



## UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

**" Caracterización y comparación de poblaciones de *Phytophthora cinnamomi* aisladas de raíz de aguacate con pudrición en México y Estados Unidos"**

TESIS  
Para Obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Opción: Ciencias Agropecuarias, Forestales y Ambientales

PRESENTA

**M. C. Alejandra Mondragón Flores**

Asesor: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

### **Comité Tutoral**

Dra. Sylvia P. Fernández Pavía (Co-asesora).IIAF-UMSNH.  
Dra. Julieta Benítez Malvido. IIES-UNAM.  
Dr. Gerardo Vázquez Marrufo. CMEB-UMSNH.  
Dr. Miguel MartínezTrujillo. Facultad de Biología-UMSNH.

Morelia, Michoacán, Agosto de 2022



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

*Programa Institucional de  
Doctorado en Ciencias Biológicas*



DR. GERARDO RODRÍGUEZ ALVARADO  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Caracterización y comparación de poblaciones de *Phytophthora cinnamomi* aisladas de raíz de aguacate con pudrición en México y Estados Unidos" presentado por el **M. C. Alejandra Mondragón Flores con Núm. de Matrícula 0744342F**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctora en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
Morelia, Michoacán, a 05 de julio de 2022

COMITÉ SINODAL

Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado  
Director de Tesis

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía  
Co directora

Dr. Miguel Martínez Trujillo  
Presidente

Dr. Gerardo Vázquez Marrujo  
Vocal 1

Dra. Julieta Benítez Malvido  
Vocal 2

**Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado y la coasesoría de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía.**

**Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) becario No. 702004 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH**

## **DEDICATORIA**

A mi madre Guadalupe Flores Miramontes, mi guerrera incansable y mi principal ejemplo de trabajo, constancia y honestidad.

A mis hijos Fernando y Luz Paulina, esperando mi trabajo y dedicación sirva de ejemplo y de motivación para que ustedes logren alcanzar sus metas, a pesar de las diferencias de pensamiento, son lo que más amo en la vida.

A mis hermanos y sobrinos, que a pesar de la distancia siempre los llevo presentes.

A la memoria de mi hermano Javier Mondragón Flores (q.e.p.d), te fuiste antes de que pudieras ver realizado este objetivo de mi vida, pero estoy segura que el universo nos volverá a poner de frente, mientras tanto te llevo en mi corazón y en mi pensamiento, te quiero por siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía por su apoyo incondicional, su paciencia y confianza en mi capacidad para desarrollar el proyecto, mi agradecimiento por siempre.

A el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, por sus consejos y el conocimiento que me compartió durante el tiempo que permanecí en el laboratorio

A mi comité tutorial: Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, Dra. Julieta Benítez Malvido, Dr. Miguel Martínez Trujillo, por sus valiosas aportaciones durante los seminarios y sus correcciones que permitieron enriquecer y mejorar el trabajo de investigación.

A los doctores Filiberto Reyes Villanueva y Salvador Ochoa Ascencio, que me brindaron ayuda con los análisis estadísticos de los datos y revisiones del trabajo. De igual forma al Dr. Jesús J. Guerra Santos por su apoyo en la revisión del trabajo.

A los Ingenieros Eduardo Guerrero Aguirre, Liliana Tadeo Quezada, Víctor Manuel Arroyo Estrada, Braulio Guerrero Rodríguez, Felipe de Jesús Salvador Hernández, Juan Carlos Pérez Pérez, Eutimio Cuarao Anguiano, Emmanuel Díaz Barriga, Aldo Corona Arciga, Juan Antonio Calderon Mora, Miguel Ángel Rodríguez Alvarado, quienes amablemente consiguieron las huertas para la colecta de muestras en cada uno de los municipios y me ayudaron a colectar

A Marlene Díaz Celaya, por su ayuda invaluable en el pesado trabajo de laboratorio y las revisiones de la tesis y artículos. A todos los compañeros y amigos de laboratorio, que compartieron tiempo y espacio, además de comentarios para la mejora del trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, por abrir las puertas a las instalaciones, el financiamiento y la formación de recursos humanos de calidad que contribuyan en el mejoramiento de la investigación en México.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de doctorado (Becario 702004)

<b>CONTENIDO</b>	v
<b>Resumen general</b> .....	1
<b>General abstract</b> .....	2
<b>Introducción general</b> .....	4
El cultivo del aguacate .....	4
Pudrición de raíz en aguacate .....	4
<i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	5
Variabilidad genética de <i>P. cinnamomi</i> .....	6
<b>Justificación</b> .....	6
<b>Hipótesis</b> .....	6
<b>Objetivo general</b> .....	6
<b>Objetivos específicos</b> .....	8
<b>Literatura citada</b> .....	9
<b>Capítulo I. Caracterización y sensibilidad a fungicidas de aislados de <i>Phytophthora</i> causante de pudrición de raíz en aguacate en Zitácuaro, Michoacán</b> .....	12
<b>Resumen</b> .....	12
<b>Abstract</b> .....	13
<b>Introducción</b> .....	14
<b>Materiales y Métodos</b> .....	16
Características de las huertas .....	16
Colecta de muestras y aislamiento .....	16
Tipo de compatibilidad .....	17
Caracterización morfológica .....	17
Pruebas de patogenicidad .....	18
Sensibilidad a fungicidas .....	18
Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio .....	19
Caracterización molecular .....	20
<b>Resultados</b> .....	20

Aislados obtenidos .....	20
Tipo de compatibilidad .....	21
Caracterización morfológica y molecular .....	21
Pruebas de patogenicidad .....	21
Sensibilidad a fungicidas .....	23
Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio .....	24
<b>Discusión</b> .....	26
Conclusiones .....	28
Literatura citada .....	28
<b>Cuadros y figuras</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Características de los sitios de colecta de raíces de aguacate en Zitácuaro Michoacán .....	16
<b>Cuadro 2.</b> Comparación de medias (Tukey, 0.05) de diámetro de crecimiento e inhibición (%) de aislados de <i>P. cinnamomi</i> colectados en Zitácuaro, Michoacán, expuestos a fosfito de potasio y metalaxil-M .....	20
<b>Cuadro 3.</b> Tipo de compatibilidad, CE <sub>50</sub> e inhibición (%) a fosfito de potasio y metalaxil-M de aislados de <i>P. cinnamomi</i> colectados en el municipio de Zitácuaro, Mich. ....	24
<b>Figura 1.</b> Características morfológicas y patogenicidad de <i>P. cinnamomi</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Inhibición del crecimiento micelial de aislados de <i>P. cinnamomi</i> colectados en Zitácuaro Michoacán frente al fosfito de potasio .....	23
<b>Figura 3.</b> Efecto de temperatura y medio de cultivo en el crecimiento micelial de seis aislados de <i>P. cinnamomi</i> obtenidos de raíces de aguacate con pudrición .....	24
<b>Figura 4.</b> Efecto de las temperaturas 22 y 25 °C en seis aislados de <i>P. cinnamomi</i> aislados de raíces de aguacate con pudrición .....	24
<b>Capítulo II. Caracterización de <i>Phytophthora mendei</i> causando pudrición de raíz de aguacate (<i>Persea americana</i>) en Michoacán, México</b> .....	33
<b>Resumen</b> .....	33
<b>Abstract</b> .....	34
<b>Introducción</b> .....	35
<b>Materiales y métodos</b> .....	37

Colecta y aislamiento .....	37
Caracterización morfológica .....	37
Sensibilidad a fungicidas .....	37
Pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate .....	38
Pruebas en frutos de aguacate .....	38
Caracterización molecular .....	39
Análisis filogenético .....	40
<b>Resultados</b> .....	40
Colecta y aislamiento .....	40
Caracterización morfológica y molecular .....	40
Pruebas patogenicidad en frutos y plantas de aguacate .....	41
Sensibilidad a fungicidas .....	42
Análisis filogenético .....	43
<b>Discusión</b> .....	44
<b>Conclusiones</b> .....	48
<b>Literatura citada</b> .....	48
<b>Cuadros y figuras</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Crecimiento e inhibición de <i>P. menzei</i> a diferentes concentraciones de fosfito de potasio (FP) y metalaxil-M (MTX) .....	43
<b>Figura 1.</b> Características morfológicas de <i>Phytophthora menzei</i> .....	41
<b>Figura 2.</b> Pruebas de patogenicidad de <i>P. menzei</i> en frutos y plantas de aguacate .....	42
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético concatenado Neighbor-Join y BioNJ basado en secuencias de ITS y COI de <i>Phytophthora menzei</i> .....	44
<b>Capítulo III. Caraterización de poblaciones de <i>Phytophthora cinnamomi</i> aisladas de raíz de aguacate con pudrición en México y comparación con aislados de Estados Unidos</b> .....	52
<b>Resumen</b> .....	52
<b>Abstract</b> .....	53
<b>Introducción</b> .....	54
<b>Hipótesis</b> .....	56
<b>Objetivo general</b> .....	56

<b>Objetivos específicos</b> .....	57
<b>Materiales y métodos</b> .....	57
Colecta de muestras .....	57
Técnicas de aislamiento .....	57
Caracterización molecular .....	58
Tipo de compatibilidad .....	58
Obtención de cultivos monospóricos .....	59
Sensibilidad a fungicidas .....	61
Pruebas de virulencia en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	62
Evaluación de virulencia en frutos de aguacate .....	62
Comparación de aislados de <i>P. cinnamomi</i> de México y Estados Unidos .....	63
Análisis estadísticos .....	63
<b>Resultados</b> .....	63
Colecta de muestras .....	63
Aislamiento .....	64
Caracterización molecular .....	64
Tipo de compatibilidad .....	64
Sensibilidad a fungicidas .....	64
Pruebas de virulencia en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	65
Evaluación de virulencia en frutos de aguacate .....	67
Comparación de poblaciones de <i>P. cinnamomi</i> de México y Estados Unidos .....	68
Tasa de crecimiento .....	69
Concentración efectiva (CE <sub>50</sub> ) .....	70
<b>Discusión</b> .....	70
<b>Conclusiones</b> .....	74
<b>Literatura citada</b> .....	74
<b>Cuadros y figuras</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Ubicación, edad, tipo de manejo y características agroclimáticas de las huertas de colecta de los 50 aislados seleccionados de <i>P. cinnamomi</i> de Michoacán .....	60

<b>Cuadro 2.</b> Comparación de medias (Tukey, 0.05) de diámetro de crecimiento e inhibición (%) de aislados de <i>P. cinnamomi</i> colectados en Michoacán, expuestos a fosfito de potasio y metalaxil-M durante tres días .....	65
<b>Cuadro 3.</b> Concentraciones efectivas de metalaxil-M y fosfito de potasio a las que se inhibió el 50 % del crecimiento micelial de los aislados de <i>P. cinnamomi</i> (CE <sub>50</sub> ) y comparación de medias (Tukey, 0.05) (tamaño de lesión) de las pruebas de virulencia en <i>N. benthamiana</i> .....	66
<b>Cuadro 4.</b> Lesiones ocasionadas por aislados representativos de <i>P. cinnamomi</i> en hojas de <i>N. benthamiana</i> y frutos de aguacate .....	68
<b>Cuadro 5.</b> Comparación de aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> de Estados Unidos (EUA) y México (MEX), con base a su CE <sub>50</sub> a fosfito de potasio y a su tasa de crecimiento .....	69
<b>Figura 1.</b> Promedio de crecimiento micelial de aislados de <i>P. cinnamomi</i> expuestos a diferentes concentraciones de fosfito de potasio y metalaxil-M .....	65
<b>Figura 2.</b> Variabilidad en virulencia de aislados de <i>P. cinnamomi</i> en frutos de aguacate y hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	68
<b>Discusión general</b> .....	80
<b>Conclusiones generales</b> .....	83
<b>Perspectivas</b> .....	83
<b>Literatura citada</b> .....	84

## RESUMEN GENERAL

La pudrición de raíz es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo de aguacate y *Phytophthora cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la enfermedad. Se ha estimado que solo en el estado de California, EUA las pérdidas en cultivos causadas por *P. cinnamomi* superan los 40 millones de dólares anuales. En California encontraron dos clados genéticamente distintos de aislados de tipo de apareamiento A2 (A2 clado I y clado II), los pertenecientes al clado II, se caracterizaron por ser más virulentos y menos sensibles a fosfito de potasio (Fp), este linaje clonal podría haber sido introducido en el sur de California proveniente de México, sin embargo esto no está demostrado. Por lo que el objetivo del presente estudio fue caracterizar poblaciones actuales de *Phytophthora cinnamomi* colectadas en Michoacán, México de raíces de aguacate con pudrición y compararlas con aislados de California, Estados Unidos. Se obtuvieron 171 aislados de nueve municipios y se determinó el tipo de compatibilidad de estos. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* a Fp y Mtx de 50 aislados seleccionados de *P. cinnamomi*, así como su virulencia en hojas de *Nicotiana benthamiana*. A partir de estos 50 aislados se seleccionó un subgrupo de 10 que representaban la variación fenotípica de la población de México (MEX) para realizar pruebas de virulencia en aguacate. Estos 10 aislados se compararon con 10 seleccionados en Estados Unidos de América (EUA) en base a su sensibilidad a Fp y velocidad de crecimiento. Adicionalmente se analizaron 25 aislados obtenidos de raíces con pudrición, del municipio de Zitácuaro por ser una zona no estudiada anteriormente y aislados de *Phytophthora* diferentes a *P. cinnamomi* obtenidos de raíces de aguacate con pudrición, se caracterizaron morfológica y molecularmente y se realizaron pruebas de patogenicidad. Los aislados diferentes a *P. cinnamomi*, presentaron características morfológicas de *P. menzei* lo cual se confirmó molecularmente. Los valores obtenidos de  $CE_{50}$  para *P. menzei* fueron de 3.67 y 0.737  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., para Fp y Mtx respectivamente. Los aislados de Zitácuaro correspondieron a *P. cinnamomi* y fueron más sensibles a Fp que a Mtx. Los aislados de los nueve municipios, presentaron las características morfológicas de *P. cinnamomi*, lo cual se confirmó molecularmente en una muestra. En las pruebas de sensibilidad, los aislados fueron más sensibles a Fp que a Mtx. Los valores de  $CE_{50}$  oscilaron entre 7 a 61 con una media de 29  $\mu\text{g}$  fosfito de potasio  $\text{mL}^{-1}$  y para metalaxil-M osciló entre 0.17 y 0.57 con una media de 0.25  $\mu\text{g}$  de metalaxil-M  $\text{mL}^{-1}$ . No se observaron diferencias significativas entre aislados, solo

entre tratamientos. Se observó variación en las pruebas de virulencia, los aislados TGR-3-5, UPNS-4-1 y TANR-3-5, ZITR-3-3 fueron los más y menos virulentos respectivamente en las dos pruebas. No se observó una relación entre el origen geográfico con la virulencia ni la sensibilidad de los aislados. Todos los aislados colectados en MEX y los seleccionados de EUA presentaron tipo de compatibilidad A2. Los aislados de EUA y MEX fueron estadísticamente iguales con respecto  $CE_{50}$  para Fp, sin embargo, en la tasa de crecimiento si se observaron diferencias significativas. Aunque se encontraron similitudes entre los aislados de *P. cinnamomi* de EUA y MEX con respecto a sensibilidad a Fp y a tipo de compatibilidad es necesario realizar otros estudios y analizar un mayor número de aislados para determinar si pudieron haber sido introducidos desde México hacia Estados Unidos de América.

**Palabras clave:** sensibilidad, virulencia, tipo de compatibilidad, fenotípica,  $CE_{50}$

#### **GENERAL ABSTRACT**

Root rot is one of the main diseases that affect avocado crops and *Phytophthora cinnamomi* is the pathogen most frequently associated with the disease. It has been estimated that in the state of California alone, crop losses caused by *P. cinnamomi* exceed 40 million dollars annually. In California they found two genetically distinct clades of A2 mating type isolates (A2 clade I and clade II), those belonging to clade II, were characterized by being more virulent and less sensitive to potassium phosphite (Fp), this clonal lineage could have been introduced to southern California from Mexico, however this is not proven. Therefore, the objective of the present study was to characterize current populations of *Phytophthora cinnamomi* collected in Michoacán, México from avocado root rot and compare them with isolates from California, United States. One hundred and seventy one isolates from nine municipalities were obtained and the compatibility type of these was determined. The *in vitro* sensitivity to Fp and Mtx of 50 selected isolates of *P. cinnamomi* was evaluated, as well as their virulence in *Nicotiana benthamiana* leaves. From these 50 isolates, a subgroup of 10 that represented the phenotypic variation of the population of Mexico (MEX) was selected to perform virulence tests on avocado. These 10 isolates were compared with 10 selected in the United States of America (USA) based on their sensitivity to Fp and growth rate. Additionally, 25 isolates obtained from roots with rot, from the municipality of Zitácuaro,

were analyzed as it is an area not previously studied and *Phytophthora* isolates different from *P. cinnamomi* obtained from avocado roots with rot, were characterized morphologically and molecularly and pathogenicity tests were performed. Isolates different from *P. cinnamomi* presented morphological characteristics of *P. menzei*, which was confirmed molecularly. The EC<sub>50</sub> values obtained for *P. menzei* were 3.67 and 0.737 µg mL<sup>-1</sup> a.i., for Fp and Mtx, respectively. Zitácuaro isolates corresponded to *P. cinnamomi* and were more sensitive to Fp than to Mtx. The isolates from the nine municipalities presented the morphological characteristics of *P. cinnamomi*, which was confirmed molecularly on selected isolates. In the sensitivity tests, the isolates were more sensitive to Fp than to Mtx. EC<sub>50</sub> values ranged from 7 to 61 with a mean of 29 µg potassium phosphite mL<sup>-1</sup> and for metalaxyl-M ranged from 0.17 to 0.57 with a mean of 0.25 µg metalaxyl-M mL<sup>-1</sup>. No significant differences were observed between isolates, only between treatments. Variation was observed in the virulence tests, the isolates TGR-3-5, UPNS-4-1 and TANR-3-5, ZITR-3-3 were the most and least virulent, respectively, in the two tests. No relationship was observed between geographic origin and virulence or sensitivity of the isolates. All the isolates collected in MEX and those selected from the USA presented compatibility type A2. The isolates from USA and MEX were statistically equal with respect to EC<sub>50</sub> for Fp, however, in the growth rate significant differences were observed. Although similarities were found between the isolates of *P. cinnamomi* from the USA and MEX with respect to sensitivity to Fp and compatibility type, it is necessary to carry out other studies and analyze a larger number of isolates to determine if they could have been introduced from Mexico to the United States of America.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

**El cultivo del aguacate.** El aguacate (*Persea americana* Mill.) se cultiva en todo el mundo, es originario de México y Centroamérica, vestigios de semillas encontrados en asentamientos humanos en el Valle de Tehuacán sugieren que el aguacate podría haber sido utilizado desde 8000 a 7000 a. C. y posiblemente domesticado al menos desde 5000 a. C. por grupos mesoamericanos (Galindo et al., 2007). Dentro de la familia Lauraceae el aguacate es la especie económicamente más importante, es polimórfica subdividida en tres razas, con características botánicas bien diferenciadas, la raza antillana (*P. americana* var. *americana*), la raza guatemalteca (*P. americana* var. *gautemalensis*) y la raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) (Pérez-Jiménez, 2008). En México, la mayoría de los árboles de aguacate están injertados sobre portainjertos de semilla procedente de árboles de la raza mexicana de polinización libre (Salazar et al., 2004). El fruto es una excelente fuente de energía, luteína, vitamina E, grasas monoinsaturadas y ácido fólico, que brindan beneficios para la salud, características que han contribuido a su creciente popularidad (Araújo et al., 2018; Ashworth et al., 2007). México es el principal productor de aguacate a nivel global con una producción de más de 2, 300,000 t, con un valor superior a los 49 mil millones de pesos, seguido de República Dominicana, Perú e Indonesia. La variedad 'Hass' es la más cultivada por su excelente sabor y altos rendimientos y México es el país líder en la exportación de aguacate a los Estados Unidos, seguido de Chile y Perú (Ashworth et al., 2007; FAOSTAT, 2020). A nivel nacional, el estado de Michoacán aporta más del 70 % de la producción, destacando los municipios de Tancítaro, Salvador Escalante, Ario de Rosales y Tacámbaro por el volumen producido (SIAP, 2020). Por lo que respecta al municipio de Zitácuaro de acuerdo al Servicio de Información Alimentaria y Pesquera la producción de aguacate en este municipio ha ido en aumento, ya que en 2010 se obtuvo una producción de 10,027 t y en 2019 de 12, 509 t, lo que representó un incremento de 19.8 %.

**Pudrición de raíz en aguacate.** Las enfermedades son las principales limitantes de la producción, una de las más devastadoras del cultivo del aguacate a nivel mundial, debido a su frecuencia, severidad y altas pérdidas económicas es la pudrición de raíz o marchitez

(Coffey, 1992; Ramírez-Gil et al., 2014). En México, esta enfermedad afecta a todas las variedades y es responsable del aumento de la mortalidad de los árboles en las principales zonas de producción de aguacate, encontrándose en el 5 % de la superficie total del cultivo en Michoacán (Téliz, 2000). La pudrición de raíz en árboles de aguacate ocasiona clorosis, defoliación, muerte descendente y muerte de las raíces alimentadoras, lo que reduce el rendimiento y causa la muerte de los árboles (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). La enfermedad es más severa y se desarrolla más rápidamente en suelos pesados, con poco drenaje y a una temperatura promedio de 24 °C (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996). Especies como *P. citricola* sensu lato, *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora*, *P. mengei* y *Phytophthium vexans*, también se han reportado asociadas a la enfermedad (Hong et al., 2009; Rodríguez-Padrón et al., 2018; Hernández-Pérez et al., 2019). Sin embargo, *Phytophthora cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la enfermedad, infecta raíces finas y alimentadoras, pero también puede invadir las raíces laterales y tallos leñosos por medio de zoosporas móviles especialmente a través de heridas o aberturas naturales en la capa peridérmica (Erwin and Ribeiro 1996; O’Gara et al., 2015).

***Phytophthora cinnamomi*.** El género *Phytophthora* ubicado en el phylum Oomycota, se caracteriza por contener organismos que infectan plantas por medio de zoosporas móviles causando enfermedades que ocasionan pérdidas cuantiosas (Erwin and Ribeiro 1996). Dentro de este género se ubica *P. cinnamomi* que es considerado uno de los patógenos de plantas más devastadores, infecta cerca de 5000 especies de importancia en la agricultura, silvicultura, horticultura, además de especies silvestres (Hardham y Blackman, 2018; Jung et al., 2013; Kroon et al., 2012). *P. cinnamomi* que presenta una temperatura óptima de crecimiento 24 a 28 °C, se caracteriza por tener micelio coraloide, esporangios sin papila, clamidosporas globosas, oosporas pléroticas y anteridios anfiginos (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005). Es un organismo nativo del suelo, que presenta una fase asexual caracterizada por la formación de dos tipos de esporas (esporangios y clamidosporas) y una fase sexual poco frecuente en la naturaleza. Factores como su habilidad para crecer saprofiticamente en el suelo o asintóticamente en plantas infectadas (Zentmyer, 1980, Hardham y Blackman, 2018) así como la capacidad de formar estructuras de resistencia como son las clamidosporas, contribuyen a su supervivencia por largos períodos. El

crecimiento de hifas parece ser un factor importante para su propagación, pero la infección se inicia a través del movimiento activo de zoosporas biflageladas principalmente (O'Gara et al., 2015; Hardham y Blackman, 2018). Además en pruebas de patogenicidad se ha demostrado su capacidad de infectar tejidos sin necesidad de heridas (Lucas et al., 2002; Mondragón-Flores et al., 2022). Se ha estimado que solamente considerando California, las pérdidas en cultivos causadas por *P. cinnamomi* superan los 40 millones de dólares anuales (Ploetz, 2013).

**Variabilidad genética de *P. cinnamomi*.** Aunque *P. cinnamomi* es una especie heterotálica, que requiere la presencia de los tipos de apareamiento A1 y A2 para reproducirse de forma sexual y poder desarrollar variabilidad genética y fenotípica, se sabe que las especies de *Phytophthora* exhiben variación fenotípica, que se ha observado tanto en el campo como en medios de cultivo, incluso sin reproducción sexual (Kamoun, 2003; Pais et al., 2013). Es posible que este fenómeno se deba a la inestabilidad del genoma, quizás causada por elementos transponibles, conversión de genes, recombinación mitótica, aumento del nivel de ploidia y/o cromosomas dispensables (Pais et al., 2013). Estudios anteriores de poblaciones de *P. cinnamomi*, revelaron bajos niveles de diversidad genotípica dentro de la especie y sugirieron la propagación clonal del patógeno en gran parte del mundo, además de la existencia de tres linajes clonales, uno correspondiente a los aislados de tipo de apareamiento A1 y dos linajes clonales diferentes para los aislados de tipo de apareamiento A2 (A2 tipo 1 y A2 tipo 2) (Eggers et al., 2012; Linde et al., 1999). En un estudio para evaluar la diversidad genética de los aislados de *P. cinnamomi* de aguacate en California, encontraron dos clados genéticamente distintos de aislados de tipo de apareamiento A2 (A2 clado I y clado II). El A2 clado II consistió en aislados con genotipos únicos colectados solo en el sur de California en 2009 y 2010 (Pagliaccia et al., 2013). Curiosamente, los autores en este estudio incluyeron aislados de *Pc* previamente identificados como pertenecientes al A2 tipo 1 y A2 tipo 2 descritos por Dobrowolski et al. (2003), sin embargo, estos aislados se agruparon dentro del grupo A2 clado I, lo que sugiere que el grupo A2 clado II podría ser otro linaje clonal introducido en el sur de California proveniente de México, sin embargo esto no está demostrado (Pagliaccia et al., 2013). Aunque en México Ochoa-Fuentes et al. (2007) reportaron variabilidad de *P. cinnamomi* en aislados obtenidos de regiones productoras de

aguacate en Michoacán, México utilizando AFLP's, así como variabilidad en virulencia (Ochoa-Fuentes et al. 2015) algunas zonas aun no han sido exploradas y se requiere realizar estudios sobre resistencia a fungicidas. Belisle et al. (2019) determinaron que aislados representativos de este nuevo A2 clado II, fueron menos sensibles a fosfito de potasio y más agresivos en diferentes portainjertos de aguacate, lo que sugiere cambios en la virulencia en poblaciones actuales de *P. cinnamomi*. Este cambio podría deberse a la introducción de aislados introducidos de México. Para explorar la diversidad de *P. cinnamomi* en zonas productoras de aguacate, con aislados actuales y compararlos con aislados de California se planteó el presente estudio con el objetivo de caracterizar aislados de *P. cinnamomi* obtenidos de árboles de aguacate con pudrición de raíz y compararlos con aislados de California.

## **JUSTIFICACIÓN**

La identificación de variabilidad genotípica y fenotípica de *P. cinnamomi*, en lo que respecta a resistencia a fungicidas y virulencia contribuirá a desarrollar mejores estrategias para el manejo de pudrición de raíz, reduciendo pérdidas por este patógeno y aumentando la producción, rentabilidad y competitividad del cultivo de aguacate. Además, ayudará a implementar métodos de detección eficientes y confiables para la selección y desarrollo de nuevos portainjertos de aguacate resistentes a *P. cinnamomi*, efectivos contra una población de patógenos con mayor diversidad genética y fenotípica tanto en Michoacán como en California, que son los principales productores de aguacate a nivel mundial.

## **HIPÓTESIS**

Las poblaciones de *Phytophthora cinnamomi* asociadas a pudrición de aguacate de Michoacán, México presentan variabilidad fenotípica en lo que respecta a virulencia y a sensibilidad a fungicidas.

Existen similitudes entre aislados de *P. cinnamomi* de Michoacán, México y de California, Estados Unidos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar y comparar poblaciones actuales de *P. cinnamomi*, asociadas a pudrición de raíz del aguacate de Michoacán, México y California, Estados Unidos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Evaluar protocolos de aislamiento y esporulación de *P. cinnamomi*.
- 2.- Determinar el tipo de compatibilidad de los aislados colectados en Michoacán.
- 3.- Evaluar la sensibilidad *in vitro* a metalaxil-M y fosfito de potasio de aislados *P. cinnamomi* obtenidos de raíz de aguacate con pudrición.
- 4.- Determinar la virulencia de aislados de *P. cinnamomi*, en hojas de *Nicotiana benthamiana*.
- 5.- Evaluar la virulencia de los aislados que representen la variación fenotípica de *P. cinnamomi* en frutos de aguacate.
- 6.- Caracterizar especies de *Phytophthora* aisladas de raíces de aguacate con pudrición, diferentes a *P. cinnamomi*.
- 7.- Comparar fenotípicamente las poblaciones de *P. cinnamomi* provenientes de California y de México en base a tipo de compatibilidad, tasa de crecimiento y sensibilidad a fosfito de potasio.

## LITERATURA CITADA

- Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Ruíz HA, Pintado MM and Aguilar C. 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology* 80: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Ashworth VE, Che H and Clegg MT. 2007. Avocado. Pages 325-329, in: *Fruits and nuts*. Chittaranjan Kole (ed.). Springer, Berlin, Heidelberg
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019b. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0326-R>
- Coffey MD. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. Pages 423-444, in: *Plant diseases of international importance. Volumen III. Diseases of fruit crops*. Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadhyay AN (eds.) Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. 456 pp.
- Dobrowolski MP, Tommerup IC, Shearer BL and O'Brien PA. 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* 93:695-704. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.695>
- Eggers JE, Balci Y and MacDonald WL. 2012. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. *Plant Disease* 96:1608-1614
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 562 pp.
- FAOSTAT. 2020. FAO Statistics División 2020. (<http://faostat.fao.org>: accesada agosto 2020)
- Galindo M, Arzate-Fernández, A, Ogata-Aguilar N, Landero-Torres I. 2007. The Avocado (*Persea americana*, Lauraceae) Crop in Mesoamerica: 10,000 Years of History. *Harvard Papers in Botany* 12: 325-334. 10.3100/1043-4534(2007)12[325:TAPALC]2.0.CO;2
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6: 589–604 <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hardham AR and Blackman LM. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 19: 260-285. doi:10.1111/mpp.12568

- Hernández-Pérez A, Cerna-Chávez E, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM y Ochoa-Fuentes YM. 2019. First report of *Phytopythium vexans* causing the “Avocado sadness” in Michoacan, Mexico. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 88: 11-13. DOI:10.32604/phyton.2019.04608
- Hong CX, Gallegly ME, Browne GT, Bhat RG, Richardson PA, Kong P. 2009. The avocado subgroup of *Phytophthora citricola* constitutes a distinct species, *Phytophthora menzei* sp. nov. *Mycologia*. 101(6): 833-40. doi: 10.3852/08-214. PMID: 19927748
- Jung T, Colquhoun IJ and Hardy GESTJ. 2013. New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathology* 43 (4): 266-288. doi: 10.1111/efp.12025
- Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* 2(2):191-199. DOI: 10.1128/EC.2.2.191-199
- Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock, AWAM and Govers F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102:348-364 <https://doi.org/10.1094/PHTO-01-11-0025>
- Linde C, Kemp GHJ and Wingfield MJ. 1999. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* 105 (3): 231-239 <https://doi.org/10.1023/A:1008780429770>
- Lucas A, Colquhoun IJ, McComb JA and Hardy GESTJ. 2002. A new, rapid and non-invasive technique to inoculate plants with *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 31, 27-30 <https://doi.org/10.1071/AP01054>
- Mondragón-Flores A, Manosalva P, Ochoa-Ascencio S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G and Fernández-Pavía SP. 2022. Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitacuaro, Michoacan. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(1): 1-23 DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>
- Ochoa-Fuentes YM, Martínez-de la Vega O, Olalde-Portugal V, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Castillo FD and Flores-Olivas A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2):161-166
- Ochoa-Fuentes M, Cerna-Chávez E, Gallegos-Morales G, Cepeda-Siller M, Landeros-Flores J y Flores-Olivas A. 2015. Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill. de Michoacan, Mexico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2(5):211-215

- O'Gara E, Howard K, McComb J, Colquhoun IJ and Hardy GESJ. 2015. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 64: 207-215. <https://doi.org/10.1111/ppa.12244>
- Pagliaccia D, Pond E, McKee B and Douhan GW. 2013. Population genetic structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with avocado in California and the discovery of a potentially recent introduction of a new clonal lineage. Phytopathology 103:91-97
- Pais M, Win J, Yoshida K, Etherington G, Cano L, Raffaele S, Banfield M, Jones A, Kamoun S and Sounders D. 2013. From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. Genome Biology 14:211. <http://genomebiology.com/2013/14/6/211>
- Ploetz RC. 2013. Phytophthora root rot of avocado. Pages 197-203 in: Phytophthora: A Global Perspective. CABI Plant Protection Series. K. Lamour, ed. CABI, England
- Pérez-Jiménez RM 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. The European Journal of Plant Science and Biotechnology 2: 1-24
- Ramírez-Gil JG, Castañeda DA y Morales JG. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. Revista Ceres 61: 50-61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthium vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. Phytopathologia Mediterranea 57: 89-106
- Salazar GS, Velasco CJJ, Medina TR y Gómez AJR. 2004. Selecciones de aguacate con potencial de uso como portainjertos. I. Prendimiento y crecimiento de injerto. Revista Fitotecnia Mexicana 27:23-30
- SIAP (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2020. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 pp
- Zentmyer GA.1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul, Minnesota. 96 pp.

**Capítulo I. Artículo publicado en la revista Mexicana de Fitopatología.**

<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>

**Characterization and sensitivity to fungicides of isolates of *Phytophthora cinnamomi* causing avocado root rot in Zitácuaro, Michoacan.**

**Caracterización y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Phytophthora cinnamomi* causante de pudrición de raíz en aguacate en Zitácuaro, Michoacán**

**Alejandra Mondragón-Flores**<sup>1,2</sup>, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. UMSNH, Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5 Tarímbaro Michoacán. CP 58880. <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de Apatzingán- INIFAP. Carretera Apatzingán-Cuatro caminos km 17.5, Antúnez, Michoacán. CP. 60780; **Patricia Manosalva**, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of California, Riverside, CA. CP 92521; **Salvador Ochoa-Ascencio**, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas no. 2290 Jardines del Cupatitzio Uruapan, Michoacán. CP 60170; **Marlene Díaz-Celaya**<sup>1</sup>, **Gerardo Rodríguez-Alvarado**<sup>1</sup>, **Sylvia P. Fernández-Pavía**<sup>1\*</sup>

\*Corresponding author: [patricia.pavia@umich.mx](mailto:patricia.pavia@umich.mx)

**Resumen.** *Phytophthora cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la pudrición de raíz en aguacate. En Zitácuaro, Michoacán la producción ha aumentado un 19.8 %; sin embargo, actualmente no existen estudios de esta enfermedad en la región. El objetivo de estudio fue caracterizar aislados obtenidos de raíces de aguacate y evaluar la sensibilidad a fungicidas. Se tomaron muestras de cinco huertas de aguacate, tomando cinco árboles por huerta (25 muestras en total). A partir de las muestras se aislaron, se identificaron morfológica y molecularmente las cepas obtenidas. Se analizó el tipo de compatibilidad con aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate). Para comprobar la patogenicidad, se realizaron pruebas en frutos de aguacate con los aislados. Se evaluó la sensibilidad de 15 aislados a fosfito de potasio y metalaxil-M en diferentes concentraciones bajo condiciones *in vitro*. En un subgrupo de seis aislados se evaluó la relación entre la tasa de crecimiento y la sensibilidad a fosfito de potasio. Se obtuvieron 15 aislados con micelio cenocítico coraloide, clamidosporas, esporangios sin papila, ovoides y elipsoides, con proliferación interna, heterotálicos, tipo de compatibilidad A2, con anteridios anfíginos y oosporas pleróticas características que concuerdan con *P. cinnamomi*. Los aislados inoculados fueron patógenos en frutos de aguacate. Los aislados

fueron más sensibles a fosfito de potasio que a metalaxil-M, con valores promedio de  $CE_{50}$  de 24.62 y 0.215  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., respectivamente. No se observó relación entre la tasa de crecimiento y la sensibilidad a fosfito de potasio. Es necesario obtener mayor número de aislados para estudios de virulencia.

**Palabras clave:** sensibilidad, tipo de compatibilidad, crecimiento micelial, marchitez.

**Abstract.** *Phytophthora cinnamomi* is the pathogen most frequently associated with avocado root rot. In Zitácuaro, Michoacán, production has increased by 19.8%; however, there are no studies of root rot in this area. The objective of the study was to characterize the isolates obtained from avocado roots and assess the sensitivity to fungicides. Samples from 5 avocado orchards were collected, sampling 5 trees per orchard (a total of 25 samples). The samples isolated were characterized morphological and molecularly. Mating type was analyzed using reference isolates of *P. cinnamomi* A1 (isolates from camelia) and A2 (isolate from avocado). To confirm the pathogenicity, tests were performed on avocado fruits with the isolates. The sensitivity of 15 isolates to potassium phosphite and to metalaxyl-M at different concentrations was evaluated *in vitro*. In a subgroup of six isolates, it was evaluated whether there was a relationship between growth rate and potassium phosphite sensitivity. Fifteen isolates were obtained with coenocytic coraloid mycelium, chlamydospores, sporangia without papilla, ovoid to ellipsoid, with internal proliferation, heterothallic with mating type A2, with amphigynous antheridia and plerotic oospores, characteristics consistent with *P. cinnamomi*. The inoculated isolates were pathogenic on avocado fruits. The isolates were more sensitive to potassium phosphite than to metalaxyl, with mean  $EC_{50}$  values of 24.62 and 0.215  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., respectively. No relationship was observed between growth rate and potassium phosphite sensitivity. It is necessary to obtain a greater number of *P. cinnamomi* isolates for virulence studies.

**Key words:** sensitivity, mating type, mycelial growth, wilt.

**INTRODUCCIÓN.** El aguacate (*Persea americana*) es un cultivo frutal de gran importancia que se produce en diversas regiones del mundo, en la actualidad se encuentra plenamente documentado que el aguacate es fuente importante de energía y vitaminas (Araújo *et al.*, 2018). México es el principal productor y exportador de aguacate con una producción de más de 2.3 millones de toneladas, seguido de República Dominicana, Perú e Indonesia (FAOSTAT, 2020). A nivel nacional, Michoacán aporta más del 70 % de la producción, destacando los municipios de Ario de Rosales, Salvador Escalante, Tacámbaro y Tancítaro, por el volumen producido (SIAP, 2019). De acuerdo con el Servicio de Información Alimentaria y Pesquera en el municipio de Zitácuaro la producción de aguacate ha ido en aumento, ya que en 2010 alcanzó 10,027 t y en 2019 12,509 t, lo que representó un incremento del 19.8 %.

Una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de aguacate a nivel mundial debido a su frecuencia, severidad y pérdidas económicas, es la pudrición de raíz o marchitez (Coffey, 1992; Ramírez-Gil *et al.*, 2014). En México, esta enfermedad afecta a todas las variedades y es responsable del aumento de la mortalidad de los árboles en las principales zonas de producción de aguacate, encontrándose en el 5 % de la superficie total del cultivo en Michoacán (Téliz, 2000). La pudrición de raíz, ocasiona necrosis en las raíces alimentadoras, clorosis, defoliación y muerte descendente, lo que reduce el rendimiento y la muerte de los árboles (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). La enfermedad es más severa y se desarrolla rápidamente en suelos pesados, con poco drenaje y a una temperatura promedio de 24 °C (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996). Hongos fitopatógenos como *Calonectria ilicicola*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* y *Rosellinia necatrix*, entre otros, se han asociado a esta enfermedad (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009; Dann *et al.*, 2012; Vitale *et al.*, 2012; Olalde-Lira *et al.*, 2020). Recientemente, en las islas Canarias se identificaron las especies *P. cinnamomi*, *P. citricola* sensu lato, *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora* y *Phytophthora vexans*, ocasionando pudrición de raíz en aguacate (Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). En Michoacán, se reportó a *Pythium* sp. *amazonianum* y a *P. vexans* asociados a marchitez y a pudrición de raíz (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). Sin embargo, *P. cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la pudrición de raíz de aguacate, el cual generalmente, infecta raíces finas y alimentadoras por medio de zoosporas móviles (O’Gara

*et al.*, 2015; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). En el género *Phytophthora*, la identificación de la especie *P. cinnamomi* se facilita por sus características morfológicas particulares; en medio V8 desarrolla colonias algodonosas con micelio cenocítico prominente, con hifas resistentes e hinchamientos (coraloide), clamidosporas, esporangios ovoides y elipsoides no papilados ausentes en medio de cultivo, usualmente estos caracteres son suficientes para su identificación (Erwin y Ribeiro, 1996; Robin *et al.*, 2012).

Los fungicidas más utilizados para el control de *P. cinnamomi* son metalaxil-M (Mtx) y fosfito de potasio (Fp) (Ramírez-Gil *et al.*, 2017). Desde 1977, el Mtx fue introducido al mercado, se sabe que afecta el complejo polimerasa I, inhibiendo la síntesis de la ARNr, además afecta el crecimiento de las hifas y la formación de haustorios y esporas (Müller y Ulrich, 2012). En 1984, Darvas y Becker reportaron que después de constantes aplicaciones de Mtx a los suelos, es difícil controlar la pudrición de raíz en plantas de aguacate jóvenes, sugiriendo una pérdida de sensibilidad. Estudios demuestran que especies como *P. cryptogea*, *P. nicotianae* son insensibles o de insensibilidad intermedia a mfenoxam a concentraciones de 1 o 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i. a. (Hwang y Benson, 2005). Sin embargo, en pruebas de sensibilidad a Mtx de poblaciones de *P. cinnamomi* aisladas de aguacate en California, se obtuvieron concentraciones de  $\text{CE}_{50}$  de 0.023 a 0.138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., confirmando la sensibilidad de los aislados al fungicida (Belisle *et al.*, 2019a).

El fosfito de potasio tiene un mecanismo de acción complejo, se sabe que tiene efecto fungistático directo, que reduce el crecimiento y esporulación del patógeno, permitiendo al hospedante que su sistema de defensa tenga más tiempo para matar al organismo invasor (Guest y Grant, 1991; Dann y MacLeod, 2021). Estudios con *Phytophthora* spp. confirman la variación inter e intraespecífica en la tolerancia a Fp, además de la promoción del crecimiento del micelio de los aislados expuestos a bajas concentraciones (Hunter *et al.*, 2018). En Australia, poblaciones de *P. cinnamomi* presentaron variación en la sensibilidad a Fp, con valores de  $\text{CE}_{50}$  que oscilan entre 4 a 148  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., (Wilkinson *et al.*, 2001). Recientemente en California se detectaron en poblaciones de *P. cinnamomi* del linaje A2, aislados genéticamente distintos, los cuales son menos sensibles a fosfito de potasio y con alta virulencia (Belisle *et al.*, 2019b). Linde *et al.* (1999) sugieren que aislados de *P. cinnamomi* con una mayor tasa de crecimiento pueden ser más virulentos, además otras

investigaciones han concluido que algunos aislados menos sensibles a fosfito de potasio también son más virulentos (Belisle *et al.*, 2019b).

La superficie cultivada con aguacate en el municipio de Zitácuaro, Michoacán ha ido en aumento en los últimos años, dadas las condiciones agroclimáticas dominantes que resultan aptas para su desarrollo; sin embargo, la pudrición de raíz en huertos comerciales de aguacate también está presente y no se tienen a la fecha estudios sobre la etiología de la enfermedad en esta región productora. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípicamente aislados obtenidos de raíces de aguacate en Zitácuaro, Michoacán y evaluar la sensibilidad a fungicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Características de las huertas.** En noviembre del 2019, se muestrearon cinco huertas de aguacate ubicadas en el municipio de Zitácuaro, Michoacán. Todas las huertas se encuentran en un clima A(C)(w<sub>1</sub>)(w), semicálido subhúmedo con abundantes lluvias en verano, lluvia invernal menor a 5 %, humedad intermedia, de acuerdo con el sistema climático Köppen modificado por García (1981) y tienen establecida la variedad ‘Hass’, además tienen suelos pesados, ricos en arcilla. Otras características de las huertas se indican en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Características de los sitios de colecta de raíces de aguacate en Zitácuaro Michoacán

Huerta	Localidad	Altura msnm	Latitud	Longitud	Humedad	Total de muestras
Benedicto	San Felipe	1890	19° 49 '00 "N	100° 37 '41 "W	Temporal	5
Los llanos	San Felipe	1890	19° 49 '08 "N	100° 37 '52 "W	Temporal	5
Los llanos 2	Macutzio	1900	19° 49 '17 "N	100° 35 '50 "W	Riego	5
El Martín	Carpintero	2176	19° 49 '05 "N	100° 31 '58 "W	Temporal	5
El dorado	La soledad s	2266	19° 46 '80 "N	100° 29 '50 "W	Riego	5

**Colecta de muestras y aislamiento.** Se colectaron muestras de raíces y suelo de la rizósfera, una muestra por árbol y cinco árboles por huerta, con síntomas de amarillamiento, defoliación y muerte descendente. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas en una hielera y se transportaron al laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Con la finalidad de obtener un mayor porcentaje de aislados a partir de raíces, se modificaron los protocolos de Erwin y Ribeiro (1996) y Rodríguez-Padrón *et al.* (2018). Se seleccionaron raíces laterales parcialmente necrosadas, se lavaron con agua corriente y se secaron con toallas de papel estériles. Cortes de tejido de aproximadamente 3 cm, con una parte sana y una necrosada se colocaron en *cassettes* de inclusión, los cuales se sumergieron en cloro comercial al 2 % (v/v) durante 45 s y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Se retiró el exceso de agua de los cortes de tejido con toallas de papel, estériles y se colocaron en cajas Petri con medio selectivo NARPH-V8 (Natamicina 0.02 g L<sup>-1</sup>, PCNB (Pentacloronitrobenzeno) 0.10 g L<sup>-1</sup>, Ampicilina 0.27 g L<sup>-1</sup>, Rifampicina 0.01 g L<sup>-1</sup>, Himexazol 0.075 g L<sup>-1</sup>). Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad de 24 a 48 h, hasta que se observó el crecimiento de micelio cenocítico y con hinchamientos característico de *P. cinnamomi*. Las colonias se purificaron por cultivo sucesivo de punta de hifa en medio de cultivo harina de maíz agar (HMA, Fluka®).

**Tipo de compatibilidad.** La compatibilidad de los aislados obtenidos se determinó usando los aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate) que fueron donados por la Universidad de California de Riverside al Laboratorio de Patología Vegetal (IIAF). En una caja Petri con medio scV8 agar (900 mL de agua destilada, 100 mL de jugo V8 Campbell's, 1 g CaCO<sub>3</sub>), se colocó un disco de micelio de un aislado con tipo de compatibilidad A1 y en otra caja el tipo A2. Asimismo, en cada una de las cajas se colocó un disco de micelio del aislado de interés aproximadamente a un centímetro de distancia. Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 10 días. A los aislados que formaron oosporas se les asignó el tipo de compatibilidad complementario en la cruz.

**Caracterización morfológica.** Los cultivos puros se cultivaron en medio HMA y medio cV8 agar (10 g de CaCO<sub>3</sub>, 1 L de jugo V8, centrifugado a 4,000 rpm por 20 min) (Fernández-

Pavía *et al.*, 2020). Se caracterizó la forma de la colonia y la apariencia del micelio. Para la producción de esporangios se modificó el protocolo de Hwang *et al.* (1975); tres discos de micelio de 5 mm de cada aislado se cultivaron por triplicado en cajas Petri 60 x15 mm con 10 mL de medio scV8 agar, sobre papel celofán transparente y expuestos a luz por 24 h. El papel celofán con el micelio se transfirió a una caja Petri, se le agregaron 10 mL de medio líquido scV8 (900 mL de agua destilada, 100 mL jugo de verduras V8 (Campbell's), 1g CaCO<sub>3</sub>), se incubaron durante 24 h a 18 °C en oscuridad, se decantó el medio líquido, se enjuagaron tres veces y se inundaron con una solución de sales de acuerdo con el protocolo de Chen y Zentmyer, (1970) (se disolvieron en un litro de agua destilada: 1.64 g de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.05 g de KNO<sub>3</sub> y 0.48 g de MgSO<sub>4</sub>, la solución se esterilizó 20 min a 15 lb de presión); a continuación se expusieron a luz blanca a 25 °C, cada 24 h, se enjuagaron tres veces con la solución salina, por dos días consecutivos y se registraron las estructuras reproductivas observadas (Erwin y Ribeiro, 1996; Abad *et al.*, 2019).

**Pruebas de patogenicidad.** Para realizar las pruebas de patogenicidad se seleccionaron cuatro aislados que se inocularon en frutos de aguacate con madurez fisiológica, se lavaron con jabón y agua corriente y se asperjaron con alcohol al 75 % para desinfectarlos. Dos discos de micelio de 6 mm de diámetro de los aislados ZITR-1-3, ZITR-2-5, ZITR-3-4 y ZITR-5-3, de cuatro días de edad desarrollados en medio harina de maíz, se colocaron en los costados de los frutos, los discos se cubrieron con cinta masking tape Janel™, se usaron tres frutos por aislado, una vez inoculados se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 25 °C. Como testigos tres frutos fueron inoculados con discos de medio harina de maíz.

**Sensibilidad a fungicidas.** Se evaluó la sensibilidad de 15 aislados a fosfito de potasio (Fp) (Nutriphite plus magnum 40 % Gowan®) a concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 y 600 µg mL<sup>-1</sup> de i.a. y a metalaxil-M (Mtx) (RidomilGold® 480SL) 0, 0.5, 1, 3 y 5 µg mL<sup>-1</sup> de i.a. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, con tres réplicas. La concentración efectiva a la cual se inhibió el 50 % del crecimiento micelial (valor de CE<sub>50</sub>) se calculó utilizando el método tradicional de dilución en agar (Gray *et al.*, 2018). El fungicida se agregó en medio cV8-A al 10% para obtener las concentraciones finales. Discos de 6 mm de micelio de los aislados de cuatro días de edad cultivados en HMA,

se colocaron en el centro de las cajas Petri que contenían las diferentes concentraciones. Después de tres días de incubación en oscuridad a 22 °C, se midió el crecimiento de la colonia en dos direcciones perpendiculares, se restó la medida del disco de inóculo y se obtuvo el promedio. El crecimiento se calculó dividiendo el diámetro de la colonia en las cajas Petri con fungicida, entre el promedio de crecimiento de las cajas testigo y se expresó como porcentaje (Hu *et al.*, 2010).

**Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio.** Se seleccionaron seis aislados con base en el porcentaje de inhibición a Fp; tres aislados con bajo porcentaje de inhibición y tres con alto porcentaje de inhibición (se agregó una A (alto) y una B (bajo) al final del código de identificación de cada aislado usado en esta prueba), para determinar si existía o no una relación entre velocidad de crecimiento y sensibilidad. La tasa de crecimiento (mm por día) se determinó a 22 y 25 °C en los medios de cV8 agar y HMA, siguiendo la metodología descrita por Belisle *et al.* (2019b). Se cortaron discos de agar de 7 mm de diámetro del margen de las colonias de 4 días desarrolladas en medio HMA, se transfirieron a las cajas con los medios correspondientes y se incubaron en la oscuridad durante cuatro días a las dos temperaturas. El diámetro de la colonia se midió diariamente.

Para calcular los valores de la CE<sub>50</sub> se estimó el porcentaje promedio de inhibición de las dos repeticiones para cada concentración de los fungicidas en función del porcentaje observado en el grupo testigo, utilizando la siguiente fórmula  $ICR (\%) = (CRT - CRF) / CRT \times 100$ , donde ICR es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, CRT es el crecimiento radial del testigo y CRF es el crecimiento radial en cada una de las concentraciones. Para obtener la CE<sub>50</sub> se incluyó el logaritmo natural de cada una de las concentraciones examinadas; se hizo el análisis probit para cada aislado asociado con el 50 % de su inhibición (Adaskaveg *et al.*, 2015). Los experimentos se hicieron por duplicado.

Para determinar el efecto de la temperatura y del medio en los aislados, se tomó en consideración el crecimiento final; se obtuvo el promedio y con estos valores se procedió a realizar un análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, 0.05) para un experimento factorial 2x2. Con la información del promedio de crecimiento final se construyeron gráficos de interacción para observar el efecto del factor sobre la variable. Los análisis y gráficos se realizaron con R versión 4.0.1 (2020-06-06).

**Caracterización molecular.** Los aislados ZITR-1-3 y ZITR-5-3 se crecieron en medio de ejote (papilla de ejote y calabacita: Gerber Nestlé®, 339 g, agar 15 g y agua 646 mL) por cinco días. El micelio se colectó, deshidrató a 39 °C durante 24 h, almacenó a -20 °C por 24 h, molió y se extrajo el ADN genómico siguiendo un protocolo de extracción con base en CTAB (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Varioskan Flash Thermo Scientific NanoDrop 2000®) y diluyó para obtener una concentración de 12 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . El ADN se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos para la región del espaciador interno transcrito (ITS). Las reacciones contenían 6.25  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 0.0625  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos ITS4 (TCCTCCgCTTATTgATATgC) e ITS6 (gAAgAAggTgAAgTCgTAACAagg) (100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (30 ng) y agua destilada ultrapura hasta tener un volumen final de 13  $\mu\text{L}$ . Las reacciones de amplificación se hicieron en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial durante 2 min a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización durante 1 min a 94 °C, alineación durante 1 min a 53 °C, extensión durante 1 min a 72 °C, y una extensión final durante 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR se secuenciaron (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) y las secuencias fueron editadas usando los programas PreGap y Gap (<http://staden.sourceforge.net>). Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con el programa Blast de NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] para comparar con otras secuencias de Oomicetes de esta base de datos.

## RESULTADOS

**Aislados obtenidos.** Se hizo una siembra por cada muestra de raíces de un total de 25 muestras. Se obtuvieron 15 aislados (Cuadro 2) con características morfológicas de *P. cinnamomi*, en el resto de las cajas se observó crecimiento bacteriano, por lo que se descartaron.

**Cuadro 2.** Comparación de medias (Tukey, 0.05) de diámetro de crecimiento e inhibición (%) de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Zitácuaro, Michoacán, expuestos a fosfito de potasio y metalaxil-M.

Fosfito de potasio (Fp)	Metalaxil-M (Mtx)
-------------------------	-------------------

Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)	Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)
0	16.4	a	0	17.7	a
5	16.5	a	0.5	5.0	b
10	11.2	b	1	2.3	c
25	8.7	c	3	0.66	d
50	3.9	d	5	0.46	d
100	1.0	e			
300	0.2	e			
600	0.0	e			

<sup>z</sup>Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

**Tipo de compatibilidad.** Las cruces de los aislados con una cepa de tipo de compatibilidad A1 de *P. cinnamomi*, produjeron oosporas pléroticas con anteridios anfiginos. Las cruces de los aislados con una cepa de tipo de compatibilidad A2 solamente produjeron clamidosporas globosas (Figura 1D). Los resultados indican que los aislados corresponden al tipo de compatibilidad A2.

**Caracterización morfológica y molecular.** Los aislados desarrollaron colonias de forma rosácea y bordes ondulados, con micelio abundante, algodonoso, coraloide, hifas cenocíticas con hinchamientos, con clamidosporas globosas, en medio de cultivo HMA, en medio sV8-A las colonias presentaron forma estrellada (Figuras 1F-G). Los aislados produjeron esporangios sin papila, ovoides, elipsoides, con proliferación interna y persistentes, en los cultivos inundados con una solución de sales (Figura 1A-E). Las características observadas concuerdan con las reportadas para *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005; Abad *et al.*, 2019). Las secuencias analizadas de la región ITS de los aislados seleccionados para la identificación molecular ZITR-1-3 y ZITR-5-3, coinciden con las reportadas para *P. cinnamomi*.

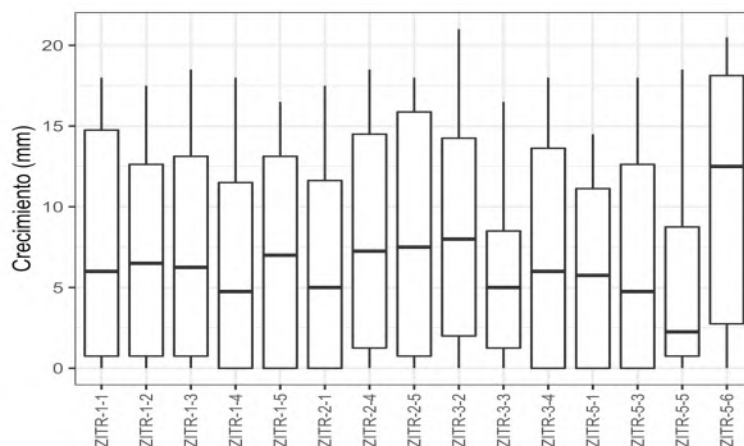
**Pruebas de patogenicidad.** Las pruebas en frutos de aguacate resultaron positivas, a las 72 h posinoculación (hpi) se observaron lesiones oscuras, circulares, con bordes irregulares en la epidermis. A las 96 hpi las lesiones tenían entre 3 y 6 cm de diámetro. Los frutos testigos

no presentaron daños y todos los aislados fueron reaislados de los frutos inoculados, demostrándose así la patogenicidad al completarse los postulados de Koch (Figura 1H).



**Figura 1.** Características morfológicas y patogenicidad de *P. cinnamomi*. **A)** Micelio coraloide; **B-C)** Esporangios sin papilas ovoides-elipsoides; **D)** Clamidosporas globosas en grupos; **E)** Proliferación interna de esporangios; **F)** Colonia en forma estrellada, algodonosa en medio cV8A; **G)** Colonia rosácea en medio HM; **H)** Patogenicidad en frutos de los aislados (de arriba hacia abajo) ZITR-2-5, ZITR-3-4, ZITR-5-3, ZITR-1-3 y testigo.

**Sensibilidad a fungicidas.** El efecto de los fungicidas Fp y Mtx en el crecimiento de la colonia y porcentaje de inhibición de los aislados entre tratamientos resultó significativo ( $P > 0.001$ ). No se detectaron aislados resistentes a los fungicidas. Con Fp no se observaron diferencias estadísticas entre aislados para crecimiento ( $P > 0.63$ ) ni para inhibición ( $P > 0.982$ ) del micelio, caso contrario fue entre las diferentes concentraciones donde si hubo significancia. Además, algo particular que se observó fue la promoción del crecimiento de ocho aislados (ZITR-1-3, ZITR-1-5, ZITR-2-1, ZITR-2-4, ZITR-3-2, ZITR-3-4, ZITR-5-1, ZITR-5-3) por Fp a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1.15-18.61%) (Figura 2). En la comparación de medias se formaron seis grupos, no se observó diferencia significativa de crecimiento entre el control (16.76 mm) y la primera concentración (16.02 mm); el crecimiento fue mayormente inhibido a 100, 300 y  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando estas concentraciones estadísticamente iguales, tanto para crecimiento como para inhibición (Cuadro 2). Los valores del efecto de Fp en la inhibición del crecimiento oscilaron entre 54.7 y 74.2 % con respecto al testigo y para la  $CE_{50}$  entre  $11.8$  y  $37.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  con una media de  $24.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfito de potasio. Para Mtx, se observó menor variación entre los tratamientos con respecto a Fp, a concentraciones de 3 y  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  el micelio fue mayormente inhibido, el porcentaje de inhibición osciló entre 80.4 y 100% y los valores de  $CE_{50}$  oscilaron entre 0.08 y  $0.34 \mu\text{g mL}^{-1}$  con una media de  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil-M. Entre los aislados no hubo significancia en el crecimiento ( $P > 0.996$ ) ni en la inhibición ( $P > 1.0$ ) del micelio (Cuadro 3).



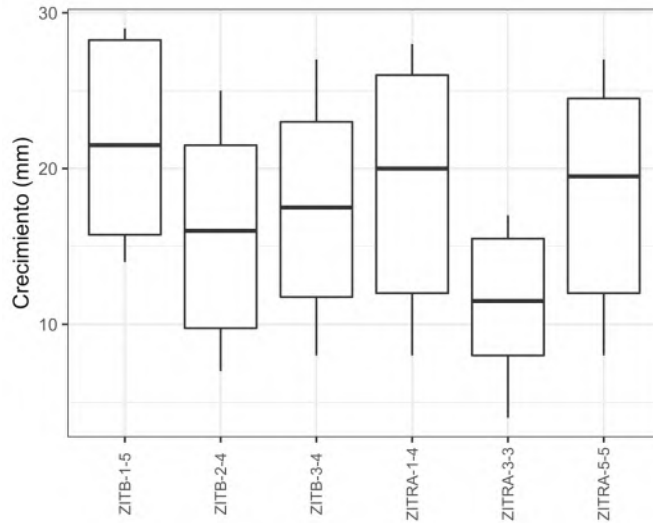
**Figura 2.** Inhibición del crecimiento micelial de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Zitácuaro Michoacán ante fosfito de potasio.

**Cuadro 3.** Tipo de compatibilidad, CE<sub>50</sub> e inhibición (%) a fosfito de potasio y a metalaxil-M de aislados de *P. cinnamomi* colectados en el municipio de Zitácuaro, Mich.

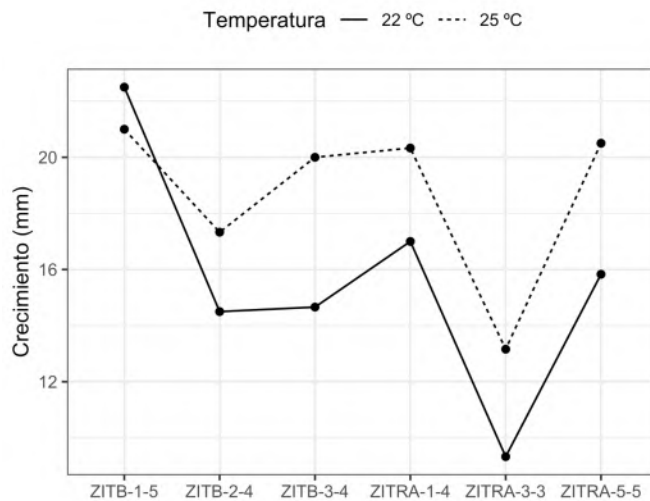
Aislados	Tipo de compatibilidad	% de inhibición (Fp)	CE <sub>50</sub> (Fp) (µg mL <sup>-1</sup> )	% de inhibición (Mtx)	CE <sub>50</sub> (Mtx) (µg mL <sup>-1</sup> )
ZITR-1-1	A2	63.3	24.5	88.7	0.18
ZITR-1-2	A2	65.3	21.6	90.7	0.15
ZITR-1-3	A2	62.3	37.7	87.7	0.26
ZITR-1-4	A2	71.1	15.7	87.8	0.20
ZITR-1-5	A2	60.8	26.4	88.3	0.15
ZITR-2-1	A2	63.2	21.8	83.3	0.35
ZITR-2-4	A2	56.5	31.6	85.8	0.17
ZITR-2-5	A2	61.4	26.9	88.2	0.25
ZITR-3-2	A2	54.7	34.7	83.9	0.34
ZITR-3-3	A2	72.7	11.8	100	-----
ZITR-3-4	A2	63.2	23.8	80.4	0.22
ZITR-5-1	A2	63.3	24.0	88.2	0.26
ZITR-5-3	A2	66.8	18.7	93.3	0.24
ZITR-5-5	A2	74.2	12.4	87.1	0.08
ZITR-5-6	A2	55.0	37.7	90.2	0.17

**Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio.** Los análisis mostraron un efecto significativo ( $P > 0.001$ ) en la tasa de crecimiento del micelio a las dos temperaturas y en los dos medios nutritivos y sus interacciones; en la prueba de comparación de medias se formaron seis grupos, los aislados con mayor inhibición (%) a Fp presentaron una mayor velocidad de crecimiento que los de menor inhibición; sin embargo, en el aislado ZITRA-3-3 con mayor inhibición (%) se observó la menor tasa de crecimiento (11.25 mm) y ZITRB-1-5 con menor inhibición (%) una mayor (21.75 mm), aunque éste último también presentó mayor variación en los datos (Figura 3). El crecimiento de los aislados ZITRA-1-4, ZITRA-5-5, ZITRB-3-4 y ZITRB-2-4 osciló entre 18.66 y 15.91 mm. Se observó una tasa

de crecimiento mayor de las colonias a 25 °C y en medio de cultivo cV8-A, a excepción del aislado ZITRB-1-5, que presentó mayor crecimiento a 22 °C (Figura 4). La morfología de la colonia varió de acuerdo con medio de cultivo, los aislados en cV8-A, presentaron colonias de forma estrellada y en HMA de forma rosácea.



**Figura 3.** Efecto de temperatura y medio de cultivo en el crecimiento micelial de seis aislados de *P. cinnamomi* obtenidos de raíces de aguacate con pudrición



**Figura 4.** Efecto de las temperaturas 22 y 25 °C en seis aislados de *P. cinnamomi* aislados de raíces de aguacate con pudrición.

## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de aislados de *P. cinnamomi* asociados con la marchitez del aguacate en la región oriente de Michoacán, que incluye el municipio de Zitácuaro. Otros estudios sobre esta enfermedad han reportado la presencia de *P. cinnamomi* en otras áreas del estado (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). La superficie cultivada de aguacate en Zitácuaro se ha incrementado en los últimos años y potencialmente podría ser un área importante de producción en el futuro; sin embargo, la presencia del patógeno *P. cinnamomi* representa una amenaza para el cultivo. Esta zona presenta ciertas características agroclimáticas, como es la presencia de suelos de tipo Acrisol, que favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Zentmyer, 1980; Guillén-Andrade *et al.*, 2007). Los árboles muestreados fueron adultos, establecidos en huertos con suelos con alto contenido de arcilla y poco drenaje, factores que contribuyeron a la presencia de la enfermedad (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). Aun cuando en este trabajo se recuperaron solamente aislados con características morfológicas de *P. cinnamomi* en árboles con pudrición de raíces, no se descarta la presencia de otros oomicetes.

Todos los aislados correspondieron al tipo de compatibilidad A2, lo que es indicativo de que el oomiceto se está reproduciendo de manera asexual. Aunque en Michoacán, Ochoa-Fuentes *et al.* (2005) reportaron los dos tipos de compatibilidad mediante marcadores moleculares, no lo demostraron mediante cruces, como se hizo en el presente estudio, que se considera la forma más precisa para determinarlos. Las características morfológicas observadas en los aislados concuerdan con las descritas para *P. cinnamomi* de acuerdo a Abad *et al.* (2019), identidad que se corroboró, con la amplificación de la región ITS en aislados seleccionados y cuya patogenicidad se demostró en frutos de aguacate. *P. cinnamomi* se encuentra entre los 10 principales oomicetos patógenos de plantas, que infecta más de 5000 especies (Hardham, 2005) y su patogenicidad ha sido demostrada (Linde *et al.*, 1999; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018; Belisle *et al.*, 2019b).

Desde hace años, los fosfitos se han utilizado para el control de la pudrición de raíz, los productores de aguacate utilizan con mayor frecuencia el fosfito de potasio que el metalaxil-M, debido a que es eficaz y de menor costo que otros (Adaskaveg *et al.*, 2015; Belisle *et al.*, 2019b). Nuestros resultados demuestran que no hay aislados resistentes a los

fungicidas evaluados en Zitácuaro Mich; sin embargo, por lo que respecta a fosfito de potasio se observó menor sensibilidad de los aislados con respecto a metalaxil-M. Los valores obtenidos de  $CE_{50}$  oscilaron entre 11.8 y 37.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfito de potasio y para la inhibición del crecimiento entre 54.7 y 74.2 % comparado con el testigo, los cuales resultan similares a los obtenidos por Wilkinson *et al.* (2001), quienes obtuvieron valores de inhibición que oscilaron entre 59 y 100 %. En ocho de los aislados se observó una promoción de crecimiento cuando fueron expuestos a la concentración de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a de fosfito de potasio, resultados que concuerdan con los de Wilkinson *et al.* (2001) y Hunter *et al.* (2018). Lo anterior podría deberse a que, a bajas concentraciones de fosfito de potasio, en medio rico en nutrientes cV8, sea más fácil para *P. cinnamomi* alterar el crecimiento como una estrategia de supervivencia, además que por su efecto fungistático no afecta el crecimiento micelial (Guest y Grant, 1991; Hunter *et al.*, 2018). Otra razón es la pérdida de sensibilidad de los aislados debido a la posible exposición frecuente al fungicida ya que son sometidos a una presión de selección, situación que eventualmente podría generar el desarrollo de resistencia, incluso aunque no exista recombinación sexual (Dobrowolski *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2018). Además de *P. cinnamomi*, se ha reportado la sensibilidad a fosfito de potasio de *P. syringae*, *P. citrophthora*, sin embargo, la inhibición del crecimiento de las especies *in vitro*, no es indicativo de que en campo el control de la enfermedad sea efectivo (Hao *et al.*, 2021).

Por otro lado, aunque Marin *et al.* (2021) reportaron desarrollo de resistencia de especies de *Phytophthora* a metalaxil-M (mefenoxan), en el presente estudio se observó en promedio un 88.24 % de inhibición del crecimiento y un valor de  $CE_{50}$  de 0.08 y 0.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil-M  $\text{mL}^{-1}$  lo que sugiere que las poblaciones *P. cinnamomi* obtenidas de aguacate son sensible al fungicida. En un estudio similar, los aislados obtenidos de plantas ornamentales de vivero fueron menos sensibles con valores de  $CE_{50}$  de 0.01-0.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil (Hu *et al.*, 2010). Lo anterior puede deberse a que en los viveros las aplicaciones son más controladas y con menor frecuencia que en campo. En Carolina del Norte, en pruebas de sensibilidad de *P. cinnamomi* aislada de árboles de navidad a metalaxil se obtienen porcentajes de inhibición que oscilan entre 89 y 100 %, esto a pesar de que en el lugar se hacen aplicaciones de metalaxil dos o tres veces al año (Benson y Grant, 2000). Lo anterior confirma que *P. cinnamomi* es sensible a metalaxil-M, además los altos porcentaje de inhibición de crecimiento micelial por metalaxil-M, también se han observado en otras

especies como *P. nicotianae* (73.5%) y *P. × pelgrandis* (97.5%) (Pánek y Tomšovský *et al.*, 2017).

Así mismo, González *et al.* (2014) indicaron que el medio de cultivo V8 promueve el crecimiento de *Phytophthora* respecto a otros medios. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo ya que los aislados con mayor crecimiento fueron los cultivados en V8. Se observó diferencia de crecimiento entre las dos temperaturas, favoreciéndoles la de 25 °C, la cual se encuentra dentro del rango de temperatura óptima de crecimiento de *P. cinnamomi* que oscila entre 24 y 28 °C (Erwin y Ribeiro 1996).

En México, los estudios de sensibilidad de aislados de *P. cinnamomi* a fungicidas son escasos. Los resultados de este trabajo dan una estimación del rango de sensibilidad a fosfito de potasio y metalaxil-M de aislados de *P. cinnamomi* causando pudrición de raíz en aguacate en el municipio de Zitácuaro Michoacán; sin embargo, es necesario hacer más estudios que incluyan un mayor número de aislados provenientes de los principales municipios productores, que nos permita determinar si las poblaciones del patógeno están desarrollando tolerancia a dichos fungicidas.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que, en Zitácuaro, Michoacán, *P. cinnamomi* es el principal oomicete presente en raíces de aguacate con pudrición, de 25 muestras de raíces, se obtuvieron 15 aislados con características morfológicas de *P. cinnamomi*. Los aislados se inhibieron más del 98% a concentraciones de 300 y 600 µg mL<sup>-1</sup> de fosfito de potasio y arriba de 96 % a 3 y 5 µg mL<sup>-1</sup> con metalaxil- M.

## LITERATURA CITADA

- Abad ZG, Burgess T, Bienapfl JC, Redford AJ, Coffey M and Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for *Phytophthora* Science and Management, and World *Phytophthora* Collection. [https://idtools.org/id/phytophthora/about\\_authors.php](https://idtools.org/id/phytophthora/about_authors.php)
- Adaskaveg JE, Hao W and Forster H. 2015. Postharvest strategies for managing *Phytophthora* brown rot of citrus using potassium phosphite in combination with heat treatments. *Plant Disease* 99 (11): 1477-1482. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0040-RE>

- Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Ruíz HA, Pintado MM and Aguilar C. 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology* 80: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Belisle RJ, Hao W, McKee B, Arpaia ML, Manosalva P and Adaskaveg JE. 2019a. New Oomycota fungicides with activity against *Phytophthora cinnamomi* and their potential use for managing avocado root rot in California. *Plant Disease* 103 (8): 2024-2032. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1698-RE>
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019b. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHTO-09-17-0326-R>
- Benson DM and Grand L. F. 2000. Incidence of *Phytophthora* root rot of Fraser fir in North Carolina and sensitivity of isolates of *Phytophthora cinnamomi* to metalaxyl. *Plant Disease* 84(6): 661- 664. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.661>
- Chen D and Zentmyer GA. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62 (2): 397-402. <https://doi.org/10.2307/3757597>
- Coffey MD. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. Pages 423-444. *in: Plant diseases of international importance. Volumen III. Diseases of fruit crops.* Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadhyay AN. eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. 456 pp.
- Dann EK, Cooke AW, Forsberg LI, Pegg KG, Tan YP and Shivas RG. 2012. Pathogenicity studies in avocado with three necrotrophic fungi, *Calonectria ilicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria liriodendri*. *Plant Pathology* 61(5): 896-902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02579.x>
- Dann E and McLeod A. 2021. Phosphonic acid: A long-standing and versatile crop protectant. *Pest Management Science* 77(5): 2197-2208. <https://doi.org/10.1002/ps.6156>
- Darvas J and Becker O. 1984. Failure to control *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium splendens* with metalaxyl after its prolonged use. *Avocado Growers' Association Yearbook* 7: 77-78
- Dobrowolski M, Shearer B, Colquhoun I, O'Brien P and Hardy G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57(5): 928-936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01883.x>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Am. Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.

FAOSTAT. 2020. FAO Statistics División 2020. (<http://faostat.fao.org>: accesada agosto 2020).

Fernández-Pavía S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Abad GZ, Félix-Gastélum R, Ochoa-Ascencio S, Garay-Serrano E, Mondragón-Flores A, Soto-Plancarte A, Grünwald NJ y Santillán-Mendoza R. 2020. Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84p.

García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación de Köppen. 3ª Edición. Instituto de Geografía. UNAM. México, D.F.

González PFD, Costales MD and Falcón RAB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal 29 (1): 33-41. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&tlng=es)

Gray MA, Hao W, Forster H and Adaskaveg JE. 2018. Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from citrus in California. Plant Disease 102 (4): 734-742. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1155-RE>

Guest D and Grant BR. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biological Reviews 66 (2):159-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x>

Guillén-Andrade H, Lara-Chávez BN, Gutiérrez-Contreras M, Ortiz-Catón M y Ángel-Palomares E. 2007. Cartografía Agroecológica del cultivo del aguacate en Michoacán. Morevallado editores de Morelia, Michoacán, México. Primera edición. 141p.

Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6 (6): 589–604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>

Hernández-Pérez A, Cerna-Chávez E, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM and Ochoa-Fuentes YM. 2019. First report of *Phytophthora vexans* causing the “avocado sadness” in Michoacan, Mexico. Revista Internacional de Botánica Experimental 88 (1): 11-13. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.04608>

Hao W, Förster H and Adaskaveg. 2021. Resistance to potassium phosphite in *Phytophthora* species causing citrus brown rot and integrated practices for management of resistant isolates. Plant Disease 105(4): 972-977. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1414-RE>

Hu J, Hong C, Stromberg E and Moorman G. 2010. Mefenoxam sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* isolates. Plant Disease 94 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0039>

Hunter S, Williams N, McDougal R, Scott P and Garbelotto M. 2018. Evidence for rapid adaptive evolution of tolerance to chemical treatments in *Phytophthora* species and its

practical implications. PLoS ONE 13(12): e0208961.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208961>

- Hwang J and Benson DM. 2005. Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease* 89 (2):185-190. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0185>
- Hwang SC, Ko WH and Aragaki M. 1975. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 67(6): 1233-1234. <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019873>
- Linde C, Kemp GHJ and Wingfield MJ. 1999. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* 105 (3): 231-239 <https://doi.org/10.1023/A:1008780429770>
- Marin MV, Seijo TE, Zuchelli E and Peres NA. 2021. Resistance to mefenoxam of *Phytophthora cactorum* and *P. nicotianae* causing crown and leather rot in Florida strawberry. *Plant Disease* <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2474-RE>
- Müller U and Urich G. 2012. Newest aspects of nucleic acid synthesis inhibitors: Metalaxyl-M. Pages 901-908 in: *Modern Crop Protection Compounds*, 2nd ed. W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke, and M. Witschel eds. Wiley, Weinheim, German. 1608 pp.
- O’Gara E, Howard K, McComb J, Colquhoun IJ and Hardy GESJ. 2015. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 64 (1): 207-215. <https://doi.org/10.1111/ppa.12244>
- Ochoa-Fuentes YM, Hernandez FD, Landeros J, Olalde V, Cerna E, Morales JL and Flores A. 2005. Compatibilidad sexual de *Phytophthora cinnamomi* Rands en Michoacán México *Phyton* 54: 79-85
- Ochoa-Fuentes YM, Hernández-Pérez A, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM, Hernández-Bautista O and Cerna-Chávez E. 2018. First report of avocado tree wilt by *Pythium sp. amazonianum* in Mexico. *Ciencia e Investigación Agraria* 45(3): 301-305. <https://dx.doi.org/10.7764/rcia.v45i3.1905>
- Ochoa-Fuentes YM, Martínez-de la Vega O, Olalde-Portugal V, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Castillo FD and Flores-Olivas A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2):161-166
- Olalde-Lira G, Raya-Montaña YA, Apáez-Barrios P, Vargas-Sandoval M, Pedraza-Santos M, Raymundo T, Valenzuela-Garza R and Lara-Chávez MBN. 2020. Characterization of *Fusarium* spp., a phytopathogen of avocado (*Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schltdl. and Cham.) in Michoacán, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 52 (2): 301-316. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCFA/article/view/3875>

- Pánek M and Tomšovský M. 2017. *In vitro* growth response of *Phytophthora cactorum*, *P. nicotianae* and *P. × pelgrandis* to antibiotics and fungicides. *Folia Microbiol (Praha)* 62(4): 269-277. doi: 10.1007/s12223-017-0493-z
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres* 61(1): 50-61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2017. Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* under different management regimes. *Plant Pathology* 66(4): 623-632. <https://doi.org/10.1111/ppa.12620>
- Robin C, Smith I and Hansen EM. 2012. *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Phytophthoras* 2(1). <https://doi.org/10.5399/osu/fp.2.1.3041>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthium vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (1): 89-106. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-22022](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022)
- Ruano-Rosa D and López Herrera CJ. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. *Biological Control* 51(1): 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.005>
- SIAP. 2020. (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2019. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 p.
- Vitale A, Aiello D, Guarnaccia V, Perrone G, Stea G and Polizzi G. 2012. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology* 160 (3): 156-159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869>
- Wilkinson CJ, Shearer BL, Jackson TJ and Hardy GESJ. 2001. Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant Pathology* 50 (1): 83-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00539.x>
- Zentmyer GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No 10. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 96 p.

## CAPÍTULO II

### **Caracterización de *Phytophthora mendei* causando pudrición de raíz de aguacate (*Persea americana*) en Michoacán, México.**

### **Characterization of *Phytophthora mendei* causing root rot of avocado (*Persea americana*) in Michoacán, Mexico.**

**Alejandra Mondragón-Flores**<sup>1,2</sup>, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. UMSNH, Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5 Tarímbaro Michoacán. CP 58880. <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de Apatzingán-INIFAP. Carretera Apatzingán-Cuatro caminos km 17.5, Antúnez, Michoacán. CP. 60780; **Marlene Díaz-Celaya**<sup>1</sup>, **Gerardo Rodríguez- Alvarado**<sup>1</sup>, **Patricia Manosalva**<sup>3</sup>, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of California, Riverside, CA. CP 92521, **Salvador Ochoa- Ascencio**<sup>4</sup>, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas no. 2290 Jardines del Cupatitzio Uruapan, Michoacán. CP 60170 **Sylvia P. Fernández-Pavía**<sup>1\*</sup>

\*Corresponding author: patricia.pavia@umich.mx

#### **RESUMEN**

México es el primer productor de aguacate en el mundo y una de las principales limitantes de la producción es la pudrición de raíz causada por *Phytophthora*. Varias especies de este oomicete han sido reportadas asociadas a la enfermedad, sin embargo, *Phytophthora cinnamomi* es la más frecuente. En el estado de Michoacán se recuperaron aislados de raíz de aguacate con pudrición, que presentaron características morfológicas similares entre ellos, pero diferentes a *P. cinnamomi*, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológica y molecularmente a estos aislados. La patogenicidad de los aislados fue demostrada por inoculación de plantas jóvenes y de frutos de aguacate. Se realizó identificación molecular por amplificación por PCR de las regiones ITS (ITS1-5.8-ITS2 de ADN ribosomal) y COI (citocromo oxidasa I). Los aislados desarrollaron colonias circulares, con micelio blanco, cenocítico, aracnoide, sin hinchamientos, de textura algodonosa, superficie plana y densidad escasa, además fueron homotáticos, con oosporas pleróticas y apleróticas, anteridios paráginos y esporangios semipapilados ovoides. Se determinó la sensibilidad de los aislados a fosfito de potasio (FP) y metalaxil-M (MTX) obteniendo valores de CE<sub>50</sub> de 3.67 y 0.737 µg mL<sup>-1</sup> de i.a., para FP y MTX respectivamente. Las secuencias de las regiones amplificadas, presentaron para ITS 100 % de cobertura e identidad y para COI 100 % de identidad y 97 % de cobertura contra *Phytophthora mendei*. De acuerdo

con las características morfológicas y moleculares, hasta donde sabemos, este es el primer reporte de *P. menzei* ocasionando pudrición de raíz de aguacate en Michoacán, México.

## **ABSTRACT**

Mexico is the first avocado producer in the world and one of the main production constraints is root rot caused by *Phytophthora*. Several species of this oomycete have been reported associated with the disease, however, *Phytophthora cinnamomi* is the most frequent. In the state of Michoacán, rotting avocado root isolates were recovered, which presented similar morphological characteristics among them, but different from *P. cinnamomi*, so the objective of this work was to characterize these isolates morphologically and molecularly. The pathogenicity of the isolates was demonstrated by inoculation of young plants and avocado fruits. Molecular identification was performed by PCR amplification of the ITS (ITS1-5.8-ITS2 of ribosomal DNA) and COI (cytochrome oxidase I) regions. The isolates developed circular colonies, with white, coenocytic, arachnoid mycelium, without swelling, cottony texture, flat surface and low density, they were also homothallic, with plerotic and aplerotic oospores, paragynous antheridia and ovoid semi-papillary sporangia. The sensitivity of the isolates to potassium phosphite (FP) and metalaxyl-M (MTX) was determined, obtaining EC<sub>50</sub> values of 3.67 and 0.737 µg mL<sup>-1</sup> a.i., for FP and MTX, respectively. The sequences of the amplified regions presented 100% coverage and identity for ITS and 100% identity and 97% coverage for COI against *Phytophthora menzei*. According to the morphological and molecular characteristics, to our knowledge, this is the first report of *P. menzei* causing avocado root rot in Michoacán, Mexico.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate es un cultivo tropical; restos de semillas encontrados en el Valle de Tehuacán en el estado de Puebla, sugieren que es nativo de México y Centroamérica y posiblemente domesticado por grupos mesoamericanos al menos desde el año 5000 A. C. (Galindo-Tovar et al., 2007). Este fruto es aceptado mundialmente y tiene una amplia comercialización debido a su alto contenido nutricional, es fuente de nutrientes liposolubles y proteínas, que brindan beneficios importantes para la salud (Araújo et al., 2018). Para el 2020, la producción de aguacate en México alcanzó 2.4 millones de toneladas de las cuales más del 75 % se originaron en el estado de Michoacán (SIAP, 2021). Una de las principales limitantes de la producción del cultivo es la pudrición de raíz ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* (Coffey, 1992; Ramírez-Gil et al., 2014). Esta enfermedad, mata las raíces alimentadoras, lo que ocasiona clorosis, defoliación y muerte descendente; en ocasiones se observan canchales en la base del tronco del árbol (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005). El canchale del aguacate, se caracteriza por lesiones oscuras e irregulares, rajaduras en la corteza y exudados blancos azucarados, por lo regular aparecen en la base del tallo, pero pueden extenderse a las ramas bajas (Ceja-Torres et al., 2000). En California, mediante patrones proteínicos y características morfológicas identificaron a *Phytophthora citricola* como el agente causal del canchale del aguacate, asimismo determinaron que tiene una virulencia limitada en raíces, pero en los tallos es más agresivo comparado con *P. cinnamomi*, además puede infectar frutos y causar pudrición (Zentmyer et al., 1974; Coffey et al., 1988). *P. citricola* fue descrita en 1927 aislada de cítricos en Taiwan por Sawada causando la pudrición parda de raíz y canchale de la corona. Estudios posteriores con isoenzimas de múltiples locus, polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés) y sensibilidad a mefenoxam demuestran variación fenotípica y genotípica, considerando a *P. citricola* un complejo de especies, concluyendo que son potencialmente patógenos y parcialmente tolerantes a mefenoxam y que la variación podría estar asociada con el hospedante y factores geográficos (Oudemans et al., 1994; Bhat y Browne, 2007). Oudemans et al. (1994) identificaron en 125 aislados de *P. citricola* provenientes de varios hospedantes, cinco grupos electroforéticos (CIT1-CIT5). Los aislados de aguacate originarios de California, México y Guatemala constituyen un solo grupo (CIT5); los patrones enzimáticos de los aislados de México y California fueron idénticos en tanto que los de Guatemala variaron en dos loci. En el 2009,

mediante análisis comparativos de huellas genéticas, secuencias de ADN de la región ITS y exámenes morfológicos, este subgrupo (CIT5) se separa formalmente de *P. citricola*, constituyendo un nuevo taxón denominado *Phytophthora menzei* sp. nov (Hong et al., 2009). Al mismo tiempo, Jung y Burgess (2009); Scott et al. (2009) separan dos taxones más, uno con aislados de *P. citricola* recuperados de especies leñosas de Norte América y Europa, denominado *Phytophthora plurivora* sp. nov y el otro con aislados de especies de Eucalipto en Australia, denominado *Phytophthora multivora* sp. nov y que correspondían a los grupos CIT1 y CIT3 de Oudemans et al. (1994) respectivamente. Más tarde, aislados de *P. citricola*, de plantas autóctonas de Sudáfrica del género *Agathosma*, conformarían la especie *Phytophthora capensis* sp. nov, que correspondía al grupo CIT4 (Bezuidenhout et al., 2010). Gracias a la disponibilidad de un mayor número de herramientas moleculares, se han podido diferenciar especies genéticamente cercanas y muy similares morfológicamente, sin embargo, se necesita más investigación de cómo han surgido diferentes linajes, se especula que la evolución de varios clados está asociada con la especialización en el hospedante (Cooke et al., 2000; Jung y Burgess, 2009). *P. menzei*, se encuentra en troncos, frutos y raíces, distribuido en el estado de California en E.E.U.U (Zentmyer et al., 1974; Coffey et al., 1988; Hong et al., 2009; Abad et al., 2019). En Michoacán, además de *P. cinnamomi* se han reportado otros oomicetos como *Phytophthora vexans*, *Pythium* sp. *amazonianum*, *Phytophthora parasitica* y *P. heveae* asociados a pudrición de raíz y de fruto y a cancro del tallo del aguacate (Ceja-Torres et al., 2000; Ochoa-Ascencio et al., 2011; Ochoa-Fuentes et al., 2018; Hernández-Pérez et al., 2019; Mondragón-Flores et al., 2022). En un muestreo de raíces de aguacate con pudrición, procedentes de huertos comerciales del municipio de Zitácuaro, Michoacán, se detectaron aislados con características morfológicas que no correspondían a los oomicetos que se han reportado para Michoacán, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológica y molecularmente estos aislados, para determinar su identidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta y aislamiento.** En noviembre del 2019 en el municipio de Zitácuaro Michoacán, se hizo una colecta de raíces y suelo de la rizósfera de árboles de aguacate con síntomas de pudrición de raíz de cinco huertas. Para obtener los aislados se utilizó el protocolo descrito por Mondragón-Flores et al., (2022) brevemente, raíces laterales se lavaron con agua corriente y se secaron. Cortes de tejido se colocaron en *cassettes* de inclusión, posteriormente se sumergieron en cloro comercial al 2 % (v/v) durante 45 s y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Se les retiró el exceso de agua al tejido y se colocaron en cajas Petri con medio selectivo NARPH-V8.

**Caracterización morfológica.** Para la caracterización morfológica, se utilizó el aislado denominado ZITR-4-3, el cual se creció en los medios HMA, cV8-A al 10% (10 g de CaCO<sub>3</sub>, 1 L de jugo V8 Campbell's, centrifugado a 4,000 rpm por 20 min) y papa dextrosa agar PDA (Bioxon®) y se observaron las características de la colonia y micelio. Para observar mejor las estructuras reproductivas de acuerdo a Fernández-Pavía et al. (2020), hojas de pasto silvestre se esterilizaron (20 min a 15 lb de presión), después se colocaron pequeños trozos de hojas en cajas Petri y cuadros de agar con micelio del aislado de cuatro días de edad, desarrollado en medio sin centrifugar agar V8 (scV8-A) (820 mL de agua destilada, 180 mL de jugo V8 Campbell's, 1 g CaCO<sub>3</sub>) se inundaron con solución Zentmyer (Chen y Zentmyer, 1970) (se disolvieron en un litro de agua destilada: 1.64 g de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.05 g de KNO<sub>3</sub> y 0.48 g de MgSO<sub>4</sub>, la solución se esterilizó 20 min a 15 lb de presión) y 10 días después se hicieron preparaciones con pequeños cortes de tejido y de agar y se observaron al microscopio. Para determinar el tamaño de los esporangios y oogonios, cuadros de agar del aislado de cuatro días de edad desarrollado en sc-V8A, se inundaron con solución Zentmyer y se expusieron a luz blanca durante tres días, se midieron 30 esporangios y 30 oogonios, en un microscopio Leica DME, con el objetivo de 40x.

**Sensibilidad a fungicidas.** La sensibilidad del aislado ZITR-4-3 a los fungicidas fosfito de potasio (FP) (Nutriphite plus magnum 40 % Gowan®) y metalaxil-M (MTX) (RidomilGold® 480SL) se determinó con el método usado por (Mondragón-Flores et al., 2022). Para FP se evaluaron concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 y 600 µg

mL<sup>1</sup> de i.a y para MTX 0, 0.05, 0.15, 0.5, 1, 3 y 5 µg mL<sup>1</sup> de i.a. La concentración efectiva (valor de CE<sub>50</sub>) se determinó con el método de dilución en agar de Gray et al. (2018). Discos de micelio de aislados de cuatro días se colocaron en el centro de las cajas Petri que contenían las diferentes concentraciones de los fungicidas. El crecimiento de las colonias se midió tres días después de la inoculación. El crecimiento se calculó de acuerdo a Hu et al. (2010) y se expresó como porcentaje. Para obtener el valor de la CE<sub>50</sub> se incluyó el logaritmo natural de cada una de las concentraciones examinadas; se realizó el análisis probit asociado con el 50% de su inhibición (Adaskaveg et al., 2015). El experimento se realizó por duplicado.

**Pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate.** Para obtener el inóculo para las pruebas en plantas y frutos, el aislado se creció en medio scV8-A al 10 %, en condiciones de oscuridad a 25 °C, durante cinco días. El medio con micelio se cortó en cuadros de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, se inundaron con solución de Zentmyer y se expusieron a la luz. A las 48 h los cuadros de agar se frotaron con un hisopo estéril para desprender los esporangios; la suspensión se colocó en un recipiente y la concentración de esporangios se determinó en una cámara de Neubauer (Fernández-Pavía et al., 2020). Se utilizaron plantas jóvenes de aguacate de la variedad ‘Hass’ con 12 a 14 hojas verdaderas obtenidas de un vivero comercial en Uruapan, Mich. Se retiró el suelo de las raíces de ocho plantas con agua corriente. Las raíces de cinco plantas se sumergieron en 4 L de una suspensión a una concentración total de 660,000 esporangios durante tres horas; para el testigo las raíces de tres plantas se sumergieron en dH<sub>2</sub>O. Posteriormente se colocaron en macetas y se mantuvieron en condiciones de invernadero con riego diario. Después de 20 días, las plantas se retiraron de las macetas, las raíces se enjuagaron con agua corriente y se tomaron muestras de raíz de cada planta para ser sembradas en medio selectivo NARPH-V8.

**Pruebas en frutos de aguacate.** Se usaron ocho frutos de aguacate ‘Hass’ con madurez fisiológica; cinco frutos se inocularon en el área del pedúnculo después de retirarlo, se colocó una gota de 60 µL de una suspensión de esporangios a una concentración de 2000 mL<sup>-1</sup>, y tres frutos con una gota dH<sub>2</sub>O. En recipientes de plástico, se colocó algodón que se cubrió con sanitas®, se humedecieron con dH<sub>2</sub>O, los frutos se colocaron en el interior sobre una base de plástico para evitar el contacto con el papel; los recipientes se taparon y se expusieron

a 25 °C por cinco días. Las lesiones se midieron en dos ejes opuestos distintos. Finalmente se realizó una siembra de tejido epidérmico y de la pulpa de los frutos en medio cV8-A.

**Caracterización molecular.** El aislado ZITR-4-3 se desarrolló en medio de ejote (papilla de ejote y calabacita: Gerber Nestlé®, 339 g, agar 15 g y agua 646 mL) por cinco días. El micelio se colectó y se deshidrató a 39 °C durante 24 h, después se almacenó a -20 °C por 24 h, posteriormente se molió y se extrajo el ADN genómico siguiendo un protocolo de extracción con base en CTAB (Fernández-Pavía et al., 2020). El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Varioskan Flash Thermo Scientific NanoDrop 2000®) y se diluyó para obtener una concentración de 12 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . La región del espaciador interno transcrito (ITS1-5.8-ITS2 de ADN ribosomal) se amplificó por PCR utilizando los cebadores ITS6/ITS4. Además, el gen mitocondrial que codifica para la proteína citocromo oxidasa I (COI). Las reacciones contenían 6.25  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 0.0675  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos ITS6/ITS4 (ITS6 5'–GAAGAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') (Cooke et al., 2000) e (ITS4 5' –TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (White, 1990) y los de COI (COIF-1 5'-TCAWCWMGATGGTTTTTCAAC-3' y COIR-1 5'-RRHWACKTGA CT DATRATACCAA-3') (Abad et al., 2019) (100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (30 ng) y agua destilada ultrapura hasta tener un volumen final de 13  $\mu\text{L}$ . Las reacciones de amplificación se hicieron en un Eppendorf Mastercycler 96-Well Gradient (Eppendorf, Hauppauge, NY, EE. UU.) en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial durante 2 min a 94 °C, 35 ciclos cada uno de los cuales comprenden, desnaturalización durante 1 min a 94 °C, alineación durante 1 min a 53 °C, extensión durante 1 min a 72 °C y una extensión final durante 10 min a 72 °C. Para el caso de las reacciones con COI, la temperatura para la desnaturalización y la alineación fue de 95 °C y 55° C respectivamente. Los amplicones resultantes (5  $\mu\text{l}$ ) se colocaron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, que fue sometido a electroforesis a 50 V durante 100 min; y un transiluminador UV para visualizarlo. El tamaño de los amplicones se estimó en comparación con un marcador de ADN de 1 kb (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Las bandas de interés fueron cortadas y purificadas empleando un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Los productos de la PCR se enviaron para secuenciación a la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y las secuencias fueron editadas usando los

programas PreGap y Gap (<http://staden.sourceforge.net>). Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con el programa Blast de NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] para comparar con otras secuencias de Oomicetos de esta base de datos.

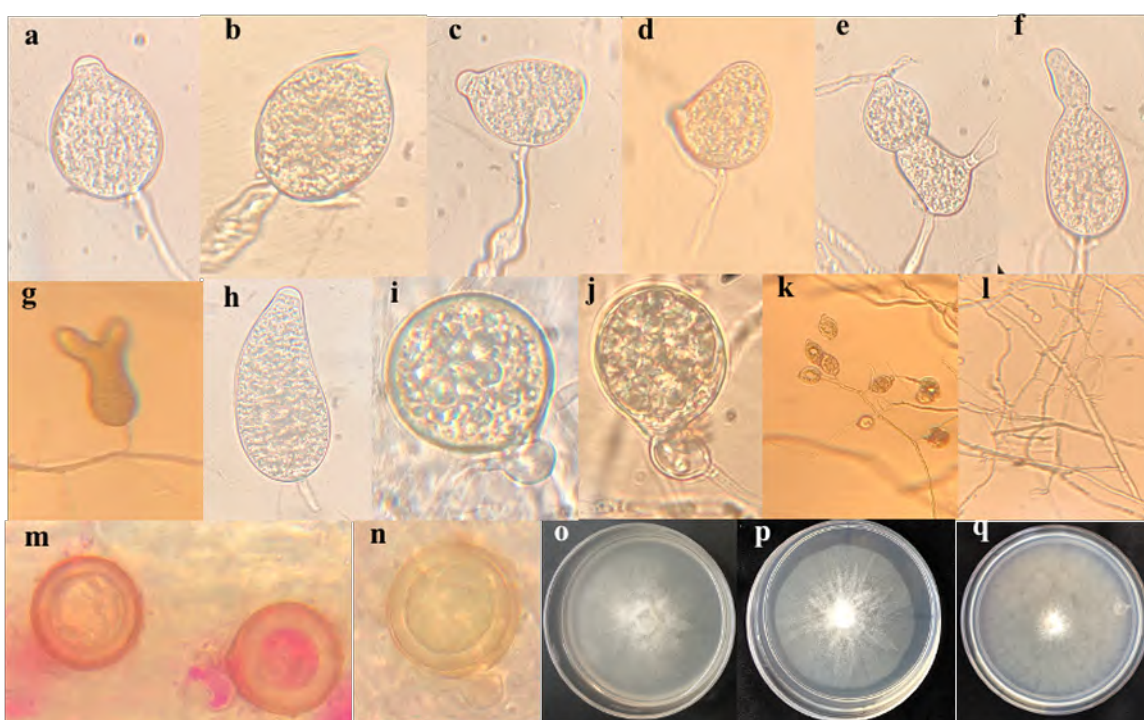
**Análisis filogenético.** Para determinar si el aislado identificado mediante búsqueda Blast se caracterizó correctamente, se hizo un análisis filogenético donde se incluyeron secuencias de especies *Phytophthora* del clado II obtenidas de Hong et al. (2009); Abad et al. (2019), como grupo externo se utilizó a *P. alni* ubicada en el clado VII. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta y después seleccionando la topología con valor de verosimilitud superior (Nei y Kumar, 2000). Este análisis involucró 15 secuencias de nucleótidos. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X, se hizo un análisis filogenético molecular de máxima verosimilitud, con 1000 de valor bootstrap y un modelo de evolución molecular GTR+G+I (Kumar et al., 2018).

## RESULTADOS

**Colecta y aislamiento.** Se obtuvieron cuatro aislados de muestras procesadas, de una huerta pequeña (1 ha) de temporal, sombreada, con árboles de 30 años de edad, con manejo convencional, suelo tipo arcilloso (acrisol), con síntomas de marchitez ubicada en la localidad de Carpinteros a 19° 49' 05'' N y 100° 31' 58'' W, a una altura de 2176 msnm en el municipio de Zitácuaro, Michoacán.

**Caracterización morfológica y molecular.** Las colonias en los diferentes medios, fueron circulares, con micelio blanco, cenocítico, aracnoide, sin hinchamientos, con crecimiento sumergido de textura algodonosa, superficie plana y densidad escasa. En PDA la colonia presentó forma rosácea, en cV8, estrellada y en HMA estrellada menos definida. En solución de Zentmyer, se observó producción abundante de esporangios en simpodios simples, semipapilados, algunos con dos papilas, principalmente ovoides a obpyriforme, algunos de formas irregulares, con el pedicelo insertado asimétricamente, persistentes, con medidas en promedio 50 x 32.6 µm, rango (62.5- 45 x 37.5-25 µm). En los cortes de tejido se observaron oosporas lisas, redondas pleróticas y appleróticas, con anteridio, parágino cilíndrico y

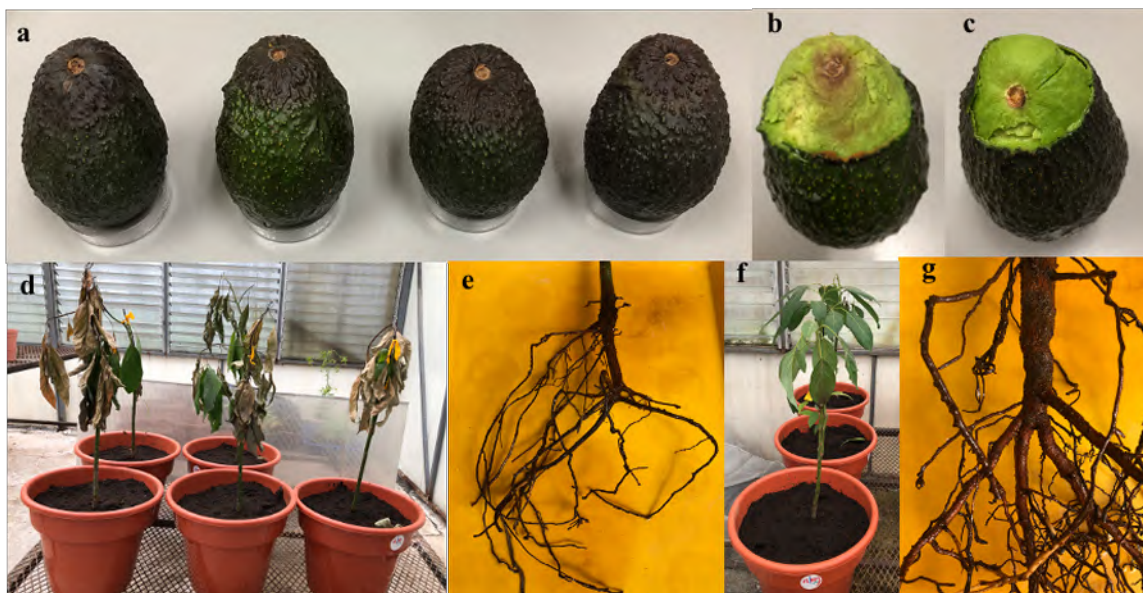
lobulado; escasas clamidosporas globosas. Oogonios redondos, lisos con dimensiones en promedio de 26.5 x 26.2  $\mu\text{m}$  y un rango de (30.22.5 x 30-22.5  $\mu\text{m}$ ) (Figura 1), características que corresponden a *P. mendei* de acuerdo a (Hong et la., 2009; Abad et al., 2019). La amplificación de ADN de las regiones ITS y COI, dio como resultado fragmentos de 750 pb para ambas regiones génicas. Los resultados obtenidos del GenBank, mediante la búsqueda Blast de las secuencias amplificadas, mostró para ITS 100 % de cobertura e identidad y para COI 100 % de identidad y 97 % de cobertura contra, secuencias comprobadas para genes de código de barras ITS rDNA y COI del ex-tipo *Phytophthora mendei*, aislado CPHSTBL 3, agrupado en el clado 2 (Abad et al., 2019).



**Figura 1. Características morfológicas de *Phytophthora mendei*.** a-b) esporangios ovoides semipapilados; c-d) esporangios bipapilados; e-h) esporangios de formas irregulares; i-j) oogonios lisos y anteridios capitado; s-k) esporangios en simpodios simples; l) micelio aracnoide; m-n) oosporas pletóricas y apertóricas con anteridio parágino; colonias en medio de cultivo o) HMA; p) cV8-A; q) PDA.

**Pruebas de patogenicidad en frutos y plantas de aguacate.** Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas, los frutos de aguacate inoculados mostraron síntomas de pudrición a las 48 h postinoculación (hpi); a las 120 hpi se observaron lesiones marrones, irregulares de 5.5

cm de diámetro en promedio (Figura 2), en todos los casos, el patógeno re aislado de la pulpa y de la epidermis de los frutos correspondió al organismo inoculado. En los frutos testigo no se observaron síntomas. En las plantas, seis días postinoculación (dpi) se observó clorosis, defoliación y muerte descendente y 20 dpi habían perdido casi la totalidad de las hojas. Las raíces presentaron necrosis, desprendimiento de corteza y ausencia de raíces alimentadoras. En las plantas testigo no se observaron síntomas. El patógeno que se inoculó fue el mismo que se re aisló de las raíces de las plantas inoculadas. El porcentaje de aislamiento a partir de frutos fue del 100 % y el de plantas del 10%.



**Figura 2. Pruebas de patogenicidad de *P. menzei* en frutos y plantas de aguacate.** a) lesiones en frutos inoculados; b) apariencia de la lesión en la pulpa de frutos inoculados 96 hpi; c) fruto testigo; d) plantas con defoliación y muerte descendente 20 ddi; e) raíz necrosada y sin raíces alimentadoras de una planta inoculada; f-g) plantas testigo con raíces sin síntomas.

**Sensibilidad a fungicidas.** Los análisis de varianza entre las diferentes concentraciones para crecimiento e inhibición de micelio, de FP y MTX resultaron significativos ( $P > 0.001$ ). Para

FP, la media de crecimiento fue de 5 mm y para inhibición de 76.96 %, en la comparación de medias se formaron seis grupos, donde las concentraciones de 100, 300 y 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., inhibieron el crecimiento en 100 % y se comportaron como estadísticamente iguales, por otro lado para MTX, el valor medio de crecimiento fue de 11.57 mm y para inhibición de 41.64 %, los datos formaron cuatro grupos en la comparación de medias, donde las dos concentraciones más bajas y más altas fueron iguales estadísticamente, a 3 y 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. se inhibió más del 70 % el crecimiento micelial (Cuadro 1). Los valores de  $\text{CE}_{50}$  fueron de 3.67 y 0.737  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., para FP y MTX respectivamente.

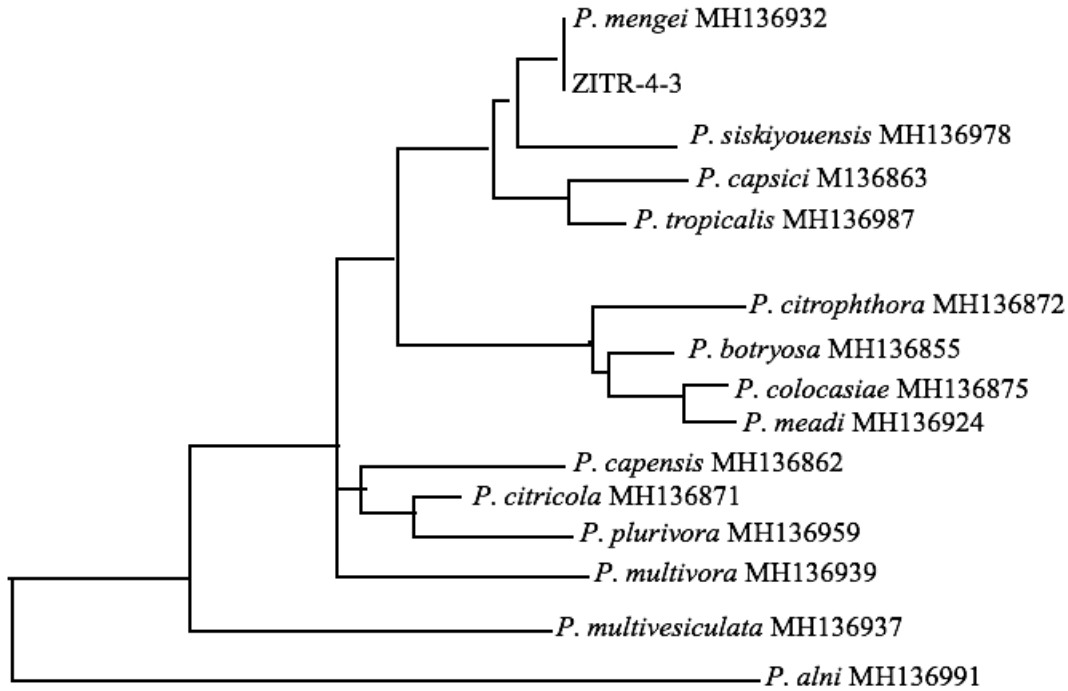
**Cuadro 1.** Crecimiento e inhibición de *P. menzei* a diferentes concentraciones de fosfito de potasio (FP) y metalaxil-M(MTX).

Fosfito de Potasio					Metalaxil-M				
Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)		Inhibición (%)		Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)		Inhibición (%)	
0	21.7	a*	0	a	0	19.8	A	0	a
5	8.5	b	61.0	b	0.05	19.5	Ab	1.7	a
10	5.7	b	73.9	c	0.15	17.3	B	12.5	b
25	3.2	d	85.4	d	0.5	7.8	C	60.4	d
50	1.0	e	95.4	e	1	6.3	Cd	68.1	dc
100	0	f	100	f	3	5.16	D	73.9	c
300	0	f	100	f	5	5.0	D	74.9	c
600	0	f	100	f					

\*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

**Análisis filogenético.** En el análisis filogenético, el árbol concatenado de las secuencias de ITS y COI mostró que el aislado analizado (ZITR-4-3), se agrupó con *P. menzei*, con un valor bootstrap de 100 y es cercano filogenéticamente con *P. siskiyouensis*, *P. capsici* y *P. tropicalis*; por el contrario, los aislados que conformaron el complejo *P. citricola*, (*P.*

*citricola*, *P. plurivora*, *P. multivora* y *P. capensis*) se ubicaron más distantes que el aislado del presente estudio, con valores bootstrap de 76 y 83 (Figura 3).



**Figura 3.** Árbol filogenético concatenado Neighbor-Join y BioNJ basado en secuencias de ITS y COI de *Phytophthora menzei* y de especies que conforman el clado II a excepción del grupo externo *P. alni*.

## DISCUSIÓN

El cancro de tronco en aguacate es causado principalmente por *P. citricola* (sinónimo *P. menzei* basado en C1T5 *sensu* Oudemans et al., 1994) y *P. cinnamomi* (Zentmyer et al., 1974; Coffey et al., 1988; Ceja-Torres et al., 2000). *Phytophthora citricola* aislado de aguacate en América, fue redescrito posteriormente como *P. menzei* y está distribuido en E.E.U.U. principalmente en California y en México (Hong et al., 2009; Bezuidenhout et al., 2010; Dann et al., 2013; Abad et al., 2019). En la base de datos de *Phytophthora* (Abad et al., 2019) únicamente se reconoce la presencia de *P. menzei* en California, EEUU, porque la distribución la reportan en base a secuencias de NCBI y no existe una secuencia de *P. menzei* en esta base de datos. En México mediante caracterización morfológica se reportó a *P. citricola* causando pudrición en frutos y raíces de aguacate en el Estado de México

(Fucikovsky y Luna, 1987). Este aislado de México fue analizado por Oudemans et al. 1994 como parte del complejo de *P. citricola*, posteriormente fue retomado en un estudio realizado por Bezuidenhout et al. (2010) quienes lo reportan en un listado de aislados de referencia como *P. mengei* mediante identificación molecular. Por lo anteriormente descrito no existe un reporte que describa la presencia de *P. mengei* en México que incluya la parte morfológica y molecular, por lo que este es el primer reporte que considera estos dos aspectos de esta especie para este aislado obtenido en Michoacán, México, lo cual es de gran relevancia ya que es el principal productor de aguacate en el mundo. *P. mengei* se obtuvo en una colecta de muestras que se llevó a cabo en huertos en Michoacán en un estudio de pudrición de raíz, a diferencia de *P. cinnamomi*, presenta micelio aracnoide, característica que se consideró al seleccionar los aislados ya que era indicativo de que había más de una especie asociada a la enfermedad (Erwin y Riberio, 1996; Hong et al., 2009). Es probable que estuviera en raíces adventicias donde puede sobrevivir, aunque estas no sean un campo de infección o en raíces alimentadoras donde completa su ciclo de vida (Coffey et al., 1988; El-Hamalawi y Menge, 1994; Oudemans et al., 1994). *P. mengei* es homotálico, produce oosporas pleróticas y appleróticas con anteridios paráginos y esporangios semipapilados persistentes, se diferencia de las otras especies que atacan aguacate porque produce esporangios grandes de formas irregulares y oogonios más pequeños con anteridios capitados asimétricos, así como oosporas con oogonios appleróticos con pico (Hong et al., 2009; Bezuidenhout et al., 2010; Abad et al., 2019). Las características morfológicas observadas en los esporangios y oosporas así como la presencia de esporangios de formas irregulares en los aislados recuperados en la presente investigación, concuerdan con las anteriormente descritas. El tamaño de los esporangios (50 x 32.6  $\mu\text{m}$ ), difirió con lo reportado por Hong et al. (2009), quienes observaron dimensiones en promedio de 62.7 x 35.2  $\mu\text{m}$ , esto podría deberse a las diferencias en las condiciones de crecimiento. Las análisis moleculares confirmaron la identidad del aislado ZITR-4-3 como *P. mengei*, ubicado en el clado II, los análisis filogenéticos indican su cercanía con las especies, *P. siskiyouensis*, *P. capsici* y *P. tropicalis*, resultados que concuerdan por los obtenidos por Hong et al. (2009), quienes mencionan similitudes entre *P. siskiyouensis* y *P. mengei* como esporangios semipapilados, ovoides, elipsoides y los anteridios cilíndricos en forma de cabeza. Anteriormente, Oudemans et al. (1994) habían determinado la estrecha relación de aislados del complejo *P. citricola* con *P. capsici*, lo que posteriormente fue

confirmado por Hong et al. (2009), quienes indican las diferencias que existen entre estas especies ya que *P. menzei* tiene esporangios semipapilados y es homotálico, mientras que *P. capsici* y *P. tropicalis* producen esporangios papilados y son heterotálicos. Las otras especies que conforman el complejo de *P. citricola*, como son *P. capensis*, *P. citricola*, *P. multivora* y *P. plurivora*, se encuentran más distantes filogenéticamente, conformando otro grupo, estos resultados concuerdan con otros estudios donde *P. menzei* no se agrupa con el resto de las especies del complejo (Jung y Burgess et al., 2009; Bezuidenhout et al., 2010). Por lo anterior, Bezuidenhout et al. (2010) consideran que en base a las características morfológicas distintivas de *P. menzei*, y a la distancia filogenética con especies del complejo *P. citricola* y su cercanía con *P. capsici*, no debe considerarse parte de este complejo, pero esto requeriría de estudios que incluyeran más poblaciones de las especies que conforman el complejo *P. citricola* (Oudemans et al., 1994; Jung y Burgess 2009; Bezuidenhout et al., 2010) obtenidas de aguacate. En las pruebas de sensibilidad a fungicidas, se observaron valores de  $CE_{50}$ , de 3.67 y 0.737  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. FP y MTX respectivamente, de acuerdo con Mondragón-Flores et al. (2022) *P. cinnamomi* presenta valores promedio de  $CE_{50}$  de 24.62 y 0.215  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. para FP y MTX respectivamente, por lo que *P. menzei* es más sensible a FP que a MTX y más tolerante a metalaxil-M (mefenoxam) que *P. cinnamomi*. Coffey et al. (1984), reportan que *P. citricola* aislado de aguacate, es más tolerante a mefenoxam que *P. cinnamomi*. Por otra parte, Marin et al. (2021) han reportado en algunas especies de *Phytophthora* el desarrollo de resistencia a metalaxil-M por aplicaciones constantes, sin embargo, otros estudios sugieren que la tolerancia a este fungicida que presentan las poblaciones de *P. citricola*, podría ser una característica asociada con la especie y no a la presión de selección por la exposición al fungicida, debido a que las fuentes de donde provenían varios aislados, no tenían antecedentes de contacto con el fungicida (Bhat y Browne, 2007). El fosfito de potasio se ha utilizado con mayor frecuencia para el control de la pudrición de raíz que el metalaxil-M, debido a que es eficaz y de menor costo que otros (Adaskaveg et al., 2015; Belisle et al., 2019), posiblemente las aplicaciones frecuentes controlan las poblaciones de *P. menzei* debido a su sensibilidad al fungicida y esta podría ser una de las razones por la que no se había detectado su presencia en Michoacán. Aunque puede deberse también a un mal diagnóstico debido a la dificultad para aislar *Phytophthora* (Erwin y Riberio, 1996) como lo demuestra el bajo porcentaje de aislamiento en el presente estudio a partir de raíces infectadas

en árboles inoculados. En las pruebas de patogenicidad, *P. menzei* causó pudrición en frutos y en plantas de aguacate, desarrolló síntomas como defoliación, muerte descendente y pudrición de raíz, sin embargo, en el re aislamiento, mientras que de los tejidos del fruto se recuperó el aislado en un 100%, de las plantas solamente se recuperó en el 10%, lo anterior probablemente se debe a que consideran a *P. citricola* (*P. menzei*) aislado de aguacate como un patógeno débil en raíces, pero que causa pudrición en frutos y es más agresivo en tallos causando canchros comparado con *P. cinnamomi* (Zentmyer et al., 1973). Sin embargo, los árboles del huerto presentaban síntomas de pudrición de raíz y no se aisló a *P. cinnamomi*, por lo que es muy probable que *P. menzei* estuviera ocasionando la enfermedad. Los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad son árboles que se encuentran en huertos excesivamente sombreados, con suelos arcillosos, con árboles de más de 10 años de edad y estresados, donde con frecuencia se ha aislado a *P. citricola* de raíces, en California (Coffey et al., 1988; El-Hamalawi y Menge, 1994; Ceja-Torres et al., 2000), estas condiciones coinciden con las que prevalecían en la huerta muestreada. En México se han reportado diferentes especies de *Phytophthora* asociadas a pudrición de raíz, fruto y canchro en aguacate en diversas localidades (Ceja-Torres et al., 2000; Ochoa-Ascencio et al., 2011), aunado a lo anterior, enfermedades se están detectando en nuevas áreas, ejemplos de esto es la presencia de *Phytophthora* en los municipios de Atécuaro (Sylvia Fernández-Pavía, comunicación personal) y Zitácuaro (Mondragón-Flores et al., 2022), debido a que en los últimos años el cultivo del aguacate se ha extendido a regiones que favorecen la presencia de estas enfermedades o bien no son adecuadas para el desarrollo del cultivo, generando estrés en las plantas, favoreciendo la presencia de especies de *Phytophthora* entre las que se encuentra *P. menzei*. Para realizar un diagnóstico correcto es importante considerar que la diferencia entre el canchro que ocasiona *P. cinnamomi* se restringe a la base del tronco mientras que el que causa *P. menzei*, invade las raíces estructurales, el tronco y las ramas de la parte baja del árbol pudiéndose encontrar hasta una altura de tres metros y también infecta frutos (Anónimo, 2013). También se ha reportado a *P. multivora*, otra especie del complejo *P. citricola* causando pudrición de raíz en aguacate en Islas Canarias (Rodríguez-Padrón et al., 2018), por lo que no se descarta la presencia de otras especies del complejo atacando el cultivo de aguacate en México. Además, es probable que *P. menzei* se este dispersando en material vegetal y haya sido introducido a California en plantas de aguacate provenientes de

México o Guatemala (Oudemans et al., 1994). Es necesario realizar un muestreo más extensivo debido a la relevancia del cultivo del aguacate en México, ya que es importante determinar cuáles son las especies presentes, los síntomas y las condiciones que favorecen el desarrollo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* entre las que se encuentra *P. menzei*, para poder establecer estrategias de manejo más adecuadas.

**Conclusiones.** *Phytophthora menzei* es capaz de causar pudrición de raíz y de fruto, a la expansión acelerada del cultivo del aguacate a regiones no adecuadas para su desarrollo esta especie podría convertirse junto con *P. cinnamomi*, en un problema sanitario que pudiera afectar la producción, rentabilidad y sustentabilidad del cultivo.

#### LITERATURA CITADA

- Abad ZG, Burgess T, Bienapfl JC, Redford AJ, Coffey M and Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for Phytophthora Science and Management, and World Phytophthora Collection
- Adaskaveg JE, Hao W and Forster H. 2015. Postharvest strategies for managing *Phytophthora* brown rot of citrus using potassium phosphite in combination with heat treatments. *Plant Disease* 99 (11): 1477-1482. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0040-RE>
- Anónimo. 2013. Trunk canker. *Plant Health Australia*. <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/01/Trunk-canker-FS.pdf>
- Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Ruíz HA, Pintado MM and Aguilar C. 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology* 80: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHTO-09-17-0326-R>
- Bezuidenhout CM, Denman S, Kirk SA, Botha WJ Mostert L and McLeod A. 2010. *Phytophthora* taxa associated with cultivated *Agathosma*, with emphasis on the *P. citricola* complex and *P. capensis* sp. nov. *Persoonia* 25 (1): 32-49. <https://doi.org/10.3767/003158510X538371>
- Bhat RG and Browne GT. 2007. Genetic diversity in populations of *Phytophthora citricola* associated with horticultural crops in California. *Plant Disease* 91 (12):1556-1563

- Ceja-Torres LF, Téliz-Ortiz D, Osada-Kawasoe S y Morales-García JL. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. en cuatro municipios del Estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18 (2): 79-86
- Chen D and Zentmyer GA. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62 (2): 397-402. <https://doi.org/10.2307/3757597>
- Coffey MD. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. Pages 423-444. In: Plant diseases of international importance. Volumen III. Diseases of fruit crops. Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadhyay AN. (eds.) Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. 456 pp.
- Coffey MD, Oudemans P and Ouimette D. 1988. *Phytophthora citricola*: another cause of avocado decline. *California Avocado Society 1988 Yearbook* 72: 127-13
- Coffey MD, Klure LJ and Bower LA. 1984. Variability in sensitivity to metalaxil of isolates of *P. cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology* 74: 417-422
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G and Brasier CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30 (1):17-32
- Dann EK, Ploetz RC, Coates LM and Pegg, KG. 2013. Pages 380-422. Chapter 13 Foliar, Fruit and Soilborne Diseases. In: The avocado: botany, production and uses. Bruce Schaffer, B Nigel Wosltenholme and Anthony W Whiley (eds.) CABI International. 380pp.
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 562 pp.
- Fernández-Pavía S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Abad GZ, Félix-Gastélum R, Ochoa-Ascencio S, Garay-Serrano E, Mondragón-Flores A, Soto-Plancarte A, Grünwald NJ y Santillán-Mendoza R. 2020. Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84pp.
- Fucikovsky L and Luna I. 1987. Avocado fruit diseases and their control in Mexico. *Proceedings of the First World Avocado Congress. South African Avocado Growers' Association Yearbook* 1987. 10:119-121
- Galindo-Tovar M, Arzate-Fernández A, Ogata-Aguilar N and Landero-Torres I. 2007. The Avocado (*Persea americana*, Lauraceae) Crop in Mesoamerica: 10,000 Years of History. *Harvard Papers in Botany*. 12. 325-334. [10.3100/1043-4534\(2007\)12\[325:TAPALC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2007)12[325:TAPALC]2.0.CO;2)

- Gray MA, Hao W, Forster H and Adaskaveg JE. 2018. Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from citrus in California. *Plant Disease* 102 (4): 734-742 <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1155-RE>
- EI-Hamalawi ZA. and Menge JA. 1994. Avocado trunk canker disease caused by *Phytophthora citricola*: Investigation of factors affecting infection and disease development. *Plant Disease* 78 (3): 260-264
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6 (6): 589-604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hernández-Pérez A, Cerna-Chávez E, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM and Ochoa-Fuentes YM. 2019. First report of *Phytophthora vexans* causing the “avocado sadness” in Michoacan, Mexico. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 88 (1): 11-13. DOI:10.32604/phyton.2019.04608
- Hong CX, Gallegly ME, Browne GT, Bhat RG, Richardson PA, Kong P. 2009. The avocado subgroup of *Phytophthora citricola* constitutes a distinct species, *Phytophthora menzei* sp. nov. *Mycologia*. 101: (6) 833-40. doi: 10.3852/08-214. PMID: 19927748
- Hu J, Hong C, Stromberg E and Moorman G. 2010. Mefenoxam sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* isolates. *Plant Disease* 94 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0039>
- Jung T and Burgess TI .2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*. 22 (1): 95–110. <https://doi.org/10.3767/003158509X442612>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Marin MV, Seijo TE, Zuchelli E and Peres NA. 2021. Resistance to mefenoxam of *Phytophthora cactorum* and *P. nicotianae* causing crown and leather rot in Florida strawberry. *Plant Disease*. 105 (11): <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2474-RE>
- Mondragón-Flores A, Manosalva P, Ochoa-Ascencio S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G and Fernández- Pavía SP. 2022. Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitacuaro, Michoacan. *Mexican Journal of Phytopathology* 40 (1): 1-23 DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>
- Nei M and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333 pp.

- Ochoa-Fuentes YM, Hernández-Pérez A, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapiá-Vargas LM, Hernández-Bautista O and Cerna-Chávez E. 2018. First report of avocado tree wilt by *Pythium sp. amazonianum* in Mexico. *Ciencia e Investigación Agraria* 45 (3): 301-305. <https://dx.doi.org/10.7764/rcia.v45i3.1905>
- Ochoa-Ascencio S, Santacruz-Ulibarri H and Salazar-García S. 2011. *Phytophthora heveae* causing basal rot of avocado fruit in Mexico. Proceedings VII World Avocado Congress, Australia. Cairns, Australia
- Oudemans P, Forster H and Coffey MD. 1994. Evidence for distinct isozymes sub-groups within *Phytophthora citricola* and close relationships with *P. capsici* and *P. citrophthora*. *Mycological Research* 98 (2): 189-199. DOI:10.1016/S0953-7562(09)80185-8
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales- Osorio JG. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres* 61 (1): 50- 61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (1): 89-106. DOI:10.14601/Phytopathol\_Mediterr-2202
- Sawada K. 1927. Descriptive catalogue of Formosan fungi. Rept. Gov. Inst. Formosa, 27:22-24
- Scott PM, Burgess TI, Barber PA, Shearer BL, Stukely MJC, Hardy GESTJ and Jung T. 2009. *Phytophthora multivora* sp. nov., a new species recovered from declining *Eucalyptus*, *Banksia*, *Agonis* and other plant species in Western Australia. *Persoonia* 22 (1): 1–13. doi: 10.3767/003158509X415450
- SIAP (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2021. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego
- Zentmyer GA, Jefferson L and Hickman CJ. 1973. Another species of *Phytophthora* on avocado in California. *California Avocado Soc. Yearb.* 56: 125-129
- Zentmyer GA, Jefferson L, Hickman CJ and Chang-Ho Y. 1974. Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea americana*. *Mycologia* 66 (5): 830-845. <https://doi.org/10.2307/3758203>

## Capítulo III

### **Caracterización de poblaciones de *Phytophthora cinnamomi* aisladas de raíz de aguacate con pudrición en México y comparación con aislados de Estados Unidos**

### **Characterization of populations of *Phytophthora cinnamomi* isolated from rotting avocado root in Mexico and comparison with isolates from the United States**

#### **RESUMEN**

La pudrición de raíz es una de las principales enfermedades del cultivo del aguacate, afecta el 5 % de la superficie cultivada en México y es ocasionada por *Phytophthora cinnamomi*. Es una especie heterotálica, con los dos tipos de compatibilidad A1 y A2, este último globalmente distribuido. En California encontraron dos clados genéticamente distintos de aislados de tipo de apareamiento A2 (A2 clado I y clado II), los pertenecientes al clado II, se caracterizaron por ser más virulentos y menos sensibles a fosfito de potasio (Fp), este linaje clonal podría haber sido introducido en el sur de California proveniente de México, por lo que se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar métodos de aislamiento de *P. cinnamomi* de raíces de aguacate con pudrición y caracterizar poblaciones actuales colectadas en Michoacán, México y compararlas con aislados de California, Estados Unidos. Para la recuperación de los aislados se evaluaron dos técnicas de aislamiento, una a partir de suelo usando tejidos trampa y la otra a partir de tejido radicular con pudrición. En los aislados obtenidos se determinó el tipo de compatibilidad. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* a Fp y a Mtx de 50 aislados seleccionados de *P. cinnamomi*, así como la virulencia en hojas de *Nicotiana benthamiana*. A partir de estos 50 aislados se seleccionó un subgrupo de 10 que representaban la variación fenotípica de la población de México (MEX), con los cuales se realizaron pruebas de virulencia en aguacate. Estos 10 aislados se compararon con 10 seleccionados de EUA, con base a su sensibilidad a Fp y velocidad de crecimiento. El mejor método de aislamiento fue a partir de raíces infectadas, seguido del de hojas de aguacate como tejido trampa, con un porcentaje de recuperación de aislados de 72 y 64 % respectivamente. No se encontraron aislados resistentes a los fungicidas, se observó variación en virulencia, los aislados TGR-3-5, UPNS-4-1 y TANR-3-5, ZITR-3-3 fueron los más y

menos virulentos respectivamente, tanto en *N. benthamiana* como en aguacate. Los aislados de ambos países presentaron tipo de compatibilidad A2. Los aislados de EUA y MEX fueron estadísticamente iguales con respecto  $CE_{50}$  para Fp, sin embargo, en la tasa de crecimiento si se observaron diferencias significativas. Aunque se encontraron similitudes entre los aislados de *P. cinnamomi* de EUA y MEX con respecto a sensibilidad a Fp y a tipo de compatibilidad es necesario realizar otros estudios y analizar un mayor número de aislados para determinar si pudieron haber sido introducidos desde México hacia Estados Unidos de América.

## ABSTRACT

Root rot is one of the main diseases of avocado cultivation, it affects 5% of the cultivated area in Mexico and is caused by *Phytophthora cinnamomi*. It is a heterothallic species, with the two compatibility types A1 and A2, the latter globally distributed. In California they found two genetically distinct clades of A2 mating type isolates (A2 clade I and clade II), those belonging to clade II, were characterized by being more virulent and less sensitive to potassium phosphite (Fp), this clonal lineage could having been introduced in southern California from Mexico, so the present study was proposed with the objective of evaluating methods of isolating *P. cinnamomi* from avocado roots with rot and characterizing current populations collected in Michoacán, Mexico and comparing them with isolates from California, United States. For the recovery of the isolates, two isolation techniques were evaluated, one from soil using trap tissues and the other from rotting root tissue. In the isolates obtained, the type of compatibility was determined. The *in vitro* sensitivity to Fp and Mtx of 50 selected isolates of *P. cinnamomi* was evaluated, as well as their virulence in *Nicotiana benthamiana* leaves. From these 50 isolates, a subgroup of 10 was selected that represented the phenotypic variation of the population of Mexico (MEX), with which virulence tests were carried out in avocado. These 10 isolates were compared with 10 selected in the USA based on their sensitivity to Fp and growth rate. The best isolation method was from infected roots, followed by avocado leaves as trap tissue, with a recovery percentage of isolates of 72 and 64 %, respectively. No isolates resistant to fungicides were found, variation in virulence was observed, isolates TGR-3-5, UPNS-4-1 and TANR-3-5, ZITR-3-3 were the most and least virulent respectively, both in *N. benthamiana* as in avocado. The isolates from

USA and MEX were statistically equal with respect to EC50 for Fp, however, in the growth rate significant differences were observed. Although similarities were found between the isolates of *P. cinnamomi* from the USA and MEX with respect to sensitivity to Fp and compatibility type, it is necessary to carry out other studies and analyze a larger number of isolates to determine if they could have been introduced from Mexico to the United States of America.

## INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de aguacate, seguido de República Dominicana, Colombia, Perú e Indonesia, en el mercado predomina la variedad ‘Hass’ (FAOSTAT, 2020). Para el 2020, México contribuyó con 2,393,848 t, de las cuales el estado de Michoacán aportó más del 75% de la producción nacional (SIAP, 2020). *P. cinnamomi* causa pudrición de raíz, una de las principales enfermedades del cultivo, que afecta el 5 % de la superficie cultivada en México (Téliz, 2000; Rodríguez-Padrón et al., 2018). Uno de los problemas más frecuentes a los que se enfrentan los investigadores que trabajan con pudrición de raíz, es la dificultad para aislar a *P. cinnamomi* ya que en medio de cultivo, tiene un crecimiento radial relativamente lento comparado con organismos saprófitos como bacterias y hongos, por lo que se dificulta aislarlo de tejidos infectados (Erwin and Ribeiro 1996). Uno de los errores que se cometen al intentar aislar a *P. cinnamomi*, es la selección del tejido, por lo regular se seleccionan raíces finas y alimentadoras que son las que el patógeno ataca en primera instancia según Hardham (2005), lo que trae como consecuencia un bajo porcentaje de aislamiento y la presencia de especies de *Fusarium* y *Pythium* (Toapanta-Gallegos et al., 2010; Olalde-Lira et al., 2020) que tienen una velocidad de crecimiento mayor que *Phytophthora*. El amplio rango de distribución de *P. cinnamomi* se ve favorecido por su capacidad de sobrevivir durante años en el suelo o en plantas sin síntomas y el nivel de susceptibilidad de las plantas, por lo que el manejo de las enfermedades que causa es todo un reto (Hardham y Blackman, 2018). Los fungicidas más utilizados para el control de *P. cinnamomi* son metalaxil (Mtx) y fosfito de potasio (Fp) (Ramírez-Gil, et al., 2017). El Fp es considerado de bajo riesgo en el desarrollo de resistencia y fue reclasificado en el 2018 de modo de acción desconocido (U33) a inductor de las defensas del hospedante (P07) (FRAC, 2020). Algunos estudios reportan que con bajas concentraciones de Fp el crecimiento de *P.*

*cinnamomi* no se ve afectado, pero en altas concentraciones este interfiere con la síntesis de la pared celular e indirectamente activa los mecanismos de defensa de las plantas (King *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 2019). Se ha reportado variación en la sensibilidad entre aislados de *P. cinnamomi*, con valores de  $CE_{50}$  que oscilan entre 4 a  $148 \mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., clasificándolos en tres grupos, sensibles, intermedios y tolerantes (Wilkinson *et al.*, 2001; Belisle *et al.*, 2019b). Para *P. cinnamomi* solo existe un reporte de desarrollo de resistencia a fenilamidas de Darvas y Becker (1984), quienes sugieren que después de constantes aplicaciones de Mtx a los suelos, es difícil controlar la pudrición de la raíz de plantas de aguacate jóvenes. Por el contrario, otros estudios reportan la sensibilidad a Mtx de aislados de *P. cinnamomi* provenientes de plantas ornamentales y aguacate donde obtuvieron valores de concentración efectiva al 50 % ( $CE_{50}$ ) entre 0.01 y  $0.34 \mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. (Hu *et al.*, 2010; Mondragón-Flores *et al.*, 2022).

*P. cinnamomi* es una especie heterotálica, sin especialización de hospedante, con los dos tipos de compatibilidad A1 y A2, este último globalmente distribuido (Old *et al.*, 1984; Robin y Desprez-Loustau, 1998), en México se desconoce que tipo de compatibilidad se presenta. Estudios en varios países indican que las poblaciones de *P. cinnamomi* son estables a través del tiempo, sin un patrón específico de distribución, existiendo tres linajes clonales uno correspondiente a los aislados de tipo de apareamiento A1 y dos linajes clonales diferentes para los aislados de tipo de apareamiento A2 (A2 tipo 1 y A2 tipo 2), además presentan baja variabilidad genética y no se reproduce de forma sexual en el campo, aun cuando los dos tipos de compatibilidad estén presentes (Old *et al.*, 1984; Linde *et al.*, 1997; Dobroolski *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos estudios indican que *P. cinnamomi* presenta variación en el fenotipo y en el nivel de virulencia, debido probablemente a factores climáticos y a la recombinación mitótica que es muy frecuente en los linajes clonales (Dobroolski *et al.*, 2003; Hüberli *et al.*, 2001; Eggers *et al.*, 2012; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2015; Garbelotto *et al.*, 2015). Pagliaccia *et al.*, (2013) llevaron a cabo el primer estudio para evaluar la diversidad genética de los aislados de *P. cinnamomi* de aguacate en California y encontraron dos clados genéticamente distintos de aislados de tipo de apareamiento A2 (A2 clado I y clado II). Posteriormente Belisle *et al.*, (2019b) caracterizaron estos aislados fenotípicamente y los resultados indicaron que presentan variación en cuanto a virulencia y sensibilidad a fungicidas. Los aislados colectados en el sur de California ubicados en el clado II de A2,

fueron menos sensibles a fosfito de potasio y más virulentos en portainjertos clonales de aguacate, que los que pertenecen al grupo clado I de A2 colectados en el norte de California. Actualmente el movimiento de materias primas en el mundo debido a la globalización se ha incrementado de manera sustancial, *P. cinnamomi* es un patógeno ampliamente distribuido, es muy probable que el hombre haya intervenido en su movimiento tanto en cortas como a grandes distancias. Con respecto a México un estudio de diversidad genotípica utilizando AFLPs, detectó variabilidad, los aislados se separaron en dos clados correlacionados con su origen geográfico, y posteriormente detectaron diferencias en virulencia (Ochoa-Fuentes et al., 2015). Sin embargo, aun faltan algunas zonas productoras de aguacate de ser analizadas, así como comparar poblaciones actuales de este oomiceto con las que se encuentran presentes en California. Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar métodos de aislamiento de *P. cinnamomi* de raíces de aguacate con pudrición y caracterizar poblaciones actuales colectadas en Michoacán, México (MEX) y compararlas con aislados de California, Estados Unidos (EUA).

## **HIPÓTESIS**

El porcentaje de aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* varía con diferentes métodos.

Las poblaciones de *Phytophthora cinnamomi* asociadas a pudrición de aguacate de Michoacán, México presentan variabilidad fenotípica en lo que respecta a virulencia y a sensibilidad a fungicidas.

Los aislados de *P. cinnamomi* de Michoacán, México son similares a los California, EUA, con respecto a tipo de compatibilidad, sensibilidad a fosfito de potasio y tasa de crecimiento.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar métodos de aislamiento de *P. cinnamomi* de raíces de aguacate con pudrición y caracterizar poblaciones actuales colectadas en Michoacán, México y compararlas con aislados de California, Estados Unidos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar protocolos de aislamiento y esporulación de *P. cinnamomi*.
- 2.- Determinar el tipo de compatibilidad de los aislados colectados en Michoacán.
- 3.- Evaluar la sensibilidad *in vitro* a metalaxil-M y fosfito de potasio de aislados *P. cinnamomi* obtenidos de raíz de aguacate con pudrición.
- 4.- Determinar la virulencia de aislados de *P. cinnamomi*, en hojas de *Nicotiana benthamiana*.
- 5.- Evaluar la virulencia de los aislados que sean representativos de la variación fenotípica de *P. cinnamomi*, en frutos de aguacate.
- 6.- Comparar fenotípicamente las poblaciones de *P. cinnamomi* provenientes de California y de México con base al tipo de compatibilidad, tasa de crecimiento y sensibilidad a fosfito de potasio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de muestras.** De mayo a diciembre del 2019 en el estado de Michoacán, en los municipios productores de aguacate; Ario de Rosales, Nuevo San Juan Parangaricutiro, Peribán de Ramos, Salvador Escalante, Tingundín, Tancítaro, Uruapan, Ziracuaretiro, y Zitácuaro, se realizó una colecta de raíces y suelo de la rizósfera, de árboles con síntomas de amarillamiento, defoliación y muerte descendente. En cada municipio se muestrearon cinco huertas y de cada huerta se seleccionaron cinco árboles, se tomó una muestra por árbol. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y en una hielera se transportaron al laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Se recopiló información de las huertas como tipo de suelo, edad de los árboles, variedad, clima y manejo. Además, se colectaron suelo y raíces en algunos viveros, dado que son fuente de inóculo y movimiento a larga distancia de *P. cinnamomi*.

**Técnicas de aislamiento.** Los aislados se obtuvieron mediante dos métodos, por medio de tejidos trampa a partir de suelo y de raíces de aguacate infectadas. Se utilizaron como tejidos trampa: hojas de azalea, de aguacate (jóvenes) y de pino, y manzanas ‘Granny’. Para evaluar la eficacia de diferentes métodos, se procesaron 25 muestras de suelo de árboles enfermos

con cada tipo de tejido y de raíz y 10 con acículas de pino. Los tejidos trampa se lavaron con agua corriente, desinfectaron con alcohol al 70%, y se colocaron en recipientes con 300 g de suelo y agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O) en una proporción de 1:2 por 48 h. Las manzanas fueron perforadas y se introdujeron 2 g de suelo en los orificios, se colocaron en cámara húmeda durante 48 h. Para la obtención de aislados a partir de raíces, se modificaron los protocolos de Erwin y Ribeiro (1996) y Rodríguez-Padrón et al. (2018). Se seleccionaron raíces laterales parcialmente necrosadas, se lavaron con agua corriente y se secaron con toallas de papel estériles. Cortes de tejido de aproximadamente 1 cm, con una parte sana y una necrosada se colocaron en *cassettes* de inclusión, los cuales se sumergieron en cloro comercial al 2 % (v/v) durante 45 s y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. El exceso de agua se retiró de los cortes de tejido con toallas de papel estériles y se colocaron en cajas Petri con medio selectivo NARPH-V8. Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad de 24 a 48 h, hasta que se observó el crecimiento de micelio característico de *P. cinnamomi*. Las colonias se purificaron por cultivo sucesivo de punta de hifa en medio de cultivo harina de maíz agar (HMA, Fluka®).

**Caracterización molecular.** Los aislados ZITR-3-3, PRS-1-1, TANR-3-5 y ZITR-5-5, presentaban algunas características atípicas de *P. cinnamomi*, por lo que se caracterizaron molecularmente para corroborar su identidad. Para la extracción de ADN, se usó el protocolo descrito previamente Mondragón-Flores et al. (2022). La caracterización molecular se hizo por amplificación por PCR de las regiones ITS (ITS1-5.8-ITS2 de ADN ribosomal), utilizando los cebadores reverse ITS6 y forward ITS4. Los productos de la PCR se enviaron a la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para secuenciación. Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con el programa Blast de NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)].

**Tipo de compatibilidad.** Se determinó la compatibilidad de los aislados utilizando cepas de referencia A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate) que fueron donados por la Universidad de California de Riverside al Laboratorio de Patología Vegetal (IIAF). En una caja Petri con medio V8 agar sin centrifugar (scV8 agar) (820 mL de agua destilada, 180 mL de jugo V8 Campbell's, 3 g CaCO<sub>3</sub>), se colocó un disco de micelio de un aislado con tipo de compatibilidad A1 y en otra caja el tipo A2. Asimismo, en cada una de las cajas se colocó un

disco de micelio del aislado de interés aproximadamente a un centímetro de distancia. Las cajas se incubaron a 25 °C en obscuridad durante 10 días. A los aislados que formaron oosporas se les asignó el tipo de compatibilidad complementario en la cruce (Fernández-Pavía et al., 2020).

Para las pruebas de sensibilidad a fungicidas y virulencia se seleccionaron 50 aislados, cinco aislados de huertas de cada uno de los nueve municipios y cinco más obtenidos de viveros, pertenecientes a la colección del laboratorio de Patología vegetal del IIAF (Cuadro 1). De los cuales se obtuvieron cultivos monospóricos mediante el procedimiento que se describe a continuación.

**Obtención de cultivos monospóricos.** Para obtener cultivos monospóricos, se promovió la producción de esporangios con el protocolo de Hwang *et al.* (1975) modificado; tres discos de micelio de 5 mm de cada aislado se cultivaron por triplicado en cajas Petri 60 x15 mm con 10 mL de medio scV8-A, sobre papel celofán transparente y expuestos a luz por 24 h. El papel celofán con el micelio se transfirió a una caja Petri, se le agregaron 10 mL de medio líquido sin centrifugar (scV8) (820 mL de agua destilada, 180 mL de jugo V8 Campbell's, 1 g CaCO<sub>3</sub>), se incubaron durante 24 h a 18 °C en oscuridad, se decantó el medio líquido, se enjuagaron tres veces y se inundaron con una solución de sales de acuerdo con el protocolo de Chen y Zentmyer, (1970) (se disolvieron en un litro de agua destilada: 1.64 g de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.05 g de KNO<sub>3</sub> y 0.48 g de MgSO<sub>4</sub>, la solución se esterilizó 20 min a 15 lb de presión); a continuación se expusieron a luz blanca a 25 °C, cada 24 h se enjuagaron tres veces con la solución Zentmyer, por dos días consecutivos. Para la liberación de zoosporas, los aislados se enjuagaron dos veces y se inundaron una vez más con agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O) a 4 °C hasta que se liberaron. Se tomaron 200 µL de la suspensión de zoosporas y se colocaron en una caja con medio agar agua, a las 24 h, se seleccionó una hifa de una zoospora germinada con ayuda del microscopio estereoscópico, se cortó con un bisturí y se transfirió a medio HMA.

**Cuadro 1.** Ubicación, edad, tipo de manejo y características agroclimáticas de las huertas de colecta de los 50 aislados seleccionados de *P. cinnamomi* de Michoacán.

Aislado	Municipio de origen	Fuente	Edad de la huerta	Manejo	Régimen de humedad	Tipo de suelo	Tipo de Clima
ARR-1-4	Ario de Rosales	Tejido	25	Convencional	Riego	Vertisol	(A)C (w1)(w)
ARR-2-2	Ario de Rosales	Tejido	20	Convencional	Riego	Vertisol	(A)C (w1)(w)
ARR-3-4	Ario de Rosales	Tejido	30	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (w1)(w)
ARR-4-1	Ario de Rosales	Tejido	30	Convencional	Riego	Vertisol	(A)C (w1)(w)
ARR-5-4	Ario de Rosales	Tejido	25	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (w1)(w)
PRS-1-1	Peribán	Rizósfera	20	Convencional	Riego	Vertisol	Aw1(w)
PRS-2-10	Peribán	Rizósfera	13	Convencional	Riego	Vertisol	Aw1(w)
PRS-3-13	Peribán	Rizósfera	13	Orgánica	Riego	Vertisol	Aw1(w)
PRS-4-18	Peribán	Rizósfera	15	Orgánica	Riego	Vertisol	Aw1(w)
PRS-5-23	Peribán	Rizósfera	7	Convencional	Riego	Vertisol	Aw1(w)
SER-1-4	Salvador Escalante	Tejido	35	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (m)(w)
SER-2-3	Salvador Escalante	Tejido	12	Convencional	Temporal	Andosol	(A)C (m)(w)
SER-3-6	Salvador Escalante	Tejido	15	Convencional	Temporal	Vertisol	(A)C (m)(w)
SER-4-5	Salvador Escalante	Tejido	30	Convencional	Riego	Vertisol	(A)C (m)(w)
SER-5-6	Salvador Escalante	Tejido	30	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (m)(w)
SJNR-2-3	San Juan Nuevo	Tejido	30	Convencional	Temporal	Andosol	C(m)(w)
SJNR-3-3	San Juan Nuevo	Tejido	35	Convencional	Temporal	Andosol	C(m)(w)
SJNR-3-4	San Juan Nuevo	Tejido	8	Convencional	Temporal	Andosol	C(m)(w)
SJNR-4-12	San Juan Nuevo	Tejido	12	Convencional	Temporal	Andosol	C(m)(w)
SJNR-5-4	San Juan Nuevo	Tejido	35	Convencional	Temporal	Andosol	C(m)(w)
SJNS-6-22	San Juan Nuevo	Rizósfera	1	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
TANR-1-5	Tancítaro	Tejido	30	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (m)(w)
TANR-2-7	Tancítaro	Tejido	15	Convencional	Riego	Vertisol	(A)C (m)(w)
TANR-3-5	Tancítaro	Tejido	25	Orgánica	Riego	Andosol	(A)C (m)(w)
TANR-4-4	Tancítaro	Tejido	30	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (m)(w)
TANS-5-22	Tancítaro	Rizósfera	15	Convencional	Riego	Andosol	(A)C (m)(w)
TGR-1-5	Tinguindín	Tejido	45	Convencional	Temporal	Andosol	Aw1(w)
TGR-2-3	Tinguindín	Tejido	40	Convencional	Temporal	Andosol	Aw1(w)
TGR-3-5	Tinguindín	Tejido	25	Convencional	Temporal	Andosol	Aw1(w)
TGR-4-3	Tinguindín	Tejido	30	Convencional	Temporal	Andosol	Aw1(w)
TGR-4-6	Tinguindín	Tejido	30	Convencional	Temporal	Andosol	Aw1(w)
UPNR-1-1	Uruapan	Tejido	42	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
UPNS-2-5	Uruapan	Rizósfera	35	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
UPNS-3-4	Uruapan	Tejido	30	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
UPNR-4-4	Uruapan	Tejido	40	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
UPNS-4-1	Uruapan	Rizósfera	40	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
CAV-7	Uruapan (vivero)	Rizósfera	1	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
CAV-12	Uruapan (vivero)	Rizósfera	1	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
CAV-11	Uruapan (vivero)	Rizósfera	1	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)

CAV-15	Uruapan (vivero)	Rizósfera	1	Convencional	Riego	Andosol	C(m)(w)
ZCA-1-4	Ziracuaretiro	Tejido	50	Convencional	Temporal	Andosol	(A)C (w2)(w)
ZCA-2-2	Ziracuaretiro	Tejido	43	Convencional	Temporal	Andosol	(A)C (w2)(w)
ZCA-3-2	Ziracuaretiro	Tejido	25	Convencional	Temporal	Andosol	(A)C (w2)(w)
ZCA-4-3	Ziracuaretiro	Tejido	30	Convencional	Temporal	Andosol	(A)C (w2)(w)
ZCA-5-3	Ziracuaretiro	Tejido	14	Convencional	Temporal	Andosol	(A)C (w2)(w)
ZITR-1-1	Zitácuaro	Tejido	40	Convencional	Temporal	Acrisol	(A)C (w1)(w)
ZITR-2-5	Zitácuaro	Tejido	35	Convencional	Temporal	Acrisol	(A)C (w1)(w)
ZITR-3-3	Zitácuaro	Tejido	30	Convencional	Riego	Acrisol	(A)C (w1)(w)
ZITR-3-4	Zitácuaro	Tejido	30	Convencional	Temporal	Acrisol	(A)C (w1)(w)
ZITR-5-5	Zitácuaro	Tejido	12	Convencional	Riego	Acrisol	(A)C (w1)(w)

**Sensibilidad a fungicidas.** La sensibilidad a fosfito de potasio (Fp) (Nutriphite plus magnum, Nitrógeno (N) 2%, Fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 40 %, Potasio (K<sub>2</sub>O) 16%, Gowan®) se evaluó con concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 y 600 µg mL<sup>-1</sup> y con metalaxil-M (Mtx) (Ridomil Gold® 480SL, Metil N-(metotoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-D-alaninato, 45.28 %) 0, 0.05, 0.15, 0.5, 1, 3 y 5 µg mL<sup>-1</sup> de i.a. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, con tres réplicas. La concentración efectiva a la cual se inhibió el 50 % del crecimiento micelial (valor de CE<sub>50</sub>) se calculó utilizando el método tradicional de dilución en agar (Gray et al., 2018). El fungicida se agregó en medio centrifugado V8 agar (cV8-A) al 10 % (10 g de CaCO<sub>3</sub>, 1 L de jugo V8, centrifugado a 4,000 rpm por 20 min) para obtener las concentraciones finales y posteriormente se esterilizó. Discos de 6 mm de micelio de los aislados de cuatro días de edad cultivados en HMA, se colocaron en el centro de las cajas Petri que contenían las diferentes concentraciones. Después de tres días de incubación en oscuridad a 22 °C, se midió el crecimiento de la colonia en dos direcciones perpendiculares, se restó la medida del disco de inóculo y se obtuvo el promedio. El crecimiento se calculó dividiendo el diámetro de la colonia en las cajas Petri con fungicida, entre el promedio de crecimiento de las cajas testigo y se expresó como porcentaje (Hu et al., 2010). El mismo procedimiento se utilizó para evaluar la sensibilidad a Fp de 10 aislados de *P. cinnamomi*, representativos de la variación fenotípica de la población, colectados en California.

**Pruebas de virulencia en hojas de *Nicotiana benthamiana*.** La variabilidad en virulencia de los aislados de *P. cinnamomi*, se determinó mediante el método de inoculación de hojas separadas utilizando la planta modelo *Nicotiana benthamiana*, que es útil cuando se evalúan un gran número de aislados, de acuerdo a Belisle et al. (2019b), la semilla fue donada por el Dr. Julio Vega Arreguín de la ENES-UNAM-León. Para el desarrollo de las plantas, semillas de *N. benthamiana* se sumergieron Atsagib® al 10 % (ácido giberélico al 90%), durante 24 h, posteriormente se pusieron en sustrato estéril, Sunshine® y perlita en una proporción de 2:1. Una vez que las semillas germinaron y que las plantas presentaban cinco hojas verdaderas, se trasplantaron a macetas con el mismo sustrato adicionado con 2 g de fertilizante basacote plus® por litro de sustrato. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero y riego diario, cuando tenían aproximadamente cinco semanas de edad se seleccionaron hojas que fueran similares en tamaño. En la superficie abaxial de las hojas se colocó una alícuota de 20 µL de una suspensión de zoosporas a una concentración de 1000 mL<sup>-1</sup> (Belisle et al., 2019b). Las hojas inoculadas se colocaron en cajas Petri con medio agar agua al 1.5% y se incubaron en condiciones de laboratorio a 25 °C, tres días después se tomaron fotos a las lesiones de cada hoja y se midieron usando el programa *image j*. Se seleccionaron 10 aislados de los 50 inoculados, con base a la variación fenotípica para utilizarlos posteriormente en pruebas de virulencia en frutos de aguacate.

**Evaluación de virulencia en frutos de aguacate.** Para las pruebas en frutos de aguacate, se inocularon los 10 aislados que representaban la variación fenotípica de la población de *P. cinnamomi* en Michoacán. Para obtener el inóculo se estimuló la esporulación de los aislados con el protocolo modificado de Hwang et al. (1975) anteriormente descrito. Frutos de aguacate de la variedad ‘Hass’ con madurez fisiológica, se lavaron con jabón y agua corriente y desinfectaron con etanol al 70 %, se hizo una herida con una aguja de disección en un costado del fruto. Tres frutos por aislado se inocularon con una alícuota de 40 µL de una suspensión de zoosporas a una concentración de 2000 por mL, se incubaron en cámara húmeda a 25 °C por cuatro días. Posteriormente se tomaron fotos de las lesiones y se midieron con el programa *image J*.

**Comparación de aislados de *P. cinnamomi* de México y Estados Unidos.** Para determinar si existían diferencias entre los aislados de ambos países, se seleccionó un subgrupo de 10 aislados de MEX y 10 de EUA, que representaban la variación fenotípica. Se compararon con base a la sensibilidad a fosfito de potasio y a la tasa de crecimiento a 22 °C, bajo las condiciones del laboratorio de Patología Vegetal del IIAF, utilizando los protocolos anteriormente descritos.

**Análisis estadísticos.** Para determinar la variación en la virulencia con los datos obtenidos de las mediciones de lesiones en frutos y hojas de *N. benthamiana* se hizo un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias (Tukey, 0.05). La comparación de las poblaciones de *P. cinnamomi* se determinó mediante una prueba de t para muestras independientes. Para obtener los valores de la CE<sub>50</sub> se estimó el porcentaje promedio de inhibición de las dos repeticiones para cada concentración de los fungicidas en función del porcentaje observado en el grupo testigo, utilizando la siguiente fórmula  $ICR(\%) = (CRT - CRF) / CRT \times 100$ , donde ICR es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, CRT es el crecimiento radial del testigo y CRF es el crecimiento radial en cada una de las concentraciones. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces. Los valores de concentración efectiva del 50% (CE<sub>50</sub>), se determinaron ajustando las líneas de regresión del logaritmo natural de las concentraciones de fosfito contra el porcentaje de inhibición transformado logit en comparación con el control para cada aislado (Adaskaveg et al., 2015).

## RESULTADOS

**Colecta de muestras.** De las huertas muestreadas en los nueve municipios se obtuvieron un total de 170 aislados y uno de un vivero establecido en el municipio de Nuevo San Juan Parangaricutiro, todos los aislados presentaron características morfológicas de *P. cinnamomi*. En total se muestrearon 47 huertas ubicadas a una altura entre 1500 y 2000 msnm, con árboles entre 15 a 45 años de edad, de las cuales 44 son de manejo convencional y 3 orgánicas, 23 con riego y 24 de temporal. De los 171 aislados, 142 se obtuvieron a partir de raíces infectadas y 29 por medio de tejidos trampa. De acuerdo a la clasificación climática de Köppen-Geiger, 13 huertas cuentan con un clima tipo (A)C (m)(w), 12 en C(m)(w), 15 en

(A)C (w<sub>1</sub>)(w) y 8 huertas en Aw<sub>1</sub>(w). Las características de las huertas de las que se obtuvieron los 50 aislados seleccionados están enlistadas en el Cuadro 1.

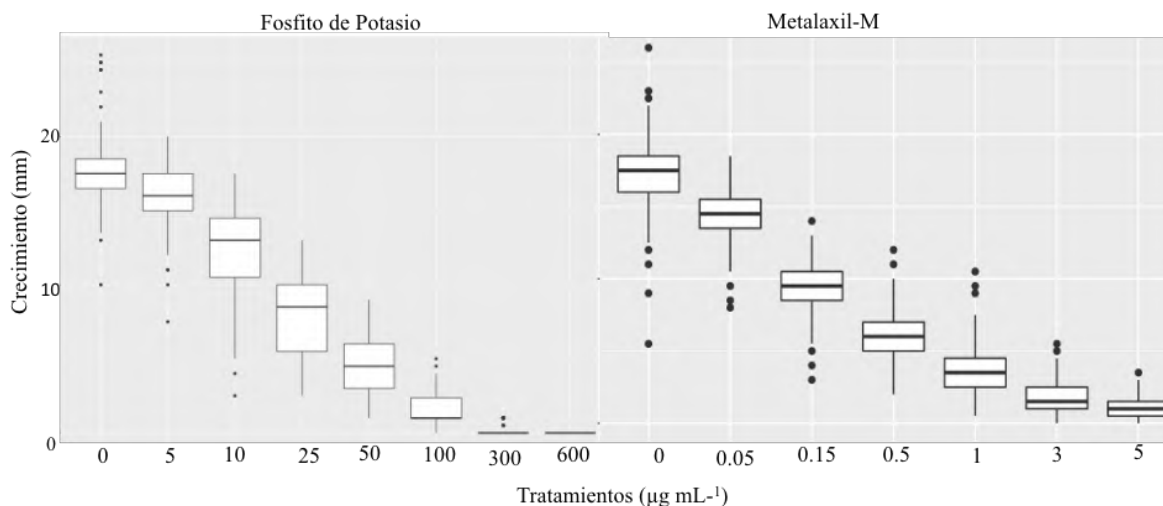
**Aislamiento.** De cada uno de los métodos utilizados para la recuperación de aislados de *P. cinnamomi*, se obtuvieron diferentes porcentajes de aislamiento con los tejidos trampa y del tejido radicular. Con las acículas de pino el porcentaje fue de 10 % (1:10), con hojas de azalea de 24 % (6:25), y con manzanas Granny de 8 % (2:25), hojas jóvenes de aguacate 16:25 (64 %) y de raíces infectadas de 72 % (18:25), los dos últimos métodos fueron los más efectivos, por lo que se utilizaron para el resto de las muestras.

**Caracterización molecular.** La identidad de los aislados ZITR-3-3, PRS-1-1, TANR-3-5 y ZITR-5-5, se confirmó mediante un análisis Blast. Las secuencias obtenidas de la región del espaciador interno transcrito (ITS1-5.8-ITS2 de ADN ribosomal) coincidieron con las reportadas para *Phytophthora cinnamomi*.

**Tipo de compatibilidad.** Todos los aislados recuperados en Michoacán, presentaron tipo de compatibilidad A2, ya que como resultado de las cruzas con el aislado de referencia A1 de *P. cinnamomi*, produjeron oosporas pléroticas con anteridios anfiginos. Las cruzas de los aislados con la cepa de tipo de compatibilidad A2 solamente produjeron clamidosporas globosas.

**Sensibilidad a fungicidas.** Considerando que las concentraciones utilizadas para Mtx son más bajas que las de Fp, los aislados presentaron una mayor inhibición del crecimiento con Mtx, sin embargo, no se encontraron aislados resistentes para ambos fungicidas. Los porcentajes de inhibición oscilaron entre 7.79-100 % y 15.75-94.54 % para Fp y Mtx respectivamente. El crecimiento osciló entre 1 < 17 mm. En la comparación de medias se formaron siete grupos con respecto al crecimiento con los fungicidas (Figura 1). Los valores de CE<sub>50</sub> obtenidos de los 50 aislados provenientes de los 9 municipios osciló entre 7 a 61 con una media de 29 µg fosfito de potasio mL<sup>-1</sup> y para metalaxil-M osciló entre 0.17 y 0.57 con una media de 0.25 µg metalaxil-M mL<sup>-1</sup>. Los análisis de varianza para el efecto de Fp y Mtx

en el crecimiento de la colonia de los aislados, mostraron diferencias significativas ( $P > 0.001$ ) entre tratamientos, sin embargo, entre aislados no se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ).



**Figura 1.** Promedio de crecimiento micelial de aislados de *P. cinnamomi* expuestos a diferentes concentraciones de fosfito de potasio y metalaxil-M

**Cuadro 2.** Comparación de medias (Tukey, 0.05) del diámetro de crecimiento de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Michoacán, expuestos a fosfito de potasio y metalaxil-M durante tres días.

Fosfito de Potasio		Metalaxil-M	
Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)	Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)
0	17.61 a	0	17.23 a
5	16.12 b	0.05	14.46 b
10	12.17 c	0.15	9.44 c
25	7.75 d	0.5	6.07 d
50	4.41 e	1	3.63 e
100	1.55 f	3	1.84 f
300	0.20 g	5	0.95 g
600	0.00 g		

\*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

**Variabilidad en virulencia en hojas de *Nicotiana benthamiana*.** Los aislados ocasionaron lesiones de diferentes tamaños, encontrándose diferencias significativas ( $P > 0.001$ ). En la comparación de medias se formaron seis grupos, 46 aislados se comportaron estadísticamente igual compartiendo grupos, ocasionando lesiones que oscilaron entre 8 y 19  $\text{cm}^2$ . Los aislados UPNS-4-1, TGR-3-5 se separaron comportándose como los más virulentos causando lesiones de más de 20  $\text{cm}^2$  y TANR-3-5, ZITR-3-3 se ubicaron en el otro extremo como los menos

virulentos con lesiones menores de 5 cm<sup>2</sup>. Los análisis estadísticos indican que no existe una relación entre el nivel de virulencia y el origen geográfico de los aislados ( $P>0.517$ ), ni con la sensibilidad a Fp (Cuadro 3).

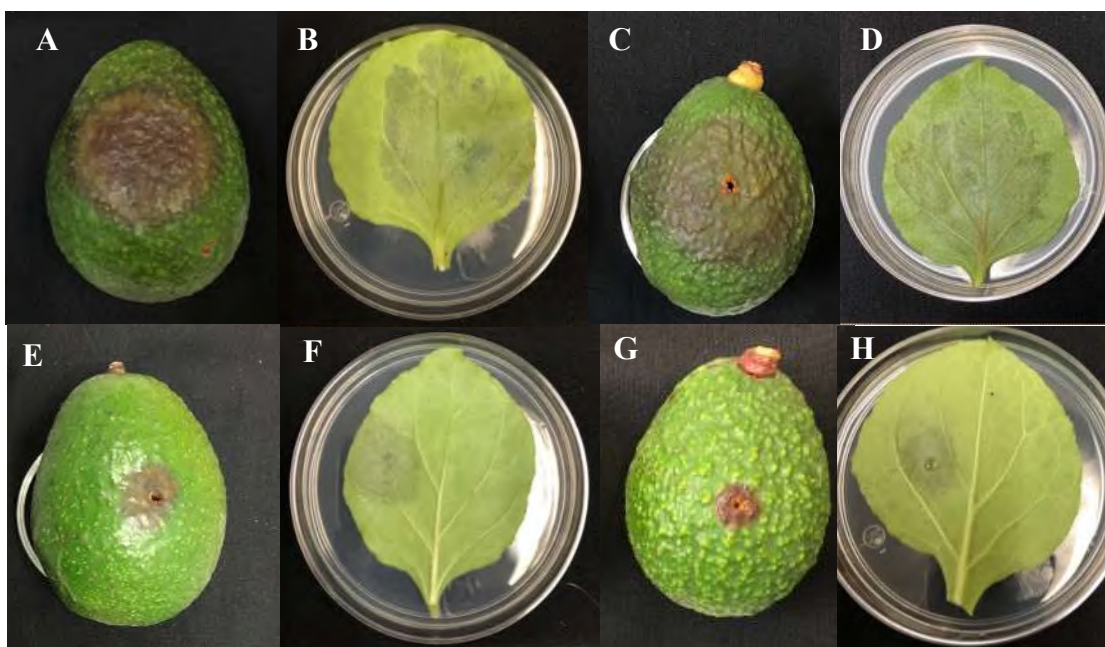
**Cuadro 3.** Concentraciones efectivas de metalaxil-M y fosfito de potasio a las que se inhibió el 50 % del crecimiento micelial de los aislados de *P. cinnamomi* (CE<sub>50</sub>) y comparación de medias (Tukey, 0.05) (tamaño de lesión) de las pruebas de virulencia en *N. benthamiana*.

Aislado	CE <sub>50</sub> Mtx (µg mL <sup>-1</sup> )	CE <sub>50</sub> Fp (µg mL <sup>-1</sup> )	Lesión cm <sup>2</sup>	
UPNS-4-1	0.22	29.32	20.157	a
TGR-3-5	0.27	27.89	20.05	a
SER-1-4	0.22	15.46	19.39	ab
TANS-5-22	0.32	29.75	18.87	ab
SJNR-4-12	0.25	52.48	18.66	ab
PRS-3-13	0.39	33.06	18.40	ab
TANR-1-5	0.28	36.29	18.34	ab
TGR-4-6	0.25	12.17	17.37	ab
ZITR-3-4	0.57	43.51	17.113	ab
ARR-4-1	0.22	17.11	16.863	ab
ZCA-5-3	0.30	9.11	16.56	ab
UPNR-2-5	0.23	24.13	16.52	ab
ZITR-1-1	0.30	30.01	16.48	ab
UPNR-1-1	0.27	17.27	16.44	abc
TGR-4-3	0.25	14.62	16.243	abc
ZCA-2-2	0.34	19.85	16.07	abc
SJNR-3-3	0.22	47.91	16.03	abc
SJNR-3-4	0.20	30.04	15.69	abcd
CAV-12	0.39	19.97	15.64	abcd
SER-5-6	0.22	32.93	15.49	abcd
SER-4-5	0.19	18.88	15.377	abcd
ZCA-1-4	0.18	25.80	15.11	abcd
UPNR-4-4	0.24	34.42	15.027	abcd
ARR-5-4	0.28	28.90	14.82	abcd
SER-3-6	0.18	61.89	14.71	abcd
TANR-2-7	0.20	24.03	14.063	abcd
SER-2-3	0.38	41.01	14.033	abcd
PRS-4-18	0.19	23.07	13.94	abcd

ARR-3-4	0.27	22.16	13.703	abcd
PRS-5-23	0.25	40.6	13.63	abcd
CAV-7	0.20	25.95	13.46	abcd
ZITR-5-5	0.20	21.7	13.243	abcd
PRS-1-1	0.26	7.99	13.037	abcd
SJNR-6-22	0.22	18.67	12.72	abcd
PRS-2-10	0.28	24.08	12.54	abcd
ZCA-3-2	0.19	33	12.437	abcd
ZITR-2-5	0.35	30.53	12.377	abcd
UPNS-3-4	0.21	19.88	11.973	abcd
ZCA-4-3	0.35	51.92	11.92	abcd
CAV-15	0.19	19.27	11.84	abcd
CAV-11	0.18	16.87	11.81	abcd
ARR-1-4	0.17	22.13	11.6	abcd
TGR-1-5	0.23	31.26	11.31	abcd
SJNR-2-3	0.21	19.81	11.26	abcd
SJNR-5-4	0.26	61.47	10.59	abcd
ARR-2-2	0.19	41.38	9.467	abcd
TGR-2-3	0.25	55.21	9.057	abcd
TANR-4-4	0.18	42.87	8.12	bcd
TANR-3-5	0.17	7.05	4.58	cd
ZITR-3-3	0.17	12.48	3.873	d

\*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

**Variabilidad en virulencia en frutos de aguacate.** El tamaño de lesión en frutos de aguacate ocasionado por los 10 aislados seleccionados, fueron diferentes significativamente ( $P > 0.001$ ), en la comparación de medias se formaron tres grupos, donde los aislados TGR-3-5 y UPNS-4-1 indujeron lesiones de más de 24 cm<sup>2</sup>, por el contrario UPNR-1-1, SER-5-6, TANR-3-5, SJNR-6-22 y ZITR-3-3 fueron menos virulentos, causando lesiones que oscilaron entre 2.7 y 4.7 cm<sup>2</sup>, comportándose estadísticamente iguales, los aislados restantes ocasionaron lesiones entre 17.2 y 20.6 cm<sup>2</sup> (Cuadro 4). Los aislados TGR-3-5 y UPNS-4-1 fueron los más virulentos y TANR-3-5 y ZITR-3-3 los menos virulentos tanto en hojas de *N. benthamiana* como en frutos de aguacate (Figura 2).



**Figura 2.** Variabilidad en virulencia de aislados de *P. cinnamomi* en frutos de aguacate y hojas de *N. benthamiana*. Se observó mayor virulencia con los aislados TGR-3-5 (A, B) y UPNS-4-1 (C, D) y menor virulencia con los aislados TANR-3-5 (E, F) y ZITR-3-3 (G, H)

**Cuadro 4.** Tamaño de lesiones ocasionadas por aislados representativos de la variabilidad fenotípica de *P. cinnamomi*, en hojas de *N. benthamiana* y frutos de aguacate

Aislado	Tamaño de lesión (cm <sup>2</sup> )		Aislado	Tamaño de lesión (cm <sup>2</sup> )	
	Hojas de <i>N. benthamiana</i>	Frutos de aguacate		Hojas de <i>N. benthamiana</i>	Frutos de aguacate
TGR-3-5	20	25.8 a	UPNR-1-1	16.4	4.7 c
UPNS-4-1	20.2	24.8 a	SER-5-6	15.5	3.6 c
PRS-1-1	13.04	20.7 ab	SJNS-6-22	12.7	2.7 c
TANS-5-22	18.9	20.7 ab	TANR-3-5	4.6	2.9 c
ZCA-5-3	16.6	20.3 b	ZITR-3-3	3.9	2.7 c

\*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

**Comparación de aislados de *P. cinnamomi* de México y Estados Unidos.** Los diez aislados de EUA también presentan tipo de compatibilidad A2, de acuerdo a las cruces realizadas en la Universidad de California, Riverside.

Al evaluar el crecimiento de los aislados de ambos países expuestos a las diferentes concentraciones, los análisis revelan variación significativa ( $P>0.001$ ), entre los aislados, su origen y los tratamientos. Los aislados de EUA mostraron una media de crecimiento de 8.3 mm contra 7.0 mm de los de MEX. En la comparación de medias entre los aislados se formaron cinco grupos, los aislados 2120 y UPNR-1-1 alcanzaron el mayor y menor crecimiento con 10.12 mm y 4.9 mm respectivamente, el resto de los aislados compartieron grupos, con crecimiento que osciló entre 9.5 y 5 mm. En la comparación de medias entre tratamientos se formaron siete grupos, los tratamientos 6 ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y 7 ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se comportaron estadísticamente iguales, el resto fueron diferentes. Cuadro 5.

**Tasa de crecimiento.** Respecto a esta variable, los análisis de los datos muestran variación significativa ( $P>0.001$ ) entre los aislados y su origen. En la comparación de medias se formaron siete grupos, el aislado 2114 presentó la mayor tasa de crecimiento (9.38 mm) y UPNR-1-1 y SJNR-6-22 la menor (5.10 mm), los demás aislados compartieron grupos con crecimiento que osciló entre 5.22 y 8.38 mm. Entre países, los de EUA presentaron una mayor variación y una mayor tasa de crecimiento (6.86 mm) respecto a los de MEX (6.22 mm).

**Cuadro 5.** Comparación de aislados de *Phytophthora cinnamomi* de Estados Unidos (EUA) y México (MEX), con base a  $CE_{50}$  a fosfito de potasio y a la tasa de crecimiento.

Aislado	$CE_{50}$ Fp ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento por día (mm)	Tipo de compatibilidad	Origen
2114	7.09	9.4 a	A2	California (EUA)
TANR-3-5	7.05	8.4 b	A2	Michoacán (MEX)
2113	8.21	8.3 bc	A2	California (EUA)
PRS-1-1	7.99	8 bc	A2	Michoacán (MEX)
Van 3	9.38	7.9 bc	A2	California (EUA)
B9	5.28	7.7 c	A2	California (EUA)
2110	10.69	6.8 d	A2	California (EUA)
TANS-5-22	29.75	6.6 de	A2	Michoacán (MEX)
UPNS-4-1	29.32	6.3 def	A2	Michoacán (MEX)
ZCA-5-3	9.11	6.2 defg	A2	Michoacán (MEX)
TGR-3-5	27.89	6.1 defg	A2	Michoacán (MEX)
2120	98	6 efg	A2	California (EUA)
5t5b	26.77	5.9 efgh	A2	California (EUA)
2117	67.37	5.8 fgh	A2	California (EUA)
5t6b	42.03	5.5 ghi	A2	California (EUA)
SER-5-6	32.93	5.3 hi	A2	Michoacán (MEX)
2109	83.27	5.3 hi	A2	California (EUA)

ZITR-3-3	12.48	5.2	hi	A2	Michoacán (MEX)
SJNR-6-22	18.68	5.1	i	A2	Michoacán (MEX)
UPNR-1-1	17.27	5	i	A2	Michoacán (MEX)

\*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

**Concentración efectiva (CE<sub>50</sub>).** Los aislados de EUA alcanzaron valores promedio de CE<sub>50</sub> mayores (35.70 µg mL<sup>-1</sup>) respecto a los de MEX (19.24 µg mL<sup>-1</sup>), sin embargo, los dos grupos se comportaron estadísticamente iguales (P<0.169), esto debido a la mayor variación que hay entre los aislados de EUA, con una desviación estándar de 11.05, mientras que para los de MEX fue de 3.1

## DISCUSIÓN

En este estudio se obtuvieron 171 aislados de *P. cinnamomi* de huertas (47) y de un vivero, de nueve de los principales municipios productores de aguacate. Detectándose únicamente el tipo de compatibilidad (TC) A2 lo que sugiere que las poblaciones se están reproduciendo de manera asexual. Esto coincide con estudios previos realizados en México en los que *P. cinnamomi* obtenido de plantas ornamentales presentó el TC A2 (Díaz-Celaya, 2011; Soto-Plancarte, 2019). También es consistente con otras investigaciones donde solamente han reportado la presencia del TC A2 perteneciente a dos linajes clonales panglobales PcG1-A2 y PcG2-A2, distribuidos en todos los continentes. La reproducción asexual al parecer es la que predomina ya que también se reporta la ausencia de reproducción sexual en campo, aun cuando los dos tipos de compatibilidad estén presentes (Old et al., 1984; Hüberli et al., 2001; Eggers et al., 2012; Pagliaccia et al., 2013; Socorro Serrano et al., 2019; Shakya et al., 2021). Aunque algunos investigadores han reportado la presencia de oosporas en tejido radicular producidas por autofecundación, es posible que la producción de oosporas sea estimulada por factores de estrés como la sequía, la presencia de hongos y/o bacterias antagónicas, además de los exudados de las raíces de las especies hospedantes y no hospedantes y no por la unión de los dos tipos de compatibilidad (Crone et al 2013; Jung et al., 2013). Asimismo la baja diversidad genética de las poblaciones de *P. cinnamomi* es una constante en estudios realizados, lo que indica que se reproduce principalmente de forma clonal (Old et al., 1984; Linde et al., 1997). *P. cinnamomi* es un parásito primario con poca capacidad para competir con otros microorganismos especialmente con hongos, cuando el protocolo de aislamiento

no es el adecuado esto se ve reflejado en el bajo porcentaje de aislamiento y la obtención de otras especies (Jung et al., 2013). Por lo anterior, algunos investigadores prefieren el uso de tejidos trampa, ya que la presencia de organismos contaminantes es menor, sin embargo, este método tiene la desventaja de que el tiempo para procesar las muestras es mayor (Erwin and Ribeiro 1996; Eden et al., 2000; Vitale et al., 2019; Jabiri et al., 2020). Toapanta-Gallegos et al., (2017) en un estudio de diagnóstico de *P. cinnamomi*, obtuvieron aislados del 25 % de las muestras y el 60 % fueron especies de *Pythium*. Con el protocolo modificado en el presente estudio se recuperaron aislados de *P. cinnamomi* del 72 % de las muestras a partir de raíces infectadas. La efectividad de este procedimiento se debió en parte a que se seleccionaron raíces laterales en vez de raíces alimentadoras donde es común la presencia de especies de *Fusarium* y *Pythium* (Toapanta-Gallegos et al., 2010; Olalde-Lira et al., 2020). Las hojas jóvenes de aguacate resultaron ser un tejido trampa adecuado ya se recuperó a *P. cinnamomi* del 64 % de las muestras de suelo por lo que se recomienda su utilización.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a fungicidas indican que en Michoacán, *P. cinnamomi* es más sensible a metalaxil-M que a fosfito de potasio. En el presente estudio no se observaron aislados resistentes a fosfito de potasio, en contraste, Wilkinson et al. (2001), reportan aislados resistentes en Australia, que alcanzaron valores de  $CE_{50}$  de  $148 \mu\text{g}^{-1}$ . De igual forma en California, detectaron aislados provenientes de aguacate, con resistencia a fosfito de potasio, con valores de  $CE_{50}$  mayores a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Belisle et al., 2019b). Estudios de huertos de aguacate con uso prolongado de Fp, sugieren la posible selección de aislados de *P. cinnamomi* menos sensibles, lo que pudiera eventualmente conducir al desarrollo de resistencia (Dobrowolski et al., 2008). Es probable que lo anterior se deba a que el Fp se ha usado más extensivamente debido a varios factores entre los que se encuentran los reportes de desarrollo de resistencia a la fenilamida, a su menor costo y a la facilidad de aplicación (Hao et al., 2021). Pagliaccia et al. (2013) indican que los aislados resistentes encontrados en California, pertenecen a un nuevo linaje clonal de reciente introducción, los cuales pudieran considerarse genotipos invasivos emergentes, que pueden evolucionar rápidamente y diferir significativamente de sus poblaciones de origen (Garbelotto et al., 2015; Socorro-Serrano et al., 2019). En la población evaluada de Michoacán, no se observaron aislados resistentes, los valores de  $CE_{50}$  oscilaron entre 7 a  $61 \mu\text{g mL}^{-1}$  considerándose sensibles, lo que sugiere que esos nuevos genotipos reportados por Plagiccia

et al. (2013), no se encuentran en México, esto es congruente con lo obtenido por Socorro-Serrano et al. (2019) quienes determinaron la presencia de genotipos emergentes especialmente invasivos de *P. cinnamomi* en California, pero no en México.

Con respecto a metalaxil-M se observó que los aislados presentan una mayor sensibilidad y menor variación que con fosfito de potasio. Se han reportado especies resistentes a metalaxil-M como *P. palmivora*, *P. nicotianae* y *P. infestans*, por otra parte *P. citrophthora* y *P. syringae* se reportan como sensibles (Randall et al., 2014; Hao et al., 2021; Kongtragoul et al., 2021). Respecto a *P. cinnamomi*, aunque existe un reporte de pérdida de efectividad de metalaxil-M (mefenoxam) en suelos con antecedentes de frecuentes aplicaciones, hay varios reportes de aislados obtenidos de aguacate y plantas ornamentales que confirman la efectividad del fungicida, considerando a metalaxil-M como una buena alternativa para el manejo y control de la pudrición de raíz (Darvas y Becker 1984; Hu et al., 2010; Belisle et al., 2019a; Mondragón-Flores et al., 2022) la limitante para algunos productores de aguacate en México es el costo del fungicida. Otros fungicidas como el Oxathiapirrolin han demostrado ser efectivo en la inhibición del crecimiento del micelio de *P. cinnamomi*, pero aun no están autorizados para aplicarse en aguacate (Belisle et al., 2019a).

El método de hojas separadas utilizando la planta modelo *N. benthamiana* para evaluar virulencia de un gran número de aislados, ha sido previamente validado para determinar la virulencia de *P. cinnamomi* al obtenerse los mismos resultados que cuando se realizan inoculaciones en la raíz de plantas de aguacate (Belisle et al., 2019b). En la presente investigación se validó el uso de esta planta modelo para evaluar la virulencia de aislados de *P. cinnamomi*, al detectarse diferencias entre aislados y ser concordantes con las pruebas realizadas en frutos de aguacate. Asimismo se demostró que utilizar frutos para pruebas de virulencia es una buena alternativa, que facilita la evaluación de aislados comparada con las pruebas de plantas completas. Se confirma lo reportado por Ochoa-Fuentes et al. (2015), quienes detectaron variación en virulencia en aislados de *P. cinnamomi* obtenidos de aguacate en Michoacán. Por lo que se sugiere que en programas de fitomejoramiento para obtener material resistente de aguacate se incluyan aislados con un nivel alto de virulencia. Se ha reportado variación en virulencia cuando los aislados provienen de diferentes hospedantes (Linde et al., 1999) factor que se descarta en nuestro estudio porque todos fueron

obtenidos de aguacate. Resultados de estudios realizados por Garbelotto et al. (2006) indican que las temperaturas frías son desfavorables para este patógeno y que el lugar de origen podría influir en la virulencia. Asimismo la variación en virulencia de aislados de *P. cinnamomi* provenientes de pudrición de raíz de aguacate también se ha reportado por otros autores como Ochoa-Fuentes et al. (2015) y Belisle et al (2019b), quienes también observaron una relación entre el origen geográfico y la virulencia de los aislados, sin embargo, en el presente estudio no se encontró esa relación.

En los aislados de MEX, tanto en la evaluación de sensibilidad como de virulencia, se observó variación fenotípica similar a la reportada en otras investigaciones (Linde et al., 1999; Belisle et al., 2019b). No obstante, los aislados de EU presentaron una mayor variación tanto en sensibilidad a Fp, con valores promedio de  $CE_{50}$  de  $67.69 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y tasa de crecimiento de 6.88 mm, con respecto a los de México que presentaron valores de  $35.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 6.22 mm. En ambos países se detectó únicamente el TC A2, lo que sugiere que la variación ha surgido de manera asexual y que las diferencias en las condiciones ambientales, principalmente la temperatura entre los sitios de colecta y países, podrían ser factores clave para podrían estar afectando la virulencia y se exprese una mayor o menor variación fenotípica (Zentmyer 1980; Hüberli et al., 2001; Wu et al., 2016). No se detectaron genotipos resistentes a Fp similares a los reportados en California con el producto que se comercializa en México (Nutriphite plus Magnum) lo anterior podría deberse a que de acuerdo con Socorro Serrano et al. (2019), MEX parece ser un receptor temprano de genotipos invasivos y virulentos de *P. cinnamomi* respecto a EUA que es un país con un comercio más globalizado. Resultados preliminares de comparación morfológica y la influencia de factores ambientales (temperatura), en lo que respecta a liberación de zoosporas, los aislados de EUA muestran diferencias con los aislados de MEX pero habrá que realizar más estudios para corroborar esta información, así como analizar el genoma de los aislados de MEX y EUA, para definir con certeza si aislados de Michoacán, México fueron introducidos a California, EUA. Debido a la expansión masiva del cultivo y la globalización es de suma importancia mantener minuciosas medidas sanitarias en la entrada y salida de material vegetal entre los países productores para evitar la introducción de nuevos genotipos, que pudieran ser más virulentos y poner en riesgo la rentabilidad y sustentabilidad del cultivo.

## CONCLUSIONES

Los aislados de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos en huertas de aguacate con pudrición de raíz en diferentes municipios de Michoacán mostraron ser del tipo de compatibilidad A2 lo cual es indicativo de que se están reproduciendo de manera asexual, además difieren en virulencia y son sensibles a fosfito de potasio y metalaxil-M.

Se encontraron similitudes entre los aislados de *P. cinnamomi* de EUA y MEX con respecto a sensibilidad a fosfito de potasio y a tipo de compatibilidad, sin embargo, es necesario realizar otros estudios que incluyan morfología y genotificación, así como analizar un mayor número de aislados para determinar si pudieron haber sido introducidos de México hacia Estados Unidos de América.

## LITERATURA CITADA

- Adaskaveg JE, Hao W and Forster H. 2015. Postharvest strategies for managing *Phytophthora* brown rot of citrus using potassium phosphite in combination with heat treatments. *Plant Disease* 99 (11): 1477-1482. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0040-RE>
- Belisle RJ, Hao W, McKee B, Arpaia ML, Manosalva P and Adaskaveg JE. 2019a. New Oomycota fungicides with activity against *Phytophthora cinnamomi* and their potential use for managing avocado root rot in California. *Plant Disease* 103 (8): 2024-2032. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1698-RE>
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019b. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0326-R>
- Chen D and Zentmyer GA. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62 (2): 397-402. <https://doi.org/10.2307/3757597>
- Crone M, McComb JA, O'Brien PA, Hardy GE. 2013. Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata, and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species. *Fungal Biology* 117(2):112-23. Doi: 10.1016/j.funbio.2012.12.004
- Darvas J and Becker O. 1984. Failure to control *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium splendens* with metalaxyl after its prolonged use. *Avocado Growers' Association Yearbook* 7: 77-78

- Díaz-Celaya M. 2011. Detección e identificación de especies de *Phytophthora* y *Pythium* en viveros de plantas ornamentales. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 82 p.
- Dobrowolski MP, Shearer B, Colquhoun I, O'Brien P and Hardy G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57(5): 928-936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01883.x>
- Dobrowolski MP, Tommerup IC, Shearer BL and O'Brien PA. 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* 93:695-704. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.695>
- Eden MA, Hill R. and Galpoththage M. 2000. An efficient baiting assay for quantification of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Plant Pathology* 49(4): 515-522. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00478.x>
- Eggers JE, Balci Y and MacDonald WL. 2012. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. *Plant Disease* 96:1608-1614. doi: 10.1094/PDIS-02-12-0140-RE
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 pp.
- FAOSTAT. 2020. FAO Statistics División 2020. (<http://faostat.fao.org>: accesada agosto 2020).
- Fernández-Pavía S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Abad GZ, Félix-Gastélum R, Ochoa-Ascencio S, Garay-Serrano E, Mondragón-Flores A, Soto-Plancarte A, Grünwald NJ y Santillán-Mendoza R. 2020. Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84pp.
- Feldman ML, Guzzo MC, Machinandiarena MF, Rey-Burusco MF, Beligni MV, Di Rienzo J, Castellote MA, Daleo GR and Andreu AB. 2020. New insights into the molecular basis of induced resistance triggered by potassium phosphite in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 109: doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101452>
- FRAC. 2020. FRAC Code List 2020: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering). Online publication. Fungicide Resistance Action Committee. [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-final.pdf?sfvrsn=8301499a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-final.pdf?sfvrsn=8301499a_2)
- Garbelotto M, Hüberli D, Shaw D. 2006. First Report on an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in Natural Oak Woodlands of California and its Differential Impact on Two Native Oak Species. *Plant Disease* 90 (5): 685. doi: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0685C>

- Garbelotto M, Rocca GD, Osmundson T, di Lonardo V and Danti, R. 2015. An increase in transmission-related traits and in phenotypic plasticity is documented during a fungal invasion. *Ecosphere* 6 (10):1-16. <https://doi.org/10.1890/ES14-00426.1>
- Gray MA, Hao W, Forster H and Adaskaveg JE. 2018. Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from citrus in California. *Plant Disease* 102 (4): 734-742 <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1155-RE>
- Hao W, Förster H and Adaskaveg JE. 2021. Resistance to potassium phosphite in *Phytophthora* species causing citrus brown rot and integrated practices for management of resistant isolates. *Plant Disease* 105 (4) : 972-977 <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1414-RE>
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6 (6): 589–604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hardham AR and Blackman LM. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 19 (2): 260-285. doi:10.1111/mpp.12568
- Hu J, Hong C, Stromberg E and Moorman G. 2010. Mefenoxam sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* isolates. *Plant Disease* 94 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0039>
- Hüberli D, Tommerup IC, Dobrowolski MP, Calver MC and Hardy GE. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research* 105 (9): 1053-1064. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61967-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61967-X)
- Hwang SC, Ko WH and Aragaki M. 1975. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 67(6): 1233-1234
- Jabiri S, Lahlali R, Bahra C, Amraoui MB, Tahiri A and Amiri S. 2020. First report of *Phytophthora vexans* associated with dieback disease of apple trees in Morocco. *Journal of Plant Pathology* 102: 1319. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00606-2>
- Jung T, Colquhoun IJ and Hardy GESJ. 2013. New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathology* 43: 266-288
- King M, Reeve W, Van der Hoek MB, Williams N, McComb J, O'Brien PA, Hardy GE. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Genet Genomics*. 284(6):425-35. doi: 10.1007/s00438-010-0579-7

- Kongtragoul P, Ishikawa K and Ishii H. 2021. Metalaxyl resistance of *Phytophthora palmivora* causing durian diseases in Thailand. *Horticulturae* 7 (10): 375. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100375>
- Linde C, Drenth A, Kemp GHJ, Wingfield MJ and von Broembsen SL. 1997. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology* 87:822-827
- Linde C, Kemp GHJ and Wingfield MJ. 1999. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 231-239
- Mondragón-Flores A, Manosalva P, Ochoa-Ascencio S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G and Fernández-Pavía SP. 2022. Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitacuaro, Michoacan. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(1). DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>
- Ochoa-Fuentes M, Cerna-Chávez E, Gallegos-Morales G, Cepeda-Siller M, Landeros-Flores J y Flores-Olivas A. 2015. Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill. de Michoacan, Mexico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2(5):211-215
- Olalde-Lira G, Raya-Montaño YA, Apáez-Barrios P, Vargas-Sandoval M, Pedraza-Santos M, Raymundo T, Valenzuela-Garza R and Lara-Chávez MBN. 2020. Characterization of *Fusarium* spp., a phytopathogen of avocado (*Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schltdl. and Cham.) in Michoacán, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 52 (2): 301-316. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCFA/article/view/3875>
- Old KM, Moran GF and Bell JC. 1984. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany* 62: 2016-2022
- Pagliaccia D, Pond E, McKee B and Douhan GW. 2013. Population genetic structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with avocado in California and the discovery of a potentially recent introduction of a new clonal lineage. *Phytopathology* 103:91-97. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-12-0016-R>
- Randall E, Young V, Sierotzki H, Scalliet G, Birch PRJ, Cooke DEL, Csukai M and Whisson SC. 2014. Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I contributes to mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 15(7): 664-676 DOI: 10.1111/mpp.12124
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2017. Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* under different management regimes. *Plant Pathology* 66(4): 623-632. <https://doi.org/10.1111/ppa.12620>

- Robin C, and Desprez-Loustau ML. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Plant Pathology 104: 465-475 <https://doi.org/10.1023/A:1008649806620>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. Phytopathologia Mediterranea 57 (1): 89-106. DOI:10.14601/Phytopathol\_Mediterr-22022
- Shakya SK, Grünwald NJ, Fieland VJ, Knaus BJ, Weiland JE, Maia C, Drenth A, Guest DI, Liew ECY, Crane C, Chang TT, Fu ChH, Chi NM, Thu PQ, Scanu B, Sanfuentes von Stowasser E, Durán A, Jung MH and Jung T. 2021. Phylogeography of the wide-host range panglobal plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Ecology. 2021, 30, 5164–5178. DOI: 10.1111/mec.16109
- SIAP (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2020. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Socorro-Serrano M, Osmundson T, Almaraz-Sánchez A, Croucher PJP, Swiecki T, Alvarado-Rosales D, Garbelotto M. 2019. A microsatellite analysis used to identify global pathways of movement of *Phytophthora cinnamomi* and the likely sources of wildland infestations in California and Mexico. Phytopathology 109(9):1577-1593. doi: 10.1094/PHYTO-03-19-0102-R. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31058568
- Soto-Plancarte A. 2019. Especies de *Phytophthora* en plantas ornamentales cultivadas en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 162 p.
- Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 pp.
- Toapanta-Gallegos DE, Morillo-Velastegui LE and Viera-Arroyo WF. 2017. Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 18 (2): 285-294. [https://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num2\\_art:628](https://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:628)
- Vitale A, Aiello D, Guarnaccia V, Perrone G, Stea G and Polizzi G. 2012. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. Journal of Phytopathology 160 (3): 156-159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869>
- Wilkinson CJ, Shearer BL, Jackson TJ and Hardy GESJ. 2001. Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. Plant Pathology 50 (1): 83-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00539.x>

Wu EJ, Yang LN, Zhu W, Chen XM, Shang LP and Zhan J. 2016. Diverse mechanisms shape the evolution of virulence factors in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* sampled from China. Scientific Reports 6, 26182. <https://doi.org/10.1038/srep26182>

Zentmyer GA.1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul, Minnesota. 96 pp

## DISCUSIÓN GENERAL

*Phytophthora cinnamomi* es considerada como una de las 100 especies exóticas más invasoras, tanto en la agricultura como en los ecosistemas naturales. Ocasiona la pudrición de raíz del aguacate, siendo esta de una de las principales enfermedades que limitan el cultivo (Téliz, 2000; Burgess et al., 2017; Rodríguez-Padrón et al., 2018). Debido a que el cultivo de aguacate es una fuente de ingresos importante, año con año se incrementa la superficie sembrada en Michoacán, sin embargo, en ocasiones se siembra en zonas que no favorecen el desarrollo del cultivo y por consiguiente es más susceptible de ser atacado por patógenos. En el municipio de Zitácuaro, Michoacán, la superficie sembrada se ha ido incrementando y por consiguiente también las enfermedades (SIAP, 2020). Este municipio no se había considerado para realizar estudios de pudrición de raíz en investigaciones previas realizadas con aislados de Michoacán (Ochoa-Fuentes et al., 2007, 2015). En esta región se detectaron dos especies de *Phytophthora* causando pudrición de raíz, *P. cinnamomi* y *P. menzei* lo cual puede limitar aun más la producción. No existen reportes de *P. menzei* en Michoacán asociada a pudrición de raíz únicamente se había detectado en el Estado de México, fue originalmente descrito como *P. citricola* por Fucikovsky y Luna (1987) y posteriormente reclasificado como *P. menzei* por Hong et al. (2009). En las huertas donde se aisló *P. menzei* en Zitácuaro se ha observado la presencia de cancro por lo que es posible que esté ocasionando también esta enfermedad, pero no se le ha dado la importancia que merece debido a que se le considera con una virulencia limitada en raíces, pero en los tallos es más agresivo comparado con *P. cinnamomi*, además puede infectar frutos y causar pudrición (Zentmyer et al., 1974; Coffey et al., 1988; Anónimo, 2013). Es muy probable que estuviera en raíces adventicias donde puede sobrevivir, aunque esta no sea su área de infección o en raíces alimentadoras donde completa su ciclo de vida, ya que no es común que cause pudrición de raíz (Coffey et al., 1988; El-Hamalawi y Menge, 1994). *P. menzei* en el presente estudio causó lesiones, en los frutos y en las plantas clorosis, defoliación y muerte descendente, por lo que es posible que su presencia sea frecuente en huertos excesivamente sombreados, con suelos arcillosos, con árboles de más de 10 años de edad y estresados, debido a que estos factores predisponen el

desarrollo de la enfermedad (Coffey et al., 1988; El-Hamalawi y Menge, 1994; Ceja-Torres et al., 2000). En futuras investigaciones deberá considerarse el estudio del agente causal de canchros, principalmente en zonas en donde los árboles se están desarrollando en condiciones desfavorables.

En 171 aislados que se recuperaron de los diferentes municipios solamente se detectó el tipo de compatibilidad A2 lo que sugiere que las poblaciones de *P. cinnamomi* aisladas de raíz de aguacate son de origen asexual y que únicamente este tipo de compatibilidad está presente en aguacate en México, como se ha determinado previamente en aislados de plantas ornamentales (Díaz-Celaya, 2011; Soto-Plancarte, 2019). Por lo que se asume que la variación entre aislados observada en esta investigación, con lo que respecta a virulencia y diversidad entre esporangios (datos no mostrados) se ha desarrollado asexualmente. Se considera que probablemente Taiwan o Vietnam sean el centro de origen de *P. cinnamomi*, debido a la presencia de los dos tipos de compatibilidad y que más tarde de ahí migro en productos básicos agrícolas al resto del mundo, incluyendo a México (Socorro-Serrano et al., 2019; Shakya et al., 2021). Nuestros resultados son consistentes con investigaciones de México y de otros países en donde únicamente se ha reportado la presencia del tipo de compatibilidad A2 perteneciente a dos linajes clonales panglobales PcG1-A2 y PcG2-A2 del tipo de apareamiento A2, y aun cuando se han detectado A1 y A2 predomina la reproducción asexual de acuerdo con estudios realizados en campo (Old et al., 1984; Hüberli et al., 2001; Pagliaccia et al., 2013; Socorro-Serrano et al., 2019; Soto-Plancarte, 2019; Shakya et al., 2021).

La disponibilidad de fungicidas para controlar *P. cinnamomi* es limitada, los más utilizados son metalaxil y fosfitos (Hardham y Blackman, 2018). A partir de la década de los 70's, los fosfitos han sido utilizados en ecosistemas naturales para el control de enfermedades causadas por especies de *Phytophthora* (Guest y Grant, 1991). En México no se habían realizado estudios sobre la sensibilidad a Fp y Mtx de *P. cinnamomi*, siendo el presente estudio el primero. Los resultados de los 50 aislados caracterizados en base a su sensibilidad indican que son más sensibles a Mtx que a Fp, Se sabe que el Fp en altas concentraciones afecta la síntesis de la pared celular,

sin embargo, en bajas concentraciones no afecta el crecimiento micelial, por lo tanto, el Fp puede retardar, pero no prevenir la propagación de *P. cinnamomi* en plantas infectadas (Wilkinson et al., 2001a; King et al., 2010; Feldman et al., 2020). Aunque existen reportes de desarrollo de resistencia a Fp (Wilkinson et al., 2001b; Belisle et al., 2019), en el presente estudio no se detectaron aislados resistentes, lo cual lo ubica como una opción, así como al Mtx para que sean parte de un manejo integrado de la pudrición de raíz en aguacate.

La validación que se realizó en la presente investigación de la utilización de *Nicotiana benthamiana* como planta modelo para determinar la virulencia de *P. cinnamomi* es importante ya que se puede detectar de manera rápida y con un costo bajo la virulencia de los aislados. Al encontrarse aislados con variación en la virulencia se hace necesario incluir los aislados que resulten más agresivos en las pruebas de búsqueda de patrones resistentes a este patógeno, por lo que se sugiere que se lleve a cabo esta práctica en los programas de fitomejoramiento de aguacate.

Este es el primer estudio comparativo de poblaciones de *P. cinnamomi* de Michoacán y MEX y California, EUA, que son los estados más importantes como productores de aguacate a nivel mundial (FAOSTAT, 2020; SIAP, 2020). Belisle et al. (2019), reportaron que en el sur de California se detectaron aislados pertenecientes al grupo A2 clado II considerados como un nuevo linaje clonal. Se ha pensado que este nuevo linaje podría haber sido introducido de México, al sur de California, lo cual motivó la comparación llevada a cabo en el presente estudio. Se lograron avances en la comparación de las poblaciones de *P. cinnamomi* detectándose similitudes en lo que respecta a sensibilidad a Fp y tipo de compatibilidad, sin embargo, es necesario realizar otros análisis. Como este proyecto se desarrolló como parte de una colaboración entre MEX y EUA, el genotipado por secuenciación (GBS) de los aislados de MEX y EUA, se está realizando por el grupo de investigación de la Universidad de California de Riverside dirigido por la Dra. Patricia Manosalva, lo cual ayudará a dilucidar si los genomas son similares entre los aislados de ambos países. El cultivo del aguacate es sumamente importante para ambos países debido a la derrama económica que genera, en mayor medida para México, por lo que es

importante que se establezcan estrictas medidas sanitarias, para evitar la entrada de nuevos genotipos de *P. cinnamomi* que pongan en riesgo la productividad del cultivo del aguacate.

## CONCLUSIONES GENERALES

Los aislados de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos en huertas de aguacate con pudrición de raíz en diferentes municipios de Michoacán mostraron ser del tipo de compatibilidad A2 lo cual es indicativo de que se están reproduciendo de manera asexual, además difieren en virulencia y son sensibles a fosfito de potasio y metalaxil-M

En el municipio de Zitácuaro se detectó tanto a *P. cinnamomi* así como a *P. menzei* causando de pudrición de raíz, ambas especies sensibles a fosfito de potasio y metalaxil-M

Se encontraron similitudes entre los aislados de *P. cinnamomi* de EUA y MEX con respecto a sensibilidad a Fp y a tipo de compatibilidad, sin embargo, es necesario realizar otros estudios que incluyan morfología y genotificación, así como analizar un mayor número de aislados para determinar si pudieron haber sido introducidos de México hacia Estados Unidos de América.

## Perspectivas

- Es necesario hacer un muestreo extensivo en huertas de aguacate con problemas de pudrición y cancro de tronco, para determinar en que municipios se encuentra *P. menzei* y la magnitud del problema que puede estar causando.
- Se requieren estudios adicionales de aislados de *P. cinnamomi* de México y de Estados Unidos, como la genotificación para determinar si aislados de México fueron introducidos a Estados Unidos.

## LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2013. Trunk canker. Plant Health Australia. <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/01/Trunk-canker-FS.pdf>
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0326-R>
- Burgess, TI, Scott JK, McDougall KL, Stukely MJC, Crane C, Dunstan WA, Brigg F, Andjic V, White D, Rudman T, Arentz F, Ota N and Hardy GESJ. 2017. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Global Change Biology* 23: 1661–1674 DOI:10.1111/gcb.13492
- Ceja-Torres LF, Téliz-Ortiz D, Osada-Kawasoe S y Morales-García JL. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. en cuatro municipios del Estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 79-86
- Coffey MD, Oudemans P and Ouimette D. 1988. *Phytophthora citricola*: another cause of avocado decline. *California Avocado Society 1988 Yearbook* 72: 127-131
- Díaz-Celaya M. 2011. Detección e identificación de especies de *Phytophthora* y *Pythium* en viveros de plantas ornamentales. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 82 p.
- EI-Hamalawi ZA. and Menge JA. 1994. Avocado trunk canker disease caused by *Phytophthora citricola*: Investigation of factors affecting infection and disease development. *Plant Disease* 78(3): 260-264
- FAOSTAT. 2020. FAO Statistics División 2020. (<http://faostat.fao.org>: accesada agosto 2020).
- Feldman ML, Guzzo MC, Machinandiarena MF, Rey-Burusco MF, Beligni MV, Di Rienzo J, Castellote MA, Daleo GR and Andreu AB. 2020. New insights into the molecular basis of induced resistance triggered by potassium phosphite in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 109: doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2019.101452>
- Fucikovsky L and Luna I. 1987. Avocado fruit diseases and their control in Mexico. *Proceedings of the First World Avocado Congress. South African Avocado Growers' Association Yearbook* 1987. 10:119-121

- Guest D and Grant BR. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66 (2):159-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x>
- Hardham AR and Blackman LM. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 19: 260-285. doi:10.1111/mpp.12568
- Hong CX, Gallegly ME, Browne GT, Bhat RG, Richardson PA, Kong P. 2009. The avocado subgroup of *Phytophthora citricola* constitutes a distinct species, *Phytophthora menzei* sp. nov. *Mycologia*. 10(6): 833-40. doi: 10.3852/08-214. PMID: 19927748
- Hüberli D, Tommerup IC, Dobrowolski MP, Calver MC and Hardy GE. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research*, 105(9): 1053-1064. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61967-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61967-X)
- King M, Reeve W, Van der Hoek MB, Williams N, McComb J, O'Brien PA, Hardy GE. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetic Genomics*. 284(6): 425-35. doi: 10.1007/s00438-010-0579-7
- Ochoa-Fuentes M, Cerna-Chávez E, Gallegos-Morales G, Cepeda-Siller M, Landeros-Flores J and Flores-Olivas A. 2015. Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill. de Michoacán, Mexico. *Ecosystemas y Recursos Agropecuarios*. 2(5): 211-215
- Ochoa-Fuentes YM, Martínez-de la Vega O, Olalde-Portugal V, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Castillo FD and Flores-Olivas A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2):161-166
- Old KM, Moran GF and Bell JC. 1984. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal Botany* 62: 2016-2022
- Pagliaccia D, Pond E, McKee B and Douhan GW. 2013. Population genetic structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with avocado in California and the discovery of a potentially recent introduction of a new clonal lineage. *Phytopathology* 103: 91-97
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57: 89-106
- Shakya SK, Grünwald NJ, Fieland VJ, Knaus BJ, Weiland JE, Maia C, Drenth A, Guest DI, Liew ECY, Crane C, Chang TT, Fu CH, Minh Chi N, Quang Thu P, Scanu B, von Stowasser ES, Durán Á, Horta Jung M, Jung T. 2021. Phylogeography of the wide-

host range panglobal plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Ecology* 30:(20) 5164-5178. doi: 10.1111/mec.16109

SIAP. 2020. (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2019. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Socorro-Serrano M, Osmundson T, Almaraz-Sánchez A, Croucher PJP, Swiecki T, Alvarado-Rosales D, Garbelotto M. 2019. A Microsatellite analysis used to identify global pathways of movement of *Phytophthora cinnamomi* and the likely sources of wildland infestations in California and Mexico. *Phytopathology*. 109(9): 1577-1593. doi: 10.1094/PHTO-03-19-0102-R. PMID: 31058568

Soto-Plancarte A. 2019. Especies de *Phytophthora* en plantas ornamentales cultivadas en viveros de la Ciudad de México, Michoacán y Morelos. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 162 p.

Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 p.

Wilkinson CJ, Holmes JM, Dell B, Tynan KM, McComb BL, Sherer BL, Colquhoun IJ and Hardy GESTJ. 2001a. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 50(5): 587–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00605.x>

Wilkinson CJ, Shearer BL, Jackson TJ, Hardy GESTJ, 2001b. Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant Pathology* 50: 83–9

Zentmyer GA, Jefferson L, Hickman CJ and Chang-Ho Y. 1974. Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea americana*. *Mycologia* 66 (5): 830-845. <https://doi.org/10.2307/3758203>