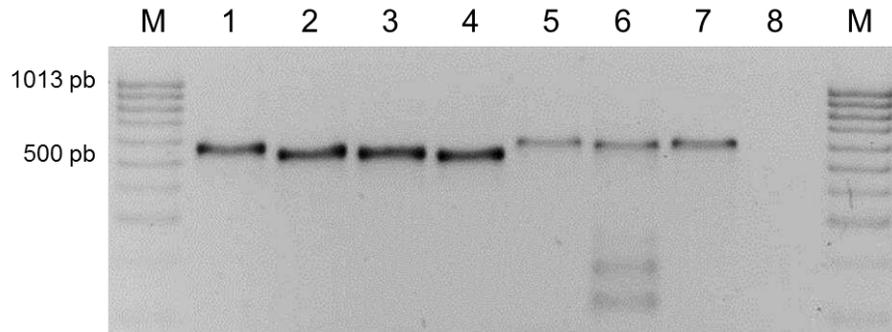


Figura 14. Fragmentos amplificados mediante de PCR. Carril1 = testigo positivo de *P. cinnamomi*, carriles 2-7 = fragmentos amplificados a partir de raíz, carril 8 = testigo negativo y carril M = marcador de peso molecular de 100 pb. Gel de agarosa al 2 %.

Durante la alineación de las secuencias con el algoritmo Clustal-W, se encontró similitud del 100% entre las secuencias y la secuencia del testigo positivo para *P. cinnamomi* (Figura 15).

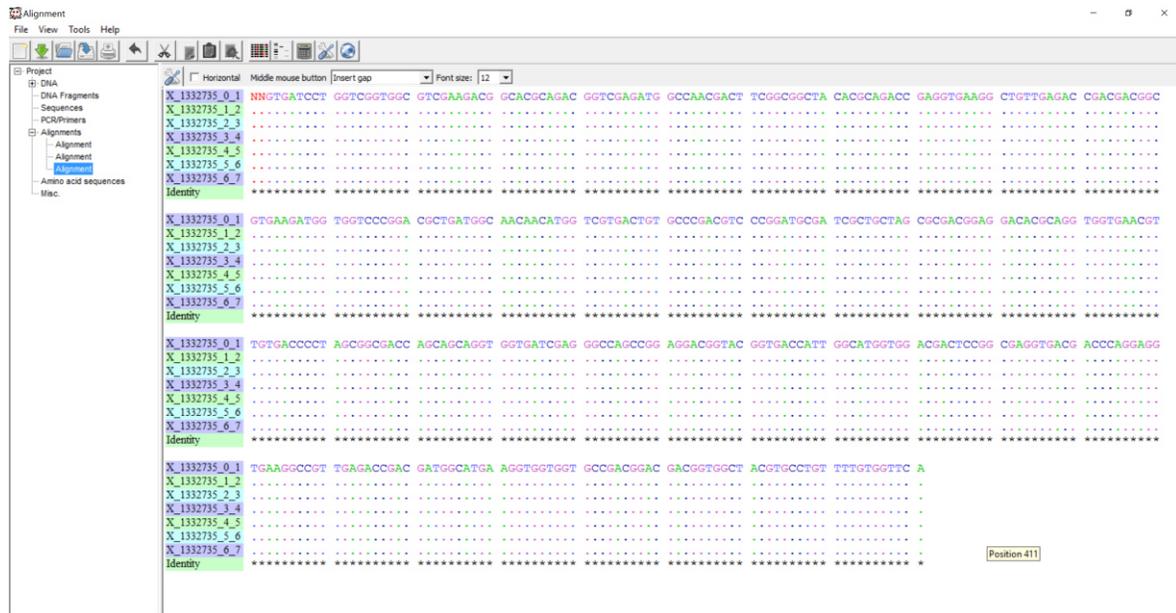


Figura 15. Alineación de las secuencias de *Phytophthora cinnamomi* con el algoritmo Clustal-W en el programa GENTle V.1.9.4.

En la comparación de las secuencias con la colección de nucleótidos del NCBI, se encontró la alineación con una secuencia de *P. cinnamomi* que codifica para la proteína de almacenamiento LPV, mostrando una identidad del 99 % con la accesión AF315064.1, en una región de 409 pb, confirmando así la presencia de *P. cinnamomi* en las raíces de las plántulas inoculadas.

## 5. CONCLUSIONES

- En la identificación de enzimas degradadoras de la pared celular para los aislados de *P. cinnamomi* el aislado Pc2 presentó actividades tipo pectinasa, amilasa, xilanasa y celulasa, mientras que el aislado Pc1 solo presentó actividades tipo pectinasa y amilasa.
- Los resultados del ensayo de evaluación de resistencia a *P. cinnamomi* mediante conductividad eléctrica permitieron identificar al aislado Pc2 como el más patogénico al inducir un aumento significativo en la conductividad eléctrica de los genotipos.
- Los resultados obtenidos en el ensayo de inoculación de plántulas en contenedores permitió determinar que:
  - El genotipo 'Duke 7' es susceptible al aislado Pc2 a pesar de estar considerado como moderadamente resistente.
  - El genotipo 'Hass' es susceptible al aislado Pc2.
  - El genotipo 'Todo el Año' es resistente al aislado Pc2.

## 6. RECOMENDACIONES

- Inocular nuevamente las plántulas sobrevivientes de los genotipos resistentes para corroborar su resistencia a *Phytophthora cinnamomi*.
- Evaluar extractos de raíz de los genotipos resistentes con el fin de identificar actividad inhibitoria *in vitro* contra *Phytophthora cinnamomi* y posteriormente caracterizar la naturaleza química de la molécula.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta D. E., I. Hernández T., e I. H. Almeyda L. 2012. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región sur. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 3, No. 2, pp. 245-257.
- Andrade H., 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.
- Andrade-Hoyos P., C. De León, E. Molina G., M. De la C. Espíndola B., D. Alvarado R., y A. López J. 2015. Totipotencialidad en plántulas de aguacate en la resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 6, No. 2, pp. 361-373.
- Barrientos-Priego A. F. y L. López-López. 2002. Historia y genética del aguacate. In: Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. Coatepec de Harinas, México. pp. 100-121.

- Barrientos-Priego A. F. 2017. Presente y futuro de los portainjertos y variedades de aguacate en el mundo y México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. pp. 2-15.
- Bezuidenhout J. J., J. M. Darvas and J. C. Toerien. 1987. Chemical control of *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings of the First World Avocado Congress, South African Avocado Growers' Association Yearbook. pp.106-108.
- Brunner F., W. Wirtza, K. C. J. Roseb, G. A. Darvillb, F. Goversc, D. Scheela and T. Nurnbergera. 2002. A b-glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry*. Vol. 59, pp. 689-696.
- Campos R. E., M. de la C. Espíndola B. y P. Mijares O. 2008. Diversidad del género *Persea* y sus usos. Fundación Salvador Sánchez Colín, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México, S.C., Coatepec de Harinas, México. Págs. 28-30.
- Castañeda G., E. L. 2009. Búsqueda de portainjertos de aguacate tolerantes-resistente a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México, México. 76 p.

- Chanderbali A. S., V. A. Albert, V. E. T. M. Ashworth, M. T. Clegg, R. E. Litz, D. E. Soltis and P. S. Soltis. 2008. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*. Vol. 30, pp. 386-396.
- Cheng F.S., S. K. Brown and N.F. Weeden. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience*. Vol. 35, No. 5, pp. 921-922.
- Coffey M. D. 1985. Chemical control of avocado root rot in California. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. pp. 8-12.
- Coffey M. D. 1987. Phytophthora root rot of avocado: an integrated approach to control in California. *Plant Disease*. Vol. 71, pp. 1046-1052.
- Coria A., V. M. 2009. Tecnología para la producción de aguacate en México. Libro técnico Núm. 8. SAGARPA – INIFAP. 2a. Edición y 1a. Reimpresión. Urapan, Michoacán, México.
- DAISIE. 2017. Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe. Información obtenida el 13 de diciembre del 2017 en: <http://www.europe-aliens.org>
- Dann E. K., R. C. Ploetz, L. M. Coates and K. G. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: *Avocado: Botany, Production and Uses*, B. Schaffer, Wolstenholme B. N. and A. W. Whiley (Eds.), CABI Publishing, pp. 380-420.

- Dizon T. O., O. P. Damasco, Ma. J. B. Estrella, S. Zilkah, and E. M. T. Mendoza. 2000. Measuring resistance of callus of avocado to *Phytophthora* root rot by mycelial attraction. *Philippian Journal of Crop Science*. Vol. 25, No.2, pp. 85-88.
- Dolan T. E. and M. D. Coffey. 1986. Laboratory screening technique for assessing resistance of four avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*. Vol. 70, pp. 115-118.
- Drenth A. and B. Sendal. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection Brisbane Australia. 42 p.
- Eskalen A. and B. A. Faber. 2017. UC IPM Pest management guidelines: Avocado diseases. University of California. ANR Publication 3436. En: <http://ipm.ucanr.edu/PMG/r8100111.html>. Consultado el 3 de diciembre de 2017.
- Gabor B. K. and M. D. Coffey. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. *Plant Disease*. Vol. 75, pp. 118-120.
- Galindo T., M. E., A. M. Arzate F., N. Ogata A., J. Murguía G., H. E. Lee E. e I. Landero T. 2008. Origen y domesticación del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Mesoamérica. Platica doctoral. XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y

Agropecuaria Veracruz y I del Trópico Mexicano 2008. Veracruz, México. pp. 516-523.

Gallo L., A. Baños, P. Domínguez y A. Rodríguez. 2007 a. Selección y evaluación de patrones de aguacate de raza antillana tolerantes-resistentes a la podredumbre causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. Resumen. VI World Avocado Congress.

Gallo L., F. Siverio y A. M. Rodríguez-Pérez. 2007 b. Thermal sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* and long-term effectiveness of soil solarisation to control avocado root rot. *Annals of Applied Biology*. Vol. 150, pp. 65-73.

Garbanzo M. 2010. Manual del Aguacate. Buenas prácticas de cultivo variedad Hass. San José, Costa Rica, 96 p.

Gómez C. J. y T. W. Apaza. 2015. Reacción a la pudrición radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands en dos razas y dos cultivares de palto, *Persea americana* Miller. Universidad Nacional Agraria La Molina, pp. 1-9.

Götesson, A., J. S. Marshall, D. A. Jones and A. R. Hardham. 2002. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol.15, No. 9, pp. 907-921.

Gutiérrez-Díez A., J. Martínez-de la C., E.A. García-Zambrano, L. Iracheta-Donjuan, J.D. Ocampo-Morales e I. M. Cerda-Hurtado. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 32, No. 1, pp. 9-18.

Gutiérrez-Soto, G., G. E. Medina-González, J. E. Treviño-Ramírez and C. E. Hernández-Luna. 2015. Native macrofungi that produce lignin-modifying enzymes, cellulases, and xylanases with potential biotechnological applications. *Bioresources*. Vol. 10, No. 4, pp. 6676-6689.

Hardham A. R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*. Vol. 6, No. 6, pp. 589-604.

Hoisington D., M. Khairallah, and D. González-de-León. 1994. Laboratory Protocols: *CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Huitema E., J. I.B. Bos, M. Tian, J. Win, M. E. Waugh and S. Kamoun. 2004. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. *Trends in Microbiology*. Vol. 12, No. 4, pp. 193-200.

ITIS. 2017. Integrated Taxonomic Information System. Información obtenida el 13 de diciembre del 2017 en: <http://www.itis.gov>.

- Jia Y. J., B. Z. Feng, W. X. Sun and X. G. Zhang. 2009. Polygalacturonase, pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsica* incubated under different conditions. *Journal of Phytopathology*. Vol.157, pp. 585-591.
- Kong P., C.X. Hong and P. A. Richardson. 2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant Pathology*. Vol. 52, pp. 681-693.
- Lahav E., R. Steinhardt and D. Kalmar. 1992. Water requirements and the effect of salinity in an avocado orchard on a clay soil. In Proceedings of the II World Avocado Congress, California, USA, pp. 323-330.
- Lara-Chávez Ma. B. N., J. A. Guerrero-Tejeda, F. S. Barriga-González, T. C Ávila-Val, S. Aguirre-Paleo y V. M. Coria-Avalos. 2011. Recuperación de árboles de aguacate infectados con *Phytophthora cinnamomi* Rands bajo control biológico y químico. Actas VII Congreso Mundial del Aguacate 2011, Cairns, Australia. pp. 1-5.
- McLeod A., C. D. Smart and W. E. Fry. 2003. Characterization of 1,3- glucanase and 1,3;1,4- beta glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 38, pp. 250-263.

Meirinho S., M. Carvalho, A. Dominguez and A. Choupina. 2010. Isolation and characterization by asymmetric PCR of the ENDO1 gene for glucan endo-1,3-b-D-glucosidase in *Phytophthora cinnamomi* associated with the ink disease of *Castanea sativa* Mill. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 53, No.3, pp. 513-518.

Neilsen M. J. 2016. Evaluation of phytophthora root rot resistance in avocado. Ph.D. Thesis, Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland. 176 p.

Nespoulous C., G. Odile, H. Jean-Claude and P. Jean-Claude. 1999. Characterization of elicitor-like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate. *FEBS Letters*. Vol. 452, pp. 400-406.

Ochoa-Fuentes Y. M., E. Cerna, J. Landeros, O. Vazquez, V. Olalde, and A. Flores. 2009. Diversidad genética de *Phytophthora cinnamomi* Rands de aguacate de Michoacán, México, por medio de RAPD. *Phyton*. Vol. 78, No. 1, pp. 25-30.

Ochoa-Fuentes Y. M., E. Cerna-Chávez, G. Gallegos-Morales, M. Cepeda-Siller, J. Landeros-Flores y A. Flores-Olivas. 2015. Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill., de Michoacán, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, Vol. 2, No. 5, pp. 211-215.

Olivares-Sáenz E. 2015. Programa diseños experimentales FAUANL v. 1.6. Facultad de Agronomía, UANL.

Oster J. D., D. E. Stottlemeyer and M. L. Arpaia. (2007). Salinity and water effects on 'Hass' avocado yields. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 132, pp. 253-261.

Pegg K. G., L. M. Coates, L. Korsten and R. M. Harding. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: *Avocado: Botany, Production and Uses* A. W. Whiley, B. Schaffer y B. N. Wolstenholme (Eds.), CABI Publishing, pp. 299-338.

Pérez-Santiago A. 2008. Generalidades del cultivo de aguacate (*Persea americana*). Monografía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México. 76 p.

Ploetz R., R. J. Schnell and J. Haynes. 2002. Variable response of open-pollinated seedling progeny of avocado to *Phytophthora* root rot. *Phytoparasitica* Vol. 30, pp. 262-268.

Ramírez G., J. G. 2013. Incidencia, diagnóstico, comportamiento y alternativas de manejo de la marchitez del aguacate con énfasis en *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 189 p.

- Ramírez G., J. G., D. A. Castañeda S., y J. G. Morales O. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*. Vol. 61, No. 1, pp. 50-61.
- Reignault P., O. Valette-Collet and M. Boccara. 2008. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 120, pp. 1-11.
- Rincón-Hernández C.A., J. de la L. Sánchez-Pérez y F. J. Espinosa-García. 2011. Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Vol. 82, pp. 395-412.
- Rodríguez H., E. 2015. Caracterización morfológica y evaluación de la resistencia de materiales criollos de aguacate *Persea americana* Mill., a la pudrición radical del aguacate *Phytophthora cinnamomi* Rands en el centro de investigación Palmira de CORPOICA. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 98 p.
- Rodríguez H., E., A. Álvaro C., A. L. Enriquez V., and J. E. Muñoz F. 2017. Evaluation of tolerance to *Phytophthora cinnamomi* Rands in avocado (*Persea americana* Miller.) germplasm. *Acta Agronómica*. Vol. 66, No. 1, pp. 128-134.

Ruiz-Rosado M., L.J. Liu, F. Ferwerda and A. Arocho. 1992. Assesments on the resistance of avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi* in Puerto Rico. In: Proc. of Second World Avocado Congress. pp: 67-68.

SAGARPA. 2011. Aguacate. Monografía de Cultivos. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios. México D.F.

Salgado M. y L. L. Fucikovsky. 1996. Detección de materiales del género *Persea* spp tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* mediante conductividad eléctrica. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México. pp. 101-110.

Sánchez-Pérez J. de la L. 1999. Recursos genéticos del aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol. 5, (Especial) pp. 7-18.

Sánchez P., J. de la L. 2007. Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 147 p.

- Shalhevet J. (1999). Salinity and water management in avocado. In *Proceedings of Avocado Brainstorming'99*, 84–91 (Eds. M. L. Arpaia and R. Hofshi). Riverside, CA: University of California.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA [http://nube.siap.gob.mx/cierre\\_agricola/](http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/) consultado el 11 de noviembre del 2017.
- SAGARPA. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentario 2017. 1ª ed. Págs. 22-23.
- Smith C. E., Jr. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*. Vol. 20, pp. 169-175.
- Smith L. A., E. K. Dann, K. G. Pegg, A. W. Whiley, F. R. Giblin, V. Doogan and R. Kopittke. 2011. Field assessment of avocado rootstock selections for resistance to *Phytophthora* root rot. *Australasian Plant Pathology*. Vol. 40, No. 1, pp. 39-47.
- Torto T. A., L. Rauser and S. Kamoun. 2002. The pipg1 gene of the oomycete *Phytophthora infestans* encodes a fungal-like endopolygalacturonase. *Currents in Genetics*. Vol. 40, pp. 385-390.

Williams L. O. 1976. The botany of the avocado and its relatives. *Proc 1st International Tropical fruit Short Course. The Avocado.* University of Florida, Gainesville, Florida. USA. pp. 9-15.

Zentmyer G. A., J. V. Leary, L. J. Klure and G. L. Grantham. 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology.* Vol. 66, pp. 982-986.

Zentmyer G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the Diseases It Causes. American *Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota.

Zentmyer G. A. and Schieber, E. 1987. The search for resistance to *Phytophthora* root in Latin America. *South African Avocado Grower's Association Yearbook.* Vol.10, pp. 109-110.

Zentmyer G. A. and Schieber, E. 1992. *Persea* and *Phytophthora* in Latin America. *Proceedings of Second World Avocado Congress.* pp. 61-66.

Zilberstein M. and Pinkas, Y. 1987. Detached root inoculation. A new method to evaluate resistance to *Phytophthora* root in avocado trees. *Phytopathology.* Vol. 6, pp. 841-844.

## 8. APÉNDICE

## Apéndice 1. Extracción de ADN de raíz de aguacate

Modificado de Cheng *et al.* (1997) y Hoisington *et al.* (1994).

1. Calentar amortiguador de extracción a 65 °C.
2. Pesar 300 mg de tejido, moler con nitrógeno líquido y agregar 1 ml de amortiguador de extracción.
3. Agitar en vórtex por 1 min e incubar en agitación constante a 65 °C durante 1 h.
4. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y agitar en vórtex por 30 s.
5. Centrifugar a 13500 rpm x 10 min y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Agregar un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), dar vórtex por 30 s.
7. Centrifugar a 13500 rpm x 10 min, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Agregar un volumen de solución de lavado 2 y mantener a -20 °C durante 12 h o a -70 °C durante 1 h.
9. Centrifugar a 13500 rpm x 20 min, descartar sobrenadante y lavar por inversión la pastilla con un volumen de solución de lavado 2.
10. Centrifugar a 13500 rpm x 10 min y descartar sobrenadante.
11. Secar la pastilla al aire durante 12 h.
12. Resuspender la pastilla en 100 µl de amortiguador TE.

Cuadro 1A. Amortiguador de extracción

Componente	Concentración final	100 ml
1 M TrisHCl pH 8	650 mM	65 ml
5 M NaCl	1.5 M	30 ml
0.5 M EDTA pH 8	20 mM	4 ml
CTAB	2%	2 g
PVP (MW:40000)	2%	2 g
NaHSO <sub>3</sub>	0.1%	0.1 g
B-mercaptoetanol	0.2%	0.2 ml

Cuadro 2A. Solución de lavado 1:  
76% EtOH, 0.2 M NaOAc

Componente	100 ml
EtOH absoluto	76 ml
2.5 M NaOAc	8 ml
bdH <sub>2</sub> O	16 ml

Cuadro 3A. Solución de lavado 2:  
76% EtOH, 10 mM NH<sub>4</sub>OAc

Componente	100 ml
EtOH absoluto	76 ml
1 M NH <sub>4</sub> OAc	1 ml
bdH <sub>2</sub> O	23 ml

## Apéndice 2. Análisis de Agua de Riego

ANÁLISIS DE AGUA										
INFORMACIÓN GENERAL										
Cliente/Productor	UANL			Cultivo a Establecer	Aguacate					
No. de Registro	AG-10548			Fuente de Agua	poza					
Rancho o Empresa	NA			Fecha de Recepción	12/10/2017					
Municipio	Escobedo			Fecha de Entrega	16/10/2017					
Estado	Nuevo Leon									
Identificación/Lote	NA									
Características Generales de Salinidad / Sodicidad										
Determinación	Abreviatura	Unidades	Resultados	Muy Bajo	Bajo	Mod. Bajo	Mediano	Mod. Alto	Alto	Muy Alto
Cond. Eléctrica	CE	dS/m	1.48							
pH	pH	-	7.16							
Rel. Ads Sodio	RAS	-	1.29							
Rel. Ads Sodio Aj	RASaj	-	1.95							
Dureza*	°f	-	58.61							
Cationes										
Determinación	Abreviatura	meq / L	Unidades ppm	Muy Bajo	Bajo	Mod. Bajo	Mediano	Mod. Alto	Alto	Muy Alto
Calcio	Ca	10.0	200							
Magnesio	Mg	1.74	20.9							
Sodio	Na	3.12	71.8							
Potasio	K	0.09	3.51							
<b>Suma de Cationes</b>	-	<b>15.0</b>	-							
Aniones										
Determinación	Abreviatura	meq / L	Unidades ppm	Muy Bajo	Bajo	Mod. Bajo	Mediano	Mod. Alto	Alto	Muy Alto
Sulfatos	SO4	4.42	212							
Bicarbonatos	HCO3	5.43	331							
Cloruros	Cl	3.53	124							
Carbonatos	CO3	0.00	0.00							
Nitratos	N-NO3	1.32	18.5							
<b>Suma de Aniones</b>	-	<b>14.7</b>	-							
Determinaciones Especiales										
Determinación	Abreviatura	Unidades	Resultados	Muy Bajo	Bajo	Mod. Bajo	Mediano	Mod. Alto	Alto	Muy Alto
Boro	B	ppm	0.38							
Hierro	Fe	ppm	0.0530							
Manganeso	Mn	ppm	0.0050							
Cobre	Cu	ppm	0.0010							
Zinc	Zn	ppm	0.3480							
Arsenico	As	ppm	0.0180							

Determinación	Nitrógeno Amoniacal	Fosfatos	Sólidos Totales	Sólidos Disueltos	Níquel	Molibdeno
Resultado	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Unidades	ppm	meq / L	ppm	ppm	ppm	ppm

PND = PENDIENTE POR VERIFICACIÓN    NA = NO ANALIZADO

\*Dureza del agua va de muy blanda a muy dura

Poniente 6. No. 200 Ciudad industrial  
Celaya, Gto. C.P. 38010  
Tel. (461) 614 5238, 614 7951  
[www.fertilab.com.mx](http://www.fertilab.com.mx)

  
**Gerente de Área Analítica**  
Ing. Agustín García Olivares



\*Este documento se encuentra protegido y registrado ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial; queda prohibida su reproducción total o parcial sin la autorización expresa de FERTILIDAD DE SUELOS S. DE R.L.\*