

136  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CON DIFERENTES  
TIPOS DE INOCULO DE *Phytophthora cinnamoni* Rands.  
EN PLANTAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
IRMA MORALES RODRIGUEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	4
1.1. Importancia del cultivo del aguacate.....	4
1.2. Importancia de la enfermedad.....	6
1.3. Taxonomía y descripción de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	8
1.4. Ciclo de la enfermedad.....	11
1.4.1. Síntomas de la enfermedad.....	12
1.5. Factores que influyen en la Biología y patogenicidad de <i>P. cinnamomi</i> .....	13
2. Antecedentes.....	15
2.1. Otros hongos del sistema radical del aguacate....	15
2.2. Métodos de inoculación.....	17
2.3. Producción de esporangios y liberación de zoosporas.....	25
2.4. Estudios realizados para el control de la enfermedad.....	28
3. Objetivos.....	31
4. Materiales y Métodos.....	32
4.1. Descripción de la zona de muestreo.....	32
4.2. Muestreo.....	33
4.3. Aislamiento del patógeno.....	35
4.4. Obtención del inóculo.....	34
4.4.1. Formación de esporangios.....	34
4.4.2. Incremento del inóculo miceliar.....	37
4.4.3. Incremento del inóculo clamidospórico.....	37

4.5.	Pruebas de patogenicidad.....	39
4.5.1.	Con zoosporas.....	39
4.5.2.	Con crecimiento miceliar.....	40
4.5.3.	Con clamidosporas.....	40
4.6.	Análisis estadísticos de resultados.....	41
5.	Resultados y discusión.....	43
5.1.	Obtención del inóculo.....	43
5.1.1.	Obtención del inóculo zoospórico.....	43
5.1.2.	Obtención del inóculo miceliar.....	49
5.1.3.	Obtención del inóculo clamidosporal.....	50
5.2.	Pruebas de patogenicidad.....	50
5.2.1.	Con zoosporas.....	50
5.2.2.	Con micelio.....	54
5.2.3.	Con clamidosporas.....	55
5.3.	Comportamiento de los tipos de inóculo en las tres edades estudiadas. Dos, seis y doce meses de edad.....	62
6.	Conclusiones.....	66
7.	Bibliografía.....	68

\* \* \*

## RESUMEN

La enfermedad tristeza del aguacatero (*Persea americana* Mill.) causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands, se ha considerado como la limitante parasítica más importante en la producción de este frutal en México y el mundo (Zentmyer 1980; Téliz y García 1982). Es necesaria mayor información sobre este organismo así como las relaciones con otros microorganismos habitantes del sistema radical del aguacate.

En el centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados existe un proyecto de investigación "Manejo integrado de la tristeza del aguacatero" que intenta aumentar la eficiencia del control de la enfermedad implementando los principios de control, cultural, químico, biológico y genético. El control genético se basa en parte, en la selección de material resistente a la enfermedad mediante inoculaciones a plantas jóvenes.

El objetivo del presente trabajo fue contribuir al conocimiento y aportar conocimiento de diferentes métodos de inoculación para futuros trabajos de selección de materiales resistentes, protección cruzada y ecología.

Se utilizaron cepas de *P. cinnamomi* obtenidas de árboles de aguacate con síntomas avanzados de enfermedad. Se indujo la formación de diferentes tipos de inóculo de *Phytophthora cinnamomi*: zoosporas, clamidosporas y micelio, con los cuales se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate de dos, seis y 12 meses de edad.

El mejor método para la formación de esporangios fue en solución salina mineral estéril en condiciones de luz fluorescente continua y 24 C durante 72 hrs.; éstos coinciden con los de Chen y Zentmyer (1970). Las clamidosporas se incrementan

21

taron en suelo mezclado con harina de maíz al 2%. El micelio se produjo en semillas de trigo esterilizados e incubadas bajo oscuridad a 28 C.

Se utilizó un diseño experimental completamente al - - azar, con tres tratamientos (tipo inóculo=zoosporas, clamidosporas y micelio) y un testigo sin inocular con ocho repeticiones cada uno. Se emplearon plantas individuales como unidad experimental, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se regaron a inundación cada dos días. El avance de la enfermedad se evaluó cada dos días durante 120 días, tomando como base una escala ordinal desde 0=ausencia de síntomas, 1=marchitez incipiente, 2=marchitez, 3=marchitez avanzada, 4=defoliación y 5=muerta. Para detectar diferencias entre tratamientos se realizaron análisis de Kruskal y Wallis - (p=0.05). Para la elección de los mejores tratamientos se -- realizaron separaciones de medias (p=0.05) y la interacción - entre edad-tratamiento se midió con un análisis de varianza - en parcelas divididas (p=0.05).

En general las plantas de dos meses de edad inoculadas con zoosporas y las inoculadas con micelio mostraron síntomas de enfermedad en tres días, lo cual coincide con lo que obtienen Dawson y Weste 1984, quienes también observan síntomas de enfermedad en un tiempo corto cuando inoculan con zoosporas. Las inoculadas con clamidosporas tardaron 20 días. Las plantas de un año de edad mostraron síntomas hasta los 90 días -- después de la inoculación. Las plantas testigo no presentaron síntomas de enfermedad.

Los tratamientos con zoosporas mostraron mayor eficiencia para producir infección y muerte, seguido por micelio y - por último las clamidosporas para las tres edades estudiadas. El porcentaje de mortalidad fue menor al aumentar la edad de las plantas. Se observó recuperación de plantas enfermas de

seis y 12 meses. Estas comparaciones se deben tomar con reserva ya que no se homogenizó la cantidad de los diferentes tipos de inóculo ni se aumentó la densidad de inóculo al aumentar la edad de las plantas.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CON DIFERENTES TIPOS DE INOCULO DE  
*Phytophthora cinnamomi* RANDS. EN PLANTAS DE AGUACATE (*persea*  
*americana* MILL.)

1. INTRODUCCION

1.1. Importancia del cultivo del aguacate.

El aguacate es originario del Sureste de México y de las zonas tropicales y subtropicales de Centroamérica de donde se ha distribuido a otras regiones del mundo. (De la Torre, 1984).

Uno de los posibles centros de domesticación del aguacate (*Persea americana* Mill.) es México. Se han encontrado evidencias arqueológicas que datan de 8,000 años antes de Cristo en el Valle de Tehuacán, Puebla (Smith, 1966), considerándose la región de Atlixco como un posible centro de origen (Mosqueda, 1981).

Los centros de origen de un cultivo son de importancia porque poseen la mayor diversidad genética (Lepik, 1970). Desde el punto de vista fitopatológico lo son también ya que es donde hospedantes y parásitos han coevolucionado en el tiempo y espacio, estableciéndose así una relación de equilibrio.



El aguacate (*Persea americana*) es un cultivo de gran expansión en varios países del mundo, porque juega un papel importante para su economía. México, Estados Unidos, Brasil, Venezuela, Africa del Sur e Israel sobresalen en la producción de este frutal. (FAO, 1985). (Figura 1).

México es el principal productor de aguacate en el mundo. Los principales estados productores son Michoacán, Sinaloa, Puebla y el Estado de México. En 1986-87 se cosecharon 83,000 hectáreas con una producción de 625,000 toneladas (Sánchez, 1987). Sin embargo aunque existe una tendencia de expansión en las áreas cultivadas con este frutal el rendimiento unitario en toneladas por hectárea ha disminuido (Sánchez, 1987). Esto podría explicarse por problemas socioeconómicos, manejo inadecuado de huertos y problemas fitosanitarios. La enfermedad radical conocida como la tristeza del aguacatero - causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* es considerada como la limitante parasítica más importante para la pudrición de este frutal en México y en el mundo. (Zentmyer, 1980; Téliz y García, 1982).

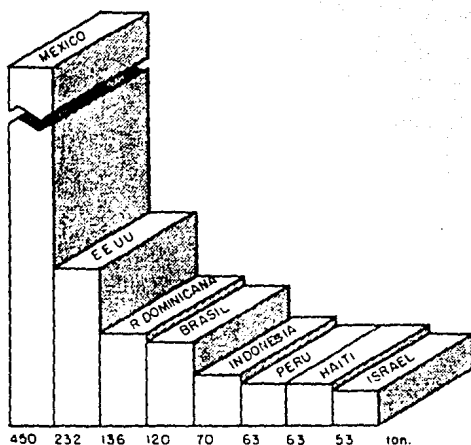


Figura 1. Producción de aguacate (*Persea americana* Mills.) en los principales países productores (Fuente FAO, 1985).

## 1.2. Importancia de la enfermedad

El agente causal de la enfermedad tristeza del aguacatero es *Phytophthora cinnamomi*, descrito por primera vez por Rands en Sumatra, al aislarlo de plantas de canela (*Cinnamomum burmani*) en 1922; desde entonces ha sido encontrada en 60 países como causante de una variedad de enfermedades en más de 1000 plantas hospederas, lo que representa para México un peligro potencial para otros cultivos de importancia económica (Zentmyer, 1980).

Esta enfermedad es ás drástica en regiones constante--

mente húmedas (Zentmyer y Richards, 1952; Hine et al, 1964; -- Haygood, 1986); sin embargo, este factor es importante para incrementar el desarrollo y productividad de este frutal en áreas tropicales y subtropicales (Gregoriow y Rajkumar, 1984; Zentmyer, 1981).

En 1922 se observó por primera vez atacando al aguacatero en Puerto Rico, en 1944 se informó de su existencia en Sudáfrica, poco después en 1951 en México y Honduras (Zentmyer 1951). Horne (1934) observó a *P. cinnamomi* como integrante del sistema edáfico del aguacatero.

En México se ha detectado en los estados de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit y Morelos (Anónimo, 1978) (Figura 2). En Puebla se han observado niveles de incidencia del 75% de los árboles en producción y en algunas regiones del país como Querétaro ha ocasionado la desaparición del cultivo (Téliz y García, 1982).

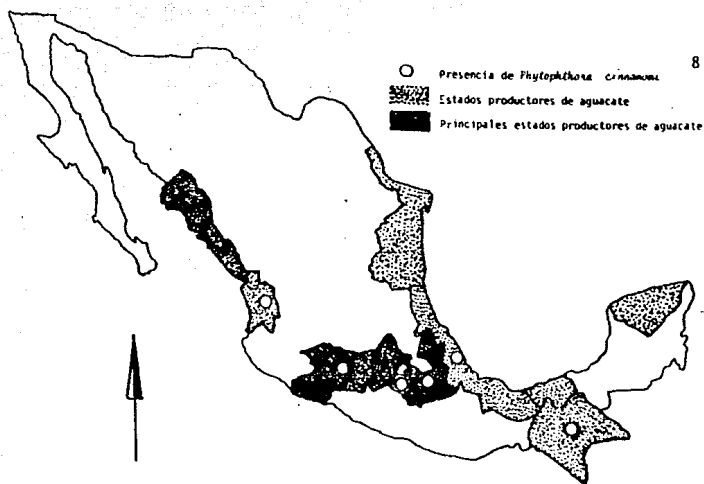


Figura 2. Estados productores de aguacate (*Persea americana* Mill) a nivel nacional y presencia de *Phytophthora cinnamomi*.

### 1.3. Taxonomía y descripción de *Phytophthora cinnamomi*.

Alexopoulos y Mims (1979) ubican a *P. cinnamomi* en

Reino. Mycetae

División. Mastigomicota

Clase. Oomycetes

Orden. Peronosporales

Familia. Phythiaceae

Género. *Phytophthora*

Especie. *cinnamomi*

*Phytophthora cinnamomi* es un hongo heterotálico con dos grupos de compatibilidad (Zentmyer, 1980); el grupo A-1 se ha localizado en los Estados Unidos, Australia, Taiwán, Sudáfrica, Madagascar y Nueva Guinea. El grupo A-2 tiene una distribución mundial (Zentmyer, 1985) (Figura 3).

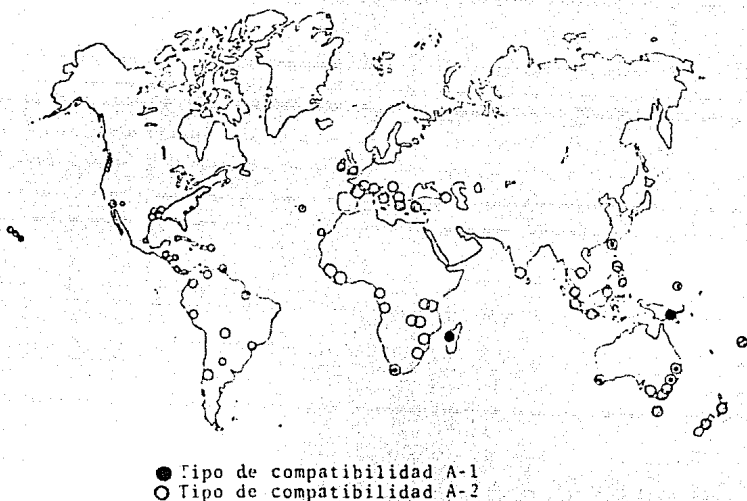


Figura 3. Distribución de tipos de compatibilidad de *Phytophthora cinnamomi* en el mundo (Zentmyer, 1987).

Con base en la descripción de Waterhouse y Waterston - (citado por Zentmyer, 1980), este hongo produce un micelio típicamente toruloso con hifas cenocíticas moderadamente ramificadas, de paredes gruesas con hinchamientos vesiculares; for-

ma abundantes clamidosporas esféricas terminales e intercalares. Mediante la reproducción sexual que se da sólo cuando se encuentran los dos grupos de compatibilidad, se originan cosporas appleróticas. Los esporangios son oval-alargados y no forman papila, los esporangióforos son delgados, ocasionalmente ramificados; el crecimiento en medio de cultivo es profuso y en ocasiones con un patrón rosetado, las temperaturas óptimas son de 24 a 28 C, la mínima de 5 y la máxima de 34 C.

*Phytophthora cinnamomi* en condiciones naturales produce tres tipos de esporas: clamidosporas, oosporas, y zoosporas. La virulencia de este hongo está determinada en gran parte por la producción de esporangios, los cuales tienen la capacidad de incrementar en un tiempo relativamente corto la densidad de inóculo, por la alta producción y liberación de zoospora, (Zentmyer, 1880; Hwang y Ko, 1978; Hoitink et al, Zentmyer y Brighan, 1956). Estas son móviles en el suelo y eficientes para infectar los ápices radicales (Zentmyer, 1980).

Las clamidosporas tienen gran importancia en la sobrevivencia del patógeno, porque permanecen en raíces muertas o en el suelo hasta por seis años (Zentmyer y Mircetich, 1966; Salazar, 1969). Sin embargo, también tienen cierto papel en la infectividad, ya que son los propágulos que inician la infección en la planta hospedante cuando las condiciones son favorables.

El micelio también es considerado como una fuente de inóculo pero su capacidad de infección está limitada al contacto entre raíces sanas y enfermas, además de no tener una larga sobrevivencia en las raíces del hospedero ni en suelos con abundante materia orgánica. Su sobrevivencia en el suelo fuera del hospedero es de 60 días (Malajczuk, 1983).

*Phytophthora cinnamomi* en medio de cultivo sólo forma clamidosporas; otro tipo de esporas es necesario inducir las. El origen del aislamiento presenta variaciones en velocidad de crecimiento, morfología de la colonia, habilidad para formar estructuras reproductoras y en su capacidad virulenta. Aislamientos con mayor virulencia se han aislado en los estados de Guanajuato y Puebla en comparación con los usados para evaluar resistencia en California (Salazar, 1969).

#### 1.4. Ciclo de la enfermedad.

Debido a la capacidad de sobrevivencia de las clamidosporas son éstas esporas las que dan lugar al inóculo primario, cuando las condiciones son favorables para su germinación y desarrollo; al germinar emiten un tubo germinativo, el micelio se desarrolla sobre las raíces del hospedero o en el suelo, forma esporangios los cuales liberan zoosporas que nadan en el agua del suelo infectando nuevas raíces de plantas susceptibles, que se enquistan y germinan produciendo nuevo

micelio, el cual esporula y libera zoosporas. El micelio crece entre las células del sistema vascular y en la superficie de las raíces. La infección empieza con una invasión primaria del hongo en las raíces de absorción en donde produce pudrición; el hongo avanza por el cambium hacia las raíces de mayor diámetro pudriéndolas y tornándolas a un color negro haciéndolas frágiles y quebradizas, finalmente destruyéndolas. En ocasiones llega a afectar el cuello y la parte inferior del tronco causando una cancrrosis con extensiva exudación de un azúcar (monocetoheptosa). En México este síntoma no se ha observado.

#### 1.4.1. Síntomas de la enfermedad.

Los síntomas de la enfermedad aparecen en la planta en cualquier momento de su ciclo biológico, dependiendo de las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Los primeros síntomas consisten en formación de hojas pequeñas y amarillas que se marchitan y desprenden, resultado de un déficit nutricional; si los árboles se encuentran en producción se observan frutos de tamaño y número reducido. Cuando las condiciones ambientales son óptimas para el desarrollo de la enfermedad, se produce una marchitez rápida y generalizada del follaje, consecuencia de la pudrición de raíces.



ces seguida de un desequilibrio hídrico. La planta no puede compensar el agua transpirada ocasionando finalmente la muerte del árbol.

#### 1.5. Factores que influyen en la biología y patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi*.

La temperatura del suelo óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 20 C. El micelio se desarrolla entre 7.5 y 28 C con un óptimo entre 17.5 y 19.5 C. Los esporangios se producen a temperaturas de 12 a 30 C, siendo la óptima 24 C. Las zoosporas no se producen a temperaturas inferiores de - 17 C; disminuciones de temperatura provocan la liberación de zoosporas; al estar libres nadan a través del agua e infectan a raíces sanas del huésped (Zentmyer, 1961; Zentmyer y Chen, 1969).

La curva de crecimiento de *P. cinnamomi* en respuesta a la temperatura es similar a la del aguacatero (Zentmyer, 1985) excepto a los 35 C, temperatura a la cual el hospedero puede crecer y el patógeno no. El desarrollo de *P. cinnamomi* y la reducción consecuente del crecimiento de plántulas de aguacate es con temperaturas del suelo de 21 a 27 C.

La humedad en el suelo es el principal factor ambiental que influye en el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*. En sue-

los con mal drenaje el hongo se activa, dando como resultado la infección de las raíces del aguacatero (Zentmyer, 1980). Las zoosporas y clamidosporas no sobreviven cuando la humedad es menor del 3% por dos semanas (Zentmyer, 1951; Zenmyer y Lewis, 1976). El agua del suelo influye en el crecimiento de - hifas, formación del esporangios y movimiento de zoosporas -- (Baker y Cook, 1974; Reeves, 1975; Griffin, 19720. Por otra parte, le permite al hongo sobrevivir cuando no está en contacto con la raíz del hospedero.

Nesbitt *et al* (1968) observaron lisis de hifas en suelo húmedo por debajo de la capacidad de campo cuando fueron - incubadas a una temperatura de 25 a 27 C; los esporangios no se forman a temperaturas menores de 15 C.

El oxígeno del suelo es necesario para el desarrollo - del hongo (Zentmyer y Brighan, 19560.

El pH también influye en el desarrollo del hongo; de - 3.5 a 5 se tiene poco crecimiento y arriba de 8 se reduce. - El óptimo es de 6.5. La germinación de zoosporas se reduce - cuanto de pH es de 4.5 (Zentmyer y Bigham, 1956; Zentmyer *et al* 1965; Zentmyer *et al*. 1971).

La quimiotaxia de zoosporas a las raíces del hospedero puede ser un importante factor en la patogénesis. Las zoospo

ras de *P. cinnamomi* son atraídas a la región de elongación de las raíces de absorción. La atracción primaria es debida aparentemente por un aminoácido exudado de esta zona de la raíz.

La electrotaxia puede jugar un papel en la atracción de zoosporas. Las zoosporas tienen partículas de carga negativa que son atraídas hacia el ánodo. La invasión de zoosporas a las raicillas toma lugar rápidamente a través de los espacios intercelulares, seguida de una penetración intracelular (Zentmyer, 1980).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Otros hongos del sistema radical del aguacatero.

Existen varios trabajos en donde se menciona que varios hongos del género *Pythium* y del género *Phytophthora* son habitantes comunes del patosistema edáfico del aguacatero, sin embargo aún no se sabe los daños que se puedan llegar a ocasionar. Se ha prestado más atención a *Phytophthora cinnamomi*, ya que este hongo parece encontrarse en todas las regiones aguacateras del mundo; en cambio otros microorganismos son escasamente mencionados y su relación con la enfermedad es poco conocida.

Franco (1983) encontró seis cepas diferentes de hongos

que son patogénicas al aguacatero y determinó a cinco de ellas como pertenecientes al género *Pythium*, sus aislamientos fueron hechos de raíces de árboles de aguacate de la región de Atlixco, Puebla, donde frecuentemente se han aislado diferentes Pythiaceos.

Dolan *et al* (1985), encontraron protección de *Persea americana* con *P. parasítia*, el cual causa un pequeño daño a *P. cinnamomi* y mencionaron además que si se interplantan críticos con aguacate, este hongo jugaría un papel en la inducción de resistencia del aguacatero.

Horne (1934), observó a *Phytophthora cinnamomi* como integrante del sistema edáfico del aguacate.

Harvey (1974), mencionó la asociación de *Pythium anandrum* y *Pythium momospermum* como patógenos del sistema radical del aguacate.

Hendrix y Campbell (1973) mencionaron que especies del género *Pythium* son hongos que infectan típicamente la zona de elongación de la raíz y que este proceso depende en gran medida de exudados de la raíz.

Reeves (1975), realizó experimentos donde se observó relación y competitividad saprofítica de *Phytophthora cinnamomi*

con otros microorganismos del suelo, al sembrar plantas de *Cascalea sativa* en un suelo rico en materia orgánica; la competencia la hizo *Trichoderma viride* quien indujo a la formación prematura de oosporas, clamidosporas y esporangios de *P. cinnamomi*. Demostrando así que la regulación saprofítica es una parte importante de la sobrevivencia del hongo.

## 2.2. Métodos de inoculación.

Aragaki (1975), probando resistencia a la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora palmivora* en plántulas de papaya menciona un método de inoculación. En 1,500 ml de agua deionizada suspendió un disco de 60 mm. de diámetro con esporangios de *P. palmivora* los cuales liberaron zoosporas. Las plántulas se mantuvieron en esta suspensión por diferentes períodos de tiempo; después las plántulas se regresaron a las macetas y se evaluó la infección. A los cuatro días se encontró un 100% de mortalidad en plantas que fueron sometidas dos horas a inundación.

Mitchell et al. 1978 estudiaron la relación entre el número de zoosporas que producen la infección y la mortalidad del trébol. Inocularon con diferentes concentraciones de zoosporas de *P. cryptogea*, plantas de trébol de dos semanas de edad sembradas en vermiculita húmeda bajo condiciones ambientales controladas y un pH estabilizado con una solución -

buffer de agua deionizada. Las plantas fueron inoculadas con la solución buffer que contenía zoosporas. A cada planta se adicionó con una pipeta de 1 ml. de esta solución. La movilidad de las zoosporas fue mantenida sometiendo a las plantas - inoculadas a una temperatura de 20 C y tres horas de inundación. La evaluación de la infección se determinó a los 21 días reaislando el hongo. Se encontró un 100% de infección y un 50% de mortalidad cuando se inoculó con 10,000 zoosporas - por planta.

Dawson y Weste (1984), inocularon con zoosporas de *P. cinnamomi* árboles de eucalipto de dos meses de edad sembrados en macetas de plástico y bajo condiciones ambientales controladas.

Para facilitar la infección, lesionaron la raíz antes de la inoculación. Diez horas después de la inoculación observaron la infección en la raíz al sembrar trozos de raíces enfermas en medio selectivo y 15 días después se observaron síntomas de la enfermedad en plantas susceptibles.

Zilberstein y Pinkas (1987), evaluaron la resistencia de clones de árboles de aguacate a *P. cinnamomi*. Cortaron puntas de raíces de los clones y las sumergieron en agua bidestilada más una suspensión de diferentes concentraciones de zoosporas e incubaron bajo diferentes tiempos en oscuridad. A --

las 72 horas de incubación observaron infección en las raíces de las especies susceptibles, cuando fueron inoculadas con 10,000 zoosporas por ml en comparación con las especies resistentes en donde no se observó infección.

Ramírez y Mitchell (1975), inocularon plantas de papaia de 45 días de edad, sembradas en macetas de 100 ml de capacidad, adicionando 10 ml de agua deionizada estéril, con diferentes concentraciones de zoosporas de *Phytophthora palmivora* a cada maceta. A la semana observaron un 100% de infección cuando se inoculó con 100,000 zoosporas por planta. La infección la evaluaron al sembrar raíces de las plantas inoculadas en un medio selectivo, reaislando así al hongo. Para la inoculación con clamidosporas utilizaron suelo infestado con varias densidades de clamidosporas, en el cual sembraron las plántulas de 15 días de edad. La infección la evaluaron sembrando raíces de las plantas infestadas en medio selectivo. Una a cinco clamidosporas por g de suelo requeridas para producir 50% de infección.

Kanwischer y Mitchell (1981), reportaron métodos de inoculación en plantas de tabaco de un mes de edad por medio de clamidosporas, oospora y zoosporas de *P. parasitica*. Infestaron suelo esterilizado estableciendo varias densidades de inóculo clamidospórico por g de suelo en el cual trasplantaron las plantas de tabaco. La inoculación con zoosporas la

llevaron a cabo bajo condiciones de inundación para facilitar el movimiento de zoosporas hacia la raíz. La infección la evaluaron dos meses y medio después de la inoculación. Sembraron trozos de raíces de plantas inoculadas en medio selectivo. Reportaron un 100% de infección cuando inocularon con 500 clamidosporas por g de suelo y 95% de infección con 3,000 zoosporas por planta.

Kenerley *et al.* (1984), determinaron el efecto de la inundación en plántulas de *Abies fraseri* y su susceptibilidad al ataque por *P. cinnamomi* y en la producción de inóculo secundario en suelo infestado y no infestado. Utilizaron plantas de dos años de edad, las cuales fueron transplantadas a suelo infestado y a suelo no infestado, sometidas a diferentes tiempos de inundación. La mortalidad de las plantas la determinaron visualmente a los 33 días después de los períodos de inundación y el % de infección lo determinaron sembrando raíces en medio selectivo. Observaron un 85% de mortalidad y un 100% de infección con períodos de 24 a 48 horas de inundación. La densidad de inóculo la cuantificaron a los tres, nueve y 26 días de inundación, sembrando diluciones de suelo en un medio selectivo y obteniendo un incremento significativo a los tres días de inundación, período que predispone a las plantas a la infección. La producción de inóculo secundario la determinaron sumergiendo hojas de *Rhododendron* cortadas en discos y desinfestadas al agua flotante de las plantas por 24 horas; -



después de este tiempo las hojas fueron lavadas con agua deionizada y puestas en un medio selectivo, obteniendo en él colonias de *P. cinnamomi*. También determinaron la predisposición del hospedero al ataque por *P. cinnamomi* y la distribución del patógeno. Previamente a la inoculación sometieron plantas a 24 horas de inundación, 20 minutos antes de este tiempo inocularon con diferentes concentraciones de zoosporas; siete días después se determinó el % de infección, obteniendo un 100% de infección y un 84% de mortalidad con 120,000 zoosporas por planta y no observaron diferencias entre tratamientos inundados y no inundados.

Daniway (1977), al estudiar la influencia del control de agua en la severidad de la pudrición de la raíz causada por *P. criptogea* en *Carthamus tinctorius*, inoculó plantas de tres a cinco semanas de edad con diferente concentración de zoosporas de *P. criptogea* distribuyéndolas en la superficie del suelo, después de que el inóculo penetró en el suelo, se adicionó agua a saturación y 11 días después evaluó la severidad de la enfermedad; los síntomas fueron evaluados con una escala arbitraria de cero (ausencia de síntomas) hasta cinco (marchitez severa); obteniendo mayor cantidad de raíces podridas con 200,000 zoosporas por planta al aumentar el riego antes y después de la inoculación.

Cho (1981), provando patogenicidad de *P. cinnamomi* ino-

culó plantas de *Bankia speciosa* de un año de edad con un macedado de inóculo preparado con 20 ml de cultivo agar de una semana de edad con 20 mm de agua destilada estéril, del cual colocó 10 mm debajo de la superficie del suelo alrededor de cada planta. Dos meses después de la inoculación, se examinaron los síntomas al hacer reaislamientos en medio selectivo agar; para probar resistencia, inoculó plantas de dos meses de edad de diferentes especies *Bankia* con zoosporas resultando a los seis días un 75% de mortalidad en plantas susceptibles y a los diez días un 90% de mortalidad en otras plantas susceptibles. Observó infección con diez zoosporas por planta y una máxima infección con 1000 zoosporas por planta.

Blaker y Mac Donald (1981), inocularon plantas de *Rhododendron* de un año de edad resistentes y susceptibles a *P. cinnamomi*, adicionaron un número conocido de zoosporas al rededor de cada maceta agregaron agua hasta saturación y las mantuvieron así durante 24 horas. La severidad de la enfermedad la evaluaron utilizando una escala desde cero (síntomas no visibles) hasta cinco (plantas muertas). Se observaron síntomas más típicos de la pudrición de la raíz y corona con diez zoosporas por planta; la severidad de la enfermedad aumentó al incrementar la dosis de zoosporas; en las plantas resistentes, no parecieron síntomas aunque también se aisló el hongo. El desarrollo de los síntomas fue más severo en plantas sometidas a sequías y en las sometidas a la inundación por 48 horas antes de la inoculación.

Benson y Cochran (1980), evaluaron la resistencia en híbridos de *Rhododendron* (azaleas) a la pudrición de la raíz -- causado por *P. cinnamomi*; utilizaron como inóculo, aislamientos de este hongo cultivados por 30 días en granos de avena esterilizados; tres semanas después transplantaron las azaleas y adicionaron 30 gr de inóculo en cada uno de los dos hoyos que hicieron al rededor del eje de cada planta, de dos a cuatro cm debajo de la superficie del suelo; mantuvieron las plantas con humedad a capacidad de campo colocando las macetas en charolas con agua. Cuatro meses después evaluaron la severidad utilizando una escala de 1 a 5 donde: 1=raíces sanas, 2=necrosis aguda, 3=necrosis avanzada, 4=corona necrosada y 5=plantas muertas, no cuantificaron número de propágulos con el que inocularon; registraron plantas resistentes, moderadamente resistentes, y muy susceptibles a la pudrición de la raíz.

Stamdish *et al.* (1982) al hacer un estudio para conocer especies de *Phytophthora* involucradas en la pudrición, hicieron aislamientos de raíz o corona de *Juniperus* y encontraron a *Rhododendron* de un año de edad resistentes y susceptibles a *Phytophthora cinnamomi* y a *P. cripítegea*. Probaron su patogenicidad en condiciones de invernadero, inoculando a *Juniperus* con crecimiento miceliar de las dos especies de *Phytophthora* de cuatro semanas de edad; cada aislamiento de *Phytophthora* creció en jarras de un litro conteniendo 500 cm<sup>3</sup> de vermiculita más 200 ml de caldo V-8; el inóculo fue lavado con agua va-

rias veces para remover los nutrientes y lo mezclaron con suelo esterilizado (7 partes de inóculo por 9 de suelo) donde se transplantaron las plantas adicionando agua hasta saturación durante 48 horas, dos veces a la semana a algunas plantas. La infección la evaluaron después de 8 semanas, sembrando raíces de plantas enfermas en un medio selectivo, encontrando a *P. criptogea* involucrada en la enfermedad, sólo en plantas que se sometieron a períodos de inundación, señalando así la importancia que tiene el cuidado del riego en los cultivos.

Wong, *et al.* (1986), estudiaron la patogenicidad de *Phytophthora clandestina* en raíces de trébol subterráneo y su interacción con otros cinco hongos comúnmente asociados con la pudrición de la raíz del trébol. Inocularon al suelo con crecimiento miceliar, (obtenido en semillas del mijo humedecidas, esterilizadas e incubadas a 25 C durante seis semanas), mezclaron el inóculo al 0.05 p/p con suelo pasteurizado y ahí sembraron las semillas de trébol y las sometieron a diferentes condiciones de temperatura y humedad. Dos semanas después, evaluaron la severidad de la enfermedad usando una escala de 0 a 5, donde 0=raíces sanas y 5=planta muerta. Calcularon el porcentaje promedio del índice de enfermedad usando una modificación del método de Mc Kinner (1923) citado por estos autores y encontraron una severa pudrición causada por *P. clandestina* a una temperatura de 10 C.

Kuan y Erwin (1980) saturaron de agua algunas plantas de alfalfa durante una semana y las inocularon con un homogenado miceliar preparado al mezclar dos cajas de medio de cultivo agar con crecimiento de *P. megasperma* con un agitador durante 15 seg. en un litro de agua destilado y la repartieron alrededor de las plantas; tres semanas después determinaron la severidad de la pudrición de la raíz utilizando una escala desde 0=ausencia de la enfermedad hasta 5=raíces podridas y planta muerta. Encontrando pudrición más severa en plantas que fueron saturadas con agua antes de la inoculación en contraste con las no saturadas.

### 2.3. Producción de esporangios y liberación de zooporas de -- *Phytophthora cinnamomi*.

Existen reportes donde se menciona la existencia de microorganismos involucrados en la formación de esporangios de *P. cinnamomi* (Mehrllich, 1935; Zentmyer y Marshall, 1959; Byan, 1965 citado por Donald y Frank 1965). Sin embargo en trabajo de fisiología y patogenicidad de *P. cinnamomi* se han presentado dificultades debido a la contaminación por bacterias y protozoarios del extrato de suelo no estéril en asociación con esporangios y esporas de este patógeno (Donald y Frank 1965); por lo que para estos fines es importante producir estados esporangiales en cultivo puro, ya que estas estructuras liberan zoosporas, las cuales incrementan en un tiempo relativamente corto la densidad de inóculo.

Muchas especies de *Phytophthora* producen esporangios - fácilmente en cultivo puro, en el caso de *P. cinnamomi* no es así.

Existen varios métodos que se han experimentado para - inducir la formación de esporangios. Rands, (1922) (citado - por Chen y Zentmyer 1970) y Leonian 1934, obtienen esporan- - gios bajo condiciones estériles, lavando discos de cultivo de *P. cinnamomi* de ocho a diez días de edad con agua estéril, va- - rios cambios por períodos de 48 horas.

Mehrlich (1935), experimentó la formación de esporan- - gios en extracto de suelo no estéril y menciona por primera - vez la presencia de microorganismos involucrados en la forma- - ción de esporangios.

Dolan, *et al.* (1986) citan un método de producción de - esporangios en extracto de suelo al 1% no estéril. Incubando - discos con crecimiento miceliar de 0.5 cm de diámetro por 24 - horas a 24 C en caldo V-8 al 20%, lavando posteriormente tres - veces en agua destilada e incubados en el extracto de suelo - por seis días; los autores no indican bajo qué condiciones. - Para la liberación de zoosporas, sometieron los esporangios a - cuatro C durante 20 minutos.

La temperatura, humedad luz, pH, etc., también influye

en la formación de esporangios Waterhouse (citado por Zentmyer 1980) obtiene que la temperatura óptima para la producción de esporangios es de 24 C y comparando formación de estas estructuras en medio sólido y líquido sólo las obtiene en medio líquido. Manning y Crossan (1966) indujeron esporangios sólo en condiciones de luz fluorescente continua o en alternancia de luz-oscuridad. Schoulties y Baker (1974) encontraron que la luz constante es importante para reducir la variedad en la producción de esporangios; por otra parte Zentmyer y Ribeiro (1977) (citados por Zentmyer, 1980), encuentran que la producción de zoosporas no depende de la luz.

Chen y Zentmyer (1970) encontraron un método práctico para la formación de esporangios bajo condiciones de luz fluorescente continua, como una respuesta a la pérdida de nutrientes. La liberación de zoosporas la obtuvieron bajando la temperatura a 5 C durante diez minutos, regresando los esporangios a luz continua a 24 C y esperando una hora para la liberación de éstas.

Mircetich y Matheron (1976), emplearon para la producción de esporangios extracto de suelo esterilizado mediante un filtro miliporo, sumergiendo en éste discos con micelio de *P. cinnamomi* e incubándolos bajo luz continua.

#### 2.4. Estudios realizados para el control de la enfermedad.

Las enfermedades radicales a nivel raíz son difíciles de atacar debido a la complejidad de las interacciones físico-químicas y biológicas que se establecen en el fenómeno del parasitismo. Existe una gran ignorancia del comportamiento de *P. cinnamomi* probablemente esté interactuando sinérgica o antagónicamente no sólo con otros hongos sino con otros componentes de la microbiota.

En México a pesar de ser el mayor productor de aguacate a nivel mundial, la investigación de la pudrición de raíces del aguacatero aún es reducida en contraste con otros países también productores de aguacate como Estados Unidos, Sudáfrica y Australia.

En 1982, surgió en el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados un proyecto de investigación que intenta, aumentar la eficiencia del control de la enfermedad "tristeza del aguacatero", mediante un desarrollo de un manejo integrado del control de la enfermedad y con una filosofía interdisciplinaria. Se han implementado prácticas culturales, control químico, biológico y genético.

Para aumentar la efectividad del control también se está incluyendo la búsqueda de materiales resistentes, ya que -



según Walker y Snyder (1933), (citados por Zentmyer 1980) el uso de resistencia es una aproximación efectiva para el control de muchos patógenos del suelo, lo cual se ha afirmado en estudios de control de *P. cinnamomi*. Muchas investigaciones han sido dedicadas a esta fase de control y están basadas en inoculaciones a plantas jóvenes.

Aunque en nuestro país no existen referencias al respecto se ha tratado de probar la patogenicidad de *P. cinnamomi* para seleccionar materiales resistentes a la enfermedad (Gallindo, comunicación personal) de aquí la necesidad de encontrar una metodología apropiada para pruebas de patogenicidad de *P. cinnamomi* en plantas de aguacate.

En este momento es necesario tener un método de inoculación eficaz de *P. cinnamomi* en plantas de aguacate y así seguir buscando materiales resistentes a la enfermedad, además de estudiar relaciones de hongos y otros microorganismos con el propósito de entender el papel de éstos en el patosistema y así la naturaleza de la enfermedad.

El presente trabajo forma parte de una serie de ensayos coordinados por el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados enmarcados dentro del proyecto titulado "Manejo integrado de la tñisteza del aguacatero", iniciado en 1982.

En un intento por contribuir al conocimiento de la biología de *P. cinnamomi* y aportar conocimientos de algunas metodologías de inoculación para probar la patogenicidad de este hongo se planteó el presente trabajo con los objetivos siguientes:

### 3. Objetivos:

- 1.- Inducir a la formación de diferentes tipos de inóculo de *P. cinnamomi*.
  - a.- Formación de esporangios y liberación de zoosporas.
  - b.- Formación de clamidosporas.
  - c.- Incremento de crecimiento micelial.
- 2.- Evaluar los diferentes tipos de inóculo obtenidos de *P. cinnamomi* en plantas de aguacate.
- 3.- Evaluar el comportamiento de los diferentes tipos de inóculo de *P. cinnamomi* en plantas de aguacate - dos, seis y 12 meses de edad.

#### 4.- MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo consistió en dos fases, campo y laboratorio, la fase de campo se llevó a cabo en el huerto experimental "Bugambilias", ubicada en el Municipio de Atlixco, Puebla.

##### 4.1. Descripción de la zona de muestreo.

Atlixco se localiza en el Estado de Puebla, en la provincia fisiográfica del eje Neovolcánico y subprovincia de los lagos y volcanes de Anáhuac. Ocupa un área total de 286.57 km cuadrados, su principal cultivo es el aguacate (INEGI, 1987). De acuerdo con la clasificación de Koopen modificada por García, su clima es de tipo A(C) wi (m), semicálido, subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación anual oscila entre 700 a 1000 mm; los meses más lluviosos son de junio a septiembre y los meses más secos de diciembre a marzo. Su temperatura media anual es superior a los 18 C, el mes más caliente es abril, que alcanza una temperatura de 23.4 C. Esta región está libre de heladas (INEGI, 1987). Al Norte de la ciudad de Atlixco se localiza el huerto "Bugambilias". El suelo del huerto se clasifica como un fluviosol de textura migajón arenosa, presenta un pH ligeramente alcalino de 7.2 a 7.3, y una conductividad eléctrica de 2 mmhos/cm por lo que presenta problemas de salinidad.

#### 4.2. Muestreo.

Se tomaron muestras de raíces de árboles de aguacate con síntomas avanzados de enfermedad "tristeza del aguacate-ro". Cada muestra se extrajo de sitios bajo el área de sombra del árbol, sacando cubos de suelo de 20 x 20 x 20 cm. y de él se separaron las raíces, las cuales fueron colocadas en una bolsa de polietileno, añadiendo suelo con el fin de evitar la deshidratación, se etiquetaron y trasladaron al laboratorio.

La fase de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Montecillos México.

#### 4.3. Aislamiento del patógeno.

En el laboratorio, las raíces fueron lavadas con agua corriente y cortadas en trocitos de 2 cm de longitud, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto; se enjuagaron con agua destilada y se secó el exceso de agua con papel secante.

Se sembraron con diez fragmentos de raíces por caja (Figura 4), que contenían medio de cultivo PARPH, selectivo para aislamientos de pythiaceos (Jeffers y Marin, 1986). Las

cajas se incubaron a oscuridad a una temperatura de 25 C durante tres días; al término de este tiempo se procedió a la determinación de *P. cinnamomi* con base a sus características macro y microscópicas basadas en la descripción de Waterhouse y Waterston (citados por Zentmyer 1980) y se transfirió para su purificación a medio de cultivo V-8; las cajas se incubaron en oscuridad a una temperatura de 28 C durante cuatro días.

#### 4.4. Obtención del inóculo.

Con la finalidad de asegurar la formación de esporangios y liberación de zoosporas se probaron dos metodologías distintas. En solución salina mineral estéril y en extracto de suelo no estéril.

##### 4.4.1. Formación de esporangios en:

a).- En solución salina mineral estéril.

Esta solución contenía 0.005 M de nitrato de potasio, 0.01 M de nitrato de calcio, 0.004 M de sulfato de magnesio - aforado a un litro con agua deionizada; se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos y se agregó 1.5 ml por litro de solución de hierro quelatado (Fe EDTA) esterilizado o filtrado en un filtro miliporo de .22 micras.

Para preparar el FeDTA se utilizaron 7.5 g KOH, 24.9 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 13.05 g de ácido etileno - dinitrotetraacético -- los cuales se agregaron a una probeta y se aforaron a un litro con agua deionizada.

Se utilizaron cultivos de cuatro días de edad creciendo en medio de cultivo V-8 agar, del cual se tomaron con un sacabocados, discos de un cm de diámetro, los cuales fueron transferidos a cajas petri con 25 ml de caldo de jugo V-8 por caja (100 ml de jugo V-8, 2 g de  $\text{Ca CO}_3$  , centrifugados y aforados a un litro con agua deionizada.

Las cajas se incubaron a 25 C bajo oscuridad durante 12 a 24 horas; al término de este tiempo se formó alrededor del disco un tapete de crecimiento miceliar de 0.5 cm aproximadamente. Se drenó el jugo de las cajas, y los discos con el tapete miceliar fueron lavados con la solución salina mineral.

Se efectuaron cuatro lavados, uno cada 30 minutos con 25 ml de la solución salina, ésto con la finalidad de quitar los nutrientes del medio de cultivo, agitando las cajas lentamente en cada lavado, para ayudar así al vaciado de éstos. Los lavados se efectuaron en condiciones asepticas.

Las cajas de petri teniendo los discos con micelio cu-

biertos con la solución salina, se incubaron bajo cuatro diferentes condiciones de luz y temperatura, cinco repeticiones para cada una de las diferentes condiciones: a). luz fría -- fluorescente a 20 cm de altura durante 72 horas a 24 C; b). -- alternancia de 12 horas luz fluorescente, 12 oscuridad a temperatura ambiente; c). oscuridad permanente a 24 C y d). 12 hrs luz natural, 12 oscuridad a temperatura ambiente.

b).- En extracto de suelo no estéril.

Para la preparación de este extracto, se pesaron 5 g de suelo, tomados de una muestra previamente homogeneizada -- procedente del huerto de aguacate, se agregaron cinco g de -- suelo a vasos de precipitado, se aforaron 100 ml con agua destilada estéril y se mezclaron con un agitador electromagnético por diez minutos, repitiéndose este ciclo cada 12 horas -- con el propósito de disminuir el efecto de anoxia y propiciar el incremento de la microbiota en la suspensión del suelo, al término del período de incubación se decantó y se filtró a -- través de cuatro capas de manta de cielo.

Se evaluó la cantidad de esporangios producidos por -- disco de un cm de diámetro en cada una de las diferentes condiciones. Para la liberación de zoosporas los discos con el crecimiento miceliar con esporangios fueron lavados con agua deionizada estéril tres veces y sometidos a temperatura de -- 10 C durante 15, 20 y 30 minutos. Se retornaron las cajas a --

oscuridad a 24 C durante una hora, tiempo en el cual ocurrió la liberación de zoosporas.

#### 4.4.2. Incremento del inóculo micelial.

El incremento del micelio se probó en semillas de trigo y en semillas de avena, previamente humedecidas con agua - al 100% de capacidad. Se agregaron 100 g de semillas a cada uno de los matraces de 250 ml, se esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante dos horas, en dos ocasiones, - dejando un día de reposo entre la primera y la segunda esterilización. Cada matraz se inoculó con diez discos de 1 cm de diámetro con crecimiento micelial de *P. cinnamomi* y se incubaron en oscuridad a 25 C durante 15 días.

#### 4.4.3. Incremento del inóculo clamidospórico.

La formación del inóculo clamidospórico se incrementó en suelo bromurado mezclado con harina de maíz al 1%. Se - agregaron 100 g de suelo humedecido a capacidad de campo en - cada matraz erlenmayer de 250 ml, se esterilizaron e incubaron de igual forma que la metodología anterior, cada ocho matraces de inóculo se mezclaron perfectamente con ocho, 24 y - 48 g de suelo bromurado y se mantuvieron en charolas a capacidad de campo durante 60 días. Al término de este tiempo se de terminó la cantidad de inóculo clamidospórico presente en el suelo por medio de diluciones.



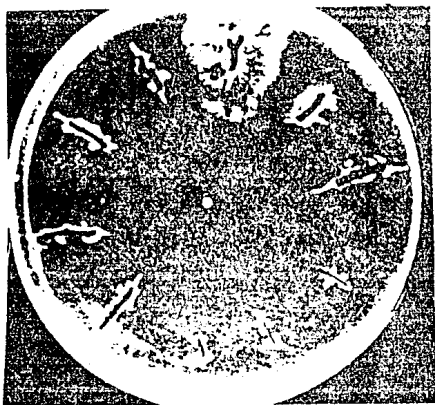


Figura 4. *Phytophthora cinnamomi* creciendo en medio selectivo - P.A.R.P.H. a partir de raíces de árboles de aguacate enfermos.



Figura 5. Aspecto sano de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) de dos, seis y doce meses de edad.

El suelo se homogeneizó perfectamente, se tomó un g de suelo y se suspendió en 99 ml de agua agar al 2%. Una alícuota de 10 ml de esta suspensión se virvió en 90 ml de agua - - agar al 2% obteniéndose así una dilución de 10-, de la cual - se tomaron 10 ml y se suspendieron en diez cajas petri, un ml por caja que contenía medio selectivo PARPH, y fueron incubadas a una temperatura de 25 C por tres días y se determinó el número de propágulos por g de suelo con el que se inocularon las plantas.

#### 4.5. Pruebas de patogenicidad.

Las pruebas de patogenicidad fueron llevadas a cabo en el laboratorio (zoosporas) y en el invernadero se utilizaron plantas de aguacate criollo (*Persea americana* Mill.) de dos, -- seis y 12 meses de edad (Figura 5), cultivadas desde su germinación en suelo desinfectado con bromuro de metilo sembradas en macetas individuales de uno, tres y seis kg de capacidad - respectivamente. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, el cual consistió de tres tratamientos y el -- testigo, con ocho repeticiones cada uno.

##### 4.5.1. Con zoosporas.

La inoculación a las plantas con zoosporas se llevó a cabo distribuyendo una suspensión de 20,000 zoosporas por ml

(150 ml por planta) resultado de 50 discos de micelio en cada planta de aguacate de las diferentes edades; se descubrieron un poco las raíces para vaciar la suspensión de zoosporas, se volvieron a cubrir las raíces y las plantas se sometieron a inundación durante 24 hrs, cerrando el drenaje de las macetas. El riego a inundación se mantuvo cada tercer día. La evaluación de los síntomas se llevó a cabo cada tercer día durante 30 días.

4.5.2. Con crecimiento miceliar.

La inoculación a las plantas con crecimiento miceliar se llevó a cabo mezclando cada 800 g de semilla de trigo colonizadas con *P. cinnamomi* se mezclaron perfectamente con una, dos y cuatro kg de suelo bromurado el cual se utilizó para trasplantar las plantas de aguacate de dos, seis y 12 meses de edad respectivamente, el riego se mantuvo a inundación cada tercer día. La evaluación de los síntomas se llevó a cabo cada tercer día durante 120 días.

4.5.3. Con clamidosporas.

Los ocho, 24 y 48 kg de suelo mezclado con el inóculo se utilizaron para trasplantar las plantas de aguacate de dos, seis y doce meses de edad.

Las plantas se trasplantaron a este suelo en macetas individuales de uno, dos y cuatro kg de capacidad respectivamente y se regaron a inundación cada tercer día, la evaluación de los síntomas se llevó a cabo cada dos días, durante 120 días.

Dos días después de la inoculación se procedió a evaluar el aspecto aéreo de las plantas, cada dos días durante cuatro meses. El aspecto aéreo se determinó tomando como base una escala ordinal en que 0=planta sana, 1=marchitez incipiente, 2=marchitez avanzada, 4=defoliación por marchitez y 5=muerte.

#### 4.6. Análisis estadísticos de resultados.

Se realizaron análisis estadísticos paramétricos (transformaciones de datos a logaritmo natural) y no paramétricos (transformaciones de datos a rangos), con ayuda del programa estadístico (SAS) con la finalidad de comparar estos tipos de análisis y tomar los resultados que se ajusten a lo observado biológicamente. Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, para cada edad en cada evaluación se realizaron análisis de varianza ( $p=0.05$ ) (Said y Zárte 1988) y pruebas de Kruskal y Wallis (Said y Zárte, 1988; Siegel, 1972). Para la selección del "mejor" tratamiento en cada evaluación, para cada edad se realizó la prue-

ba de Tukey ( $p=0.05$ ) (Steel y Torrie, 1988) y una comparación múltiple ( $p=0.05$ ) (Holander y Walfe, 1973). La interacción edad-tratamiento se determinó con un análisis de varianza en parcelas divididas ( $p=0.05$ ) con transformaciones de los datos a rangos (Morales, 1988).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

Las colonias de *P. cinnamomi* se observaron y aislaron a los tres días de haber sembrado las raíces de aguacate en el medio selectivo PARPH. Además de este hongo se encontraron colonias de distintos hongos de la familia *Pithiaceae*, los cuales según Rodríguez y García, 1983, se han encontrado constantemente y con alta frecuencia. Franco 1983 identificó a la mayoría de éstos como el género *Pythium*.

*Pythium* y *Phytophthora* se han encontrado comúnmente en el patosistema edáfico del aguacatero (Rodríguez y García 1983) y han resultado patogénicas a la raíz del aguacatero (Hendrix y Cumpbel, 1873; Harvey, 1945; Moore y Phelps 1974; Liu; 1977; Vander Plaats 1981; Franco 1983; Dolan *et al.* 1985), (citados por Rodríguez y García, 1983).

### 5.1. Obtención del inóculo.

#### 5.1.1. Obtención del inóculo zoospórico.

El mejor medio para la producción de esporangios fue la inmersión de discos de V-8 agar con crecimiento de *P. cinnamomi* de cuatro días de edad en caldo V-8 al 20%, incubados 12 horas a 28 C, lavados cuatro veces durante 30 minutos en solución salina mineral estéril. Las condiciones en las que se -

obtuvo mayor producción de esporangios fueron con luz fluorescente a 24 C durante 72 horas (Tabla 1). Estos resultados -- concuerdan con los obtenidos por Chen y Zentmyer (1970) quienes obtienen abundante producción de esporangios bajo condiciones similares de temperatura, luz y solución salina mineral estéril que la utilizan para quitar los nutrientes del medio de cultivo V-8 agar y mencionan que la formación de esporangios es una respuesta a la pérdida de nutrientes inducida por el lavado de los discos de crecimiento miceliar con la solución salina. Además indican que el calcio y magnesio contenidos en la solución son responsables de la diferenciación de los esporangios y que la solución de FeDTA incrementa la producción de estas estructuras.

Existen trabajos en donde se menciona que la temperatura, humedad (Waterhouse, 1969, citado por Zentmyer 1980) y luz (Maning y Crossan 1966 y el pH (Zentmyer y Ribeiro 1977), influyen en la producción de esporangios, lo cual se confirma con los resultados de este trabajo los que efectivamente indican que la humedad, temperatura y luz fueron factores importantes en la formación de esporangios.

Abundante producción de esporangios también se obtuvo en extracto de suelo no estéril, al incubarse discos de V-8 agar con crecimiento miceliar en este extracto bajo luz fluorescente a 24 C durante 72 hrs (Tabla 2); estos resultados son seme

Tabla 1.- Condiciones de luz y temperatura en la que se experimentó la formación de esporangios en condiciones estériles.

Condiciones experimentales	$\bar{x}$ de esporangios producidos por disco de 1 cm de diámetro.
Luz fría fluorescente y 24 C durante 72 horas.	137
12 hrs luz fría fluorescente 12 oscuridad a temperatura ambiente	30
Oscuridad permanente a 24 C	30
12 hrs luz natural, 12 hrs oscuridad a temperatura ambiente	4



jantes a los obtenidos por Merlich 1935; Zentmyer y Marschall 1959; Bryan 1965, Dolan, Cohen y Coffey, 1986, quienes además mencionan la presencia de microorganismos responsables de la estimulación a la producción de esporangios.

La actividad metabólica de las bacterias del suelo de la familia Pseudomonacea y sustancias químicas, producto de la población microbiana se ha consignado como responsable de la estimulación a la producción de esporangios. (Waterhouse, 1963; Bryan, 1965 citados por Donald y Frank 1985). Sin embargo el uso de extracto de suelo no es confiable para trabajos de infectividad ya que el inóculo llevaría además de esporangios, otros microorganismos del suelo.

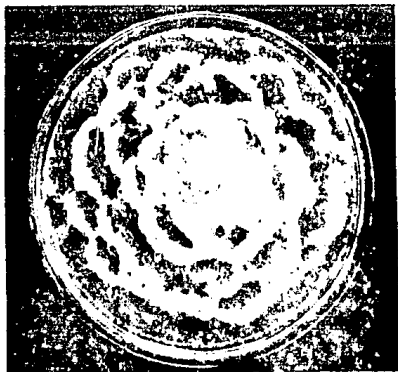
La contaminación por bacterias y protozoarios de extracto de suelo en asociación con esporangios y oosporas de *P. cinnamomi* fue informada por Donald y Frank (1985).

Shels *et al* 1977, citados por Donald y Frank, 1985, observaron, a nivel de laboratorio, hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* parasitando hifas y oosporas de *P. cinnamomi* en medio de cultivo. Baker y Cook (1974), menciona que hongos de estos géneros influyen en forma determinante en algunas especies de *Phytophthora* inhibiendo fuertemente la longevidad, actividad y tasa de desarrollo del micelio y otros propágulos del hongo.

Tabla 2.- Condiciones de luz y temperatura en las que se experimentó la formación de esporangios en suelo no estéril.

Condiciones experimentales	$\bar{x}$ de esporangios producidos, disco de 1 - cm de diámetro
Luz fría fluorescente a 24 C durante 72 horas	240
12 hrs luz fría fluorescente 12 oscuridad a temperatura ambiente	25
Oscuridad permanente a 24 C	30
12 hrs luz natural, 12 hrs oscuridad	20

A



B

48



C



D



E



Figura 6. Estructura de la pared celular de *Aspergillus niger* en el medio de cultivo. A. Estructura de la pared celular en un medio de cultivo toruloso. B. Estructura de la pared celular en un medio de cultivo de esporangios desarticulados. C. Estructura de la pared celular en un medio de cultivo de esporangios desarticulados. D. Estructura de la pared celular en un medio de cultivo de esporangios desarticulados. E. Estructura de la pared celular en un medio de cultivo de esporangios desarticulados.

Por otra parte la producción de esporangios en condiciones de cultivo axénico requiere de aspesia, sin embargo -- asegura la infección de *P. cinnamomi* por lo que en este trabajo se eligió este método para realizar las inoculaciones.

La mayor liberación de zoosporas se obtuvo lavando los discos tres veces con agua deionizada estéril, sometiéndolos a 10 C durante 15 minutos y retornándolos a oscuridad a 24 C durante una hora.

#### 5.1.2. Obtención de inóculo miceliar.

La producción de micelio fue mayor en semillas de trigo que en semillas de avena en la cuales, la invasión por micelio fue más lenta. Esta forma de incrementar el inóculo -- fue basada en la metodología utilizada por Benson y Cochran - (1980) quienes utilizaron semillas de avena para incrementar el inóculo miceliar y Wong *et al*, 1986 que utilizaron semillas de mijo; otros investigadores han obtenido micelio en -- cultivo líquido (Cho, 1981; Standish *et al*, 1982) y otros han empleado macerados de cultivo como inóculo miceliar (Kuan y - Erwin, 1980).

En este trabajo utilizó el método mencionado evitando la posible formación de esporangios en el medio de cultivo líquido.

### 5.1.3. Obtención de inóculo clamidosporial.

La obtención de clamidosporas se obtuvo a los 15 días de incubar suelo infestado con discos de medio de cultivo de *P. cinnamomi*. Se obtuvieron 19 propágulos por gramo de suelo, lo cual contrasta con lo obtenido por Franco (1983) quien bajo las mismas condiciones obtuvo 3,000 propágulos por g de suelo, lo que indica que hay que asegurarse de la cantidad de clamidosporas producidas en cada matraz.

## 5.2. Pruebas de patogenicidad.

### 5.2.1. Con zoosporas.

En general las plantas de dos a seis meses de edad inoculadas con zoosporas desarrollaron síntomas de enfermedad en un tiempo corto, las primeras plantas enfermas aparecieron a los dos días después de la inoculación, diez días después había un 88% de plantas enfermas y 15 días después un 50% de plantas muertas. Las plantas de un año de edad no mostraron síntomas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Dawson y Weste (1984) quienes también observaron síntomas de enfermedad 15 días después de inocular plantas de eucalipto de dos meses de edad con zoosporas de *P. cinnamomi*. Aragaki (1975) obtuvo 100% de mortalidad cuatro días después de haber inoculado plantas de trébol (*Tripholium* sp.) con esporangios de *P. palmívora*.

Ramírez y Mitchell (1975), obtuvieron 80% de infección y 40% de mortalidad al inocular plantas de papaya (*Carica papaya*) de 15 días de edad con 100,000 zoosporas de *P. palmívora*, - Ranwicher y Mitchell (1981) obtuvieron 95% de infección después de dos meses y medio de inocular plantas de tabaco (*Nicotiana tabaco*) de un mes de edad con 3,000 zoosporas de *P. parasítica*. Cho (1981) obtuvo infección con 1000 zoosporas de *P. cinnamomi* por planta de *Banksia speciosa* de un año de edad.

En general la mayoría de los autores coinciden en observar infección en un tiempo corto entre cuatro y 15 días -- después de la inoculación con zoosporas, lo cual también se observa en los resultados de este trabajo, con lo cual podemos decir que el inóculo zoospórico fue realmente efectivo para producir infección en un tiempo corto, lo que es atribuido a la virulencia de *P. cinnamomi* la cual está determinada en gran parte por la producción de esporangios, los cuales tienen la capacidad de incrementar en un tiempo relativamente -- corto la densidad de inóculo por la producción de zoosporas - (Zentmyer, 1980; Hwang y Ko 1978; Hoitink *et al.* 1974, Zentmyer y Brighan, 1956).

La eficiencia para la infección de las zoosporas se ha atribuido también a su movilidad en el agua y al fenómeno de atracción de zoosporas a la región de elongación sobre las pequeñas raíces de absorción (quimiotaxia), característica co-

mún de varios pytiaceos (Hendrich y Cambell, 1973). Esta atracción es atribuida a la presencia de aminoácidos contenidos en los exudados radicales quienes se producen en mayor cantidad si el suelo antes de la inoculación está saturado. El aumento de la conductividad eléctrica de los exudados radicales dañan la superficie de la raíz, lo que favorece la penetración del hongo (Chen y Zentmyer, 1973; citados por Kuan y Erwin, 1980).

Por otra parte se menciona que las condiciones anaeróbicas causadas por la saturación de agua pueden ocasionar acumulación de etanol, el cual en exceso tiene un efecto destructivo sobre las membranas celulares (Kiyosawa, citado por Kuan y Erwin 1980). Se ha reportado también que el etanol atrae zoosporas (Allen y Nowhook, 1873), lo cual pudo haber ocurrido en este trabajo ya que se mantuvo el riego a saturación; Pfender et al 1977 y Diniway (1977) mencionan que las poblaciones de *P. cinnamomi* y la severidad de la enfermedad aumentan al incrementar los potenciales de agua.

En este trabajo se obtuvieron porcentajes muy altos de mortalidad al inocular con zoosporas en contraste con los obtenidos cuando se inoculó con micelio y clamidosporas. Sin embargo no se puede afirmar que el inóculo zoospórico sea el más eficiente, debido a que no se homogeneizó el número de propágulos entre los tres tipos de inóculo. En este trabajo

se utilizaron altas concentraciones de zoosporas en contraste con otros investigadores que han utilizado una menor cantidad de éstas, lo cual pudo haber influido para obtener mayor porcentaje de infección con éstas. Al respecto se han realizado trabajos en donde se menciona la importancia de la densidad de inóculo y su relación con el grado de enfermedad y la muerte causada. Blaker y Mc Donald, 1981; Kenerley y Cho 1981 -- coinciden en mencionar que al aumentar la dosis de zoosporas aumenta la severidad de la enfermedad.

Ramírez y Mitchell 1975 observan 10% de infección y 0% de mortalidad cuando inocularon con 1000 zoosporas por planta y 90% infección, y 40% de mortalidad cuando utilizaron 100,000 zoosporas por planta de papaya (*Carica papaya*) de 15 días de edad. Mitchell et al (1978), mencionan 50% de infección cuando inocularon con 250 zoosporas de *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora criptogea* y *Pythium ostracodes* por planta de tomate, trébol y algodón, respectivamente.

A pesar de que las zoosporas sean consideradas como inóculo eficiente (Zentmyer 1980) para producir infección y muerte, inocular con éstas tiene sus inconvenientes, ya que en primer lugar existen problemas para inducir la formación de esporangios quienes producen las zoosporas, además de que la duración de la movilidad de éstas es muy corta al igual que su sobrevivencia, por lo que si se desea trabajar con és-



tas se debe contar con una metodología segura para producir estas estructuras, además las inoculaciones se deben hacer de masiado rápido, evitando así el enquistamiento de las zoosporas. Hickman (1970) citado por Zentmyer 1980 y Mitchell et al 1978, asumen que las zoosporas raramente producen infección después del enquistamiento.

### 5.2.2. Con micelio.

Las plantas de dos y seis meses de edad presentaron -- síntomas de enfermedad al tercer día después de la inoculación con micelio, observándose diez días después un 63 y 75% de plantas enfermas respectivamente y cinco días después un 37.5 y 12.5% de mortalidad, 15 días después de la inoculación se obtuvo menos porcentaje de mortalidad con micelio, en comparación con zoosporas, lo cual concuerda con los resultados de Benson y Cochran (1980) quienes obtuvieron 33% de mortalidad, cuatro meses después de haber inoculado con micelio para evaluar resistencia en azaleas (*Rhododendron* spp) a *P. clandestina*, Wong et al obtuvieron 40% de infección a las dos semanas después de haber inoculado trébol (*Tripholium subterraneum*) con micelio de *P. clandestina* incrementado en semillas de mijo (*Panicum miliaceum* L.).

Las plantas testigo no presentaron síntomas de enfermedad y las plantas de un año de edad no presentaron síntomas -

hasta los 90 días después de la inoculación. Uno de los inconvenientes de usar este tipo de inóculo es que no se puede determinar la cantidad de propágulos con los que se esté inoculando, además de que no se puede asegurar que el inóculo só lo sea micelio ya que puede ir acompañado de clamidosporas; lo cual posiblemente explica la existencia de pocos trabajos en los que se haya usado este tipo de inóculo.

### 5.2.3 Con clamidosporas.

El inóculo clamidosporal fue el que menos porcentaje de infección y mortalidad produjo en comparación con el inóculo zoospórico y con el micelio. En este caso se tardó más tiempo en presentar los primeros síntomas de la enfermedad. Hasta los 20 y 30 días se observó un 13% de plantas enfermas de dos y seis meses de edad, respectivamente y hasta después de tres meses se observó un 25% de plantas muertas de dos y seis meses de edad. Las plantas de un año de edad mostraron los primeros síntomas de enfermedad hasta los 90 días después de la inoculación.

Estos resultados contrastan con otros donde se ha utilizado este tipo de inóculo. Ramírez y Mitchell (1975) observaron 50 y 95% de infección, 45 días después de haber inoculado con 0.5 y 10 clamidosporas de *P. palmívora* por g de suelo a plantas de papaya (*Carica papaya* L.) de 15 días de edad; 75% de

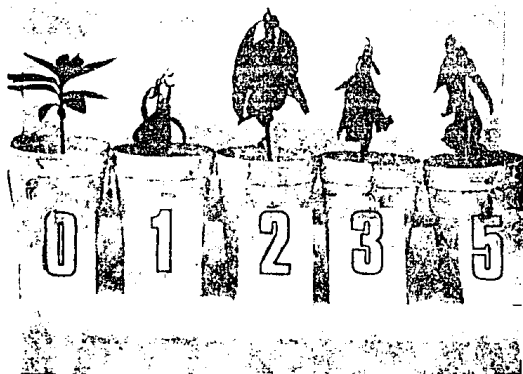
infección y 0% de mortalidad con una clamidospora por g de -- suelo y 100% de infección y 45% de mortalidad con 25 clamidosporas por g de suelo. Mitchell (1978) al relacionar densidades de inóculo de varias especies de *Phytophthora* y *Pythium* obtuvieron 50% de infección con 600 y 900 clamidosporas por kg de suelo inoculadas en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). Wanwicher (1981) obtuvo 50 y 100% de infección con 132 y 100 clamidosporas de *P. parasítica* por g de suelo, 45 días después de haber inoculado plántulas de tabaco (*Nicotiana tabaco*) de un -- mes de edad. Franco (1983) observó infección después de haber inoculado plantas de aguacate *Persea americana* Mill., de un mes de edad con 3,000 clamidosporas de los diferentes phythiaceos encontrados.

Estos autores coinciden en reportar un mayor tiempo de infección y muerte en comparación con otros autores, quienes inocularon con zoosporas, lo cual coincide con nuestros resultados.

La falta de efectividad para producir enfermedad o -- muerte con inóculo clamidosporial en nuestro caso, quizá se deba a que la cantidad de propágulos por g de suelo (19) no -- fue suficiente bajo las condiciones del presente trabajo.

Los análisis estadísticos Kruskal y Wallis ( $p=0.05$ ) y el análisis de varianza ( $p=0.05$ ) indicaron la existencia de --

A



B

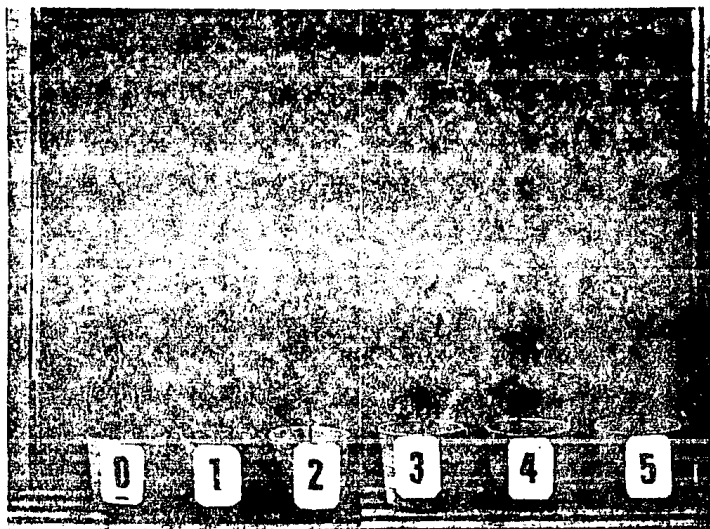


Figura 8. Plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) de dos meses de edad (A), y 6 meses de edad (B), inoculadas con *P. cinnamomi* usando una escala ordinal donde 0=planta sana, 1=marchitez incipiente, 2=marchitez, 3=marchitez avanzada, 4=defoliación y 5=muerte.

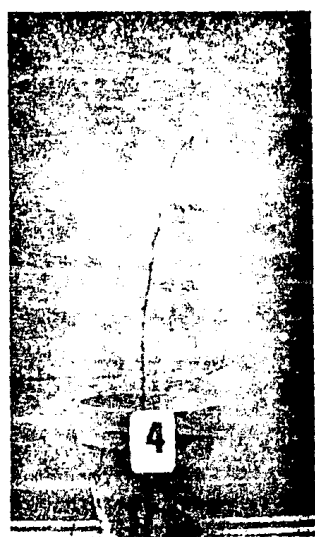
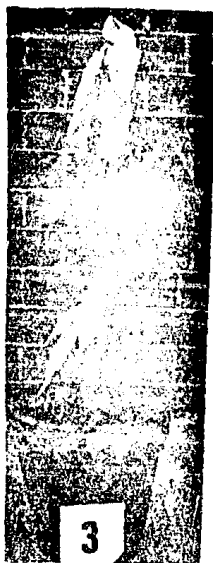
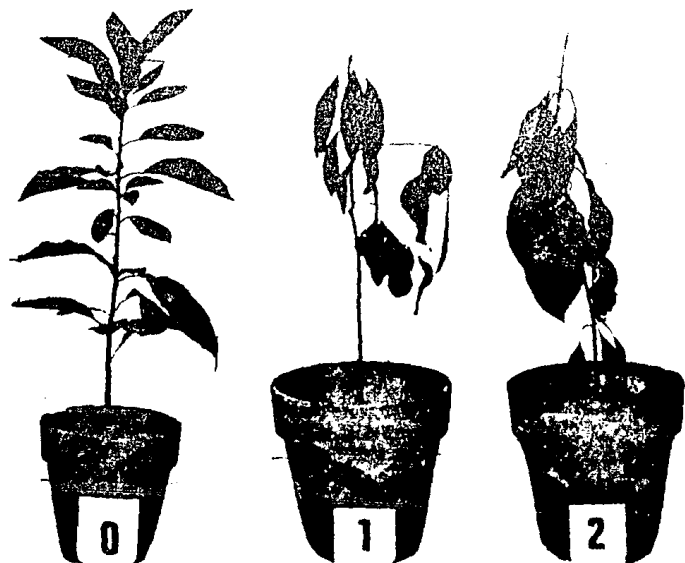


Figura 9. Plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) de 12 meses de edad inoculadas con *P. cinnamomi* evaluadas usando una escala ordinal donde 0=planta sana, 1=marchitez incipiente, 2=marchitez, 3=marchitez avanzada, 4=defoliación y 5=muerte.

diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, en cada una de las cuatro fechas de evaluación estadística en cada edad. Estas pruebas apoyan los resultados observados. La comparación múltiple entre tratamientos ( $p=0.05$ ) y la prueba de Tukey ( $p=0.05$ ) mostraron que en general, para la primera y segunda evaluación los tratamientos con mayor efectividad en la expresión de enfermedad fueron el zoospórico y el miceliar, para las tres edades probadas (Figura 10).

Para la tercera evaluación se modificó esta tendencia. Se observó diferente comportamiento de los tratamientos en cada una de las edades (Figura 11).

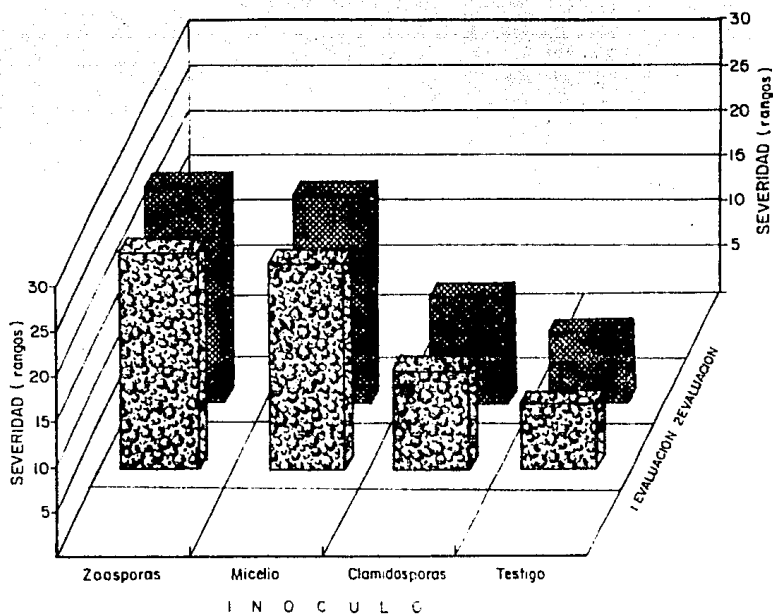


FIGURA 10.

Severidad de marchitez de plantas de aguacate evaluadas a los 30 y 60 días después de inoculadas con diferentes tipos de inóculo de *Pytophthora cinnamomi*

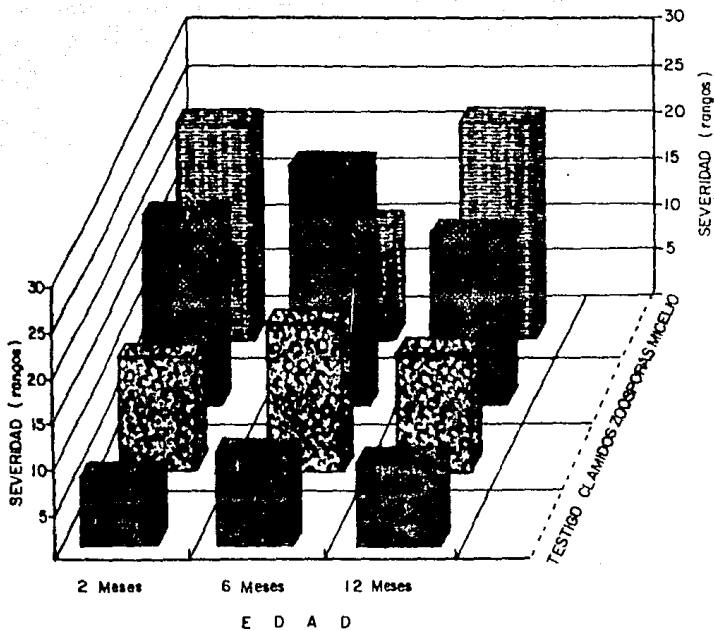


FIGURA 11

Severidad de marchitez de plantas de aguacate de diferentes edades evaluadas a los 90 días después de inoculadas con *Pythophthora cinnamomi*.



En las plantas de dos y 12 meses de edad los "mejores" tratamientos fueron zoosporas y micelio para las de seis meses el de zoosporas, aún cuando se observó una tendencia hacia el decremento de la enfermedad. No se efectuó análisis estadístico para respaldar estadísticamente la interacción observada entre edad-tratamiento, puesto que el avance de la enfermedad en cada edad fue diferente, conduciendo de la marchitez avanzada a la muerte en plantas de dos meses de edad y en las de seis y doce meses a la defoliación. Lo que no se esperaba en el momento de optar por la escala utilizada.

En la cuarta evaluación la escala se homogeneizó entre las edades, lo que permitió realizar un análisis de varianza en parcelas divididas ( $p=0.05$ ) con transformaciones a rangos, lo que indicó interacción edad-tratamiento (Figura 12), lo cual quiere decir que a mayor edad de las plantas mayor resistencia de las mismas.

### 5.3. Comportamiento de las diferentes edades estudiadas.

El análisis de resultados, según la edad de las plantas inoculadas, nos muestran que los mejores tratamientos fueron zoosporas y micelio. Para las plantas de dos meses de edad, sin diferencias estadísticamente significativas, el micelio mostró una tasa de infección y mortalidad más rápida que las zoosporas; aunque éstas mostraron mayor efectividad -

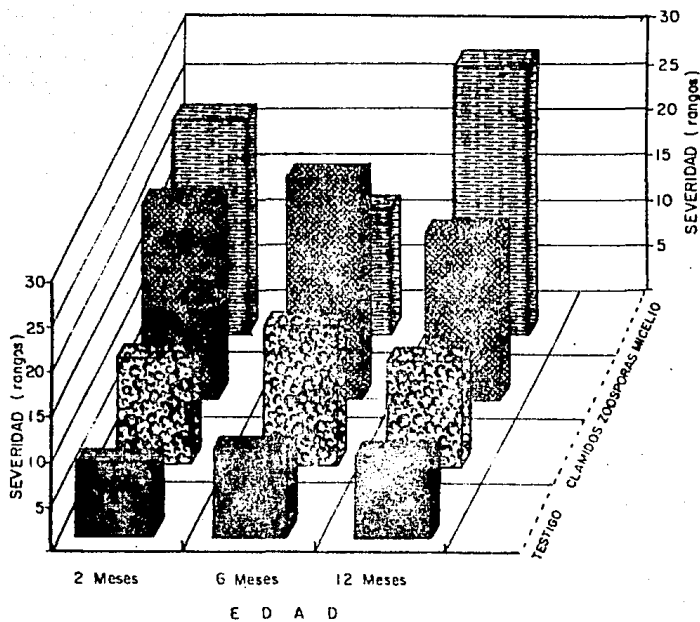


FIGURA 12.

Comportamiento de los tratamientos para cada edad de plantas de aguacate a los 120 días después de inoculadas con *Pytophthora cinnamomi*.

en el desarrollo inicial de la infección (primera evaluación) (Figura 13-A).

Para las plantas de seis meses de edad aunque las zoosporas y micelio fueron eficientes en un principio, no tuvieron un efecto sostenido en el incremento de la enfermedad (Figura 13-B) este efecto fue más marcado con el inóculo micelial, donde la severidad decreció hasta observarse la recuperación de la mayoría de las plantas tratadas, y con una apariencia similar a las tratadas con clamidosporas y las testigo. Se obtuvo mayor número de plantas recuperadas en las inoculadas con micelio que con zoosporas. Las clamidosporas mostraron poca infectividad en el desarrollo de los síntomas, -- sin embargo, mostraron una tasa de infección aunque lenta, -- sostenida en el tiempo.

Para las plantas de doce meses de edad, aunque el micelio mostró una tendencia hacia el decremento de la severidad (Figura 13-C), fue superior a las zoosporas sólo durante las primeras tres evaluaciones, finalmente las zoosporas indujeron mayor severidad. Las clamidosporas mostraron menor eficiencia en la inducción de síntomas.

En general, para las tres edades estudiadas, el tratamiento con mayor eficiencia en producir infección y enfermedad fue el de zoosporas 68% seguido por el micelio 47%. Las

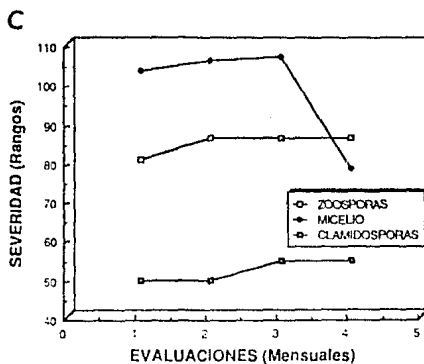
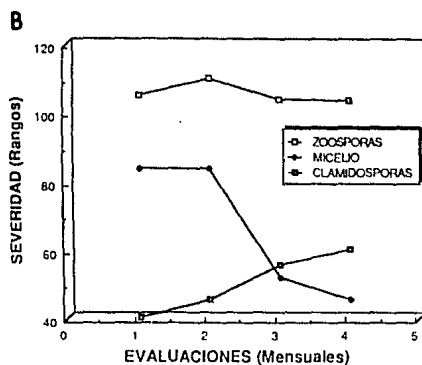
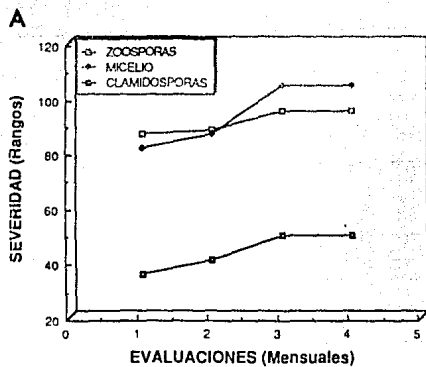


Figura 13. Comportamiento de la severidad de marchitez con los diferentes tipos de inoculo en plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) de dos (A), seis (B), y doce meses de edad (C).

clamidosporas mostraron eficiencia mínima. Las plantas de un año de edad, mostraron síntomas de enfermedad hasta los 90 días después de la inoculación.

## 6. Conclusiones.

Cualquier tipo de inóculo puede ser bueno según los objetivos y condiciones del trabajo a realizar. Para trabajos en donde prueban resistencia se han utilizado zoosporas como inóculo (Aragaki, 1975; Zilberstein y Pinkas, 1987; Zentmyer, 1980), debido a su eficiencia para producir infección. Sin embargo un inconveniente de inocular con éstas es que, dependiendo de la densidad de inóculo, puede haber demasiada presión de selección Tsao 1989 (comunicación personal) recomendó para la búsqueda de materiales resistentes, inocular el material con suelo infestado naturalmente (4 a 5 propágulos por g de suelo), aumentando gradualmente este inóculo, ya que las poblaciones de *Phytophthora* son raramente mayores a cinco propágulos por g de suelo. Para trabajos ecológicos recomienda inocular con clamidosporas debido a que con éste tipo de inóculo, el desarrollo de la enfermedad es más lento (como se observó en este trabajo) por lo que puede ser útil para estudios de protección cruzada sugeridos por Rodríguez y García - 1983, quienes encontraron cierta relación antagónica entre *P. cinnamomi* y otros pythiaceos en la dinámica radical del hospedero. Para este mismo fin también se puede utilizar el mi-

celio, aunque no se aconseja ya que no se puede saber la cantidad de propágulos por g de suelo que se esté inoculando. - Sin embargo para probar patogenicidad e infección puede ser bueno.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexopoulos, C. J. and Charles W.M. 1979. Introductory Mycology. 3a. edición. Wile. New York. 632 pp.
- Aragaki, M. 1975. A papaya seedling assay for Phytophthora root resistance. Plant Disease Reporter. 59:538-540.
- Anónimo. 1978. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. D.G.E.A. S.A.R.G. 35- 53 pp
- Baker, K.F., and Cook, R.J. 1974. Biological control of Plant Pathogens. W. H. Freeman. San Francisco. 433 pp.
- Enson, D.M., and Cochran, F.E. 1980. Resistance of evergreen hybrid azaleas to root rot caused by Phytophthora cinnamomi. Plant Disease 4:214-215.
- Blaker, N.S., and Mac Donald, J. D. 1981. Predisposing of soil moisture extremes on the susceptibility of Rorodendron of Phytophthora root and crown rot. Phytopatology 71: 831-834.
- Campbell, W.A. and Hendrix, F.F. Jr. 1967. Pythium y Phytophthora. Population in southern forest tree nurseries. Phytopatology 57: 457. (abstr.)
- Chen D.W. and Zentmyer, G.A. 1970. Production of sporangia by Phytophthora cinnamomi in axenic culture. Micologia 62: 397-401
- Cho J.J. 1981. Phytophthora root rot of banksia: Host range and chemical control. Plant Disease 65:820-823.
- Coffey, M. D. Orr, H.D., Campbell, S.D. and Guillemet, F.B. 1984. Chemical control of Phytophthora cinnamomi on avocado root stocks Plant Disease 68:820- 823.
- Dawson, P., and Weste. G. 1984. Impact of root infection by Phytophthora cinnamomi on the water relations of two eucaliptus species that differ in susceptibility Phytopatology 74: 486-490.
- De la Torre, V.J.D. 1984. Guía para cultivar aguacate en el bajo. S.A.R.H. Celaya, Gto., México. Folleto para productores No.10 26 pp
- Dolan, T.E. and Coffey, M.D. 1986. Laboratory screening technique for assessing resistance of four avocado rootstocks to Phytophthora cinnamomi. Plant Disease 70:115-118.
- Donald, M.H. and Frank, H.A. 1965. Introduction of aseptic sporangial formation in Phytophthora cinnamomi by metabolic defusates of soil microorganisms, Nature 206: 673-674
- Dunaway, J.M. 1977. Predisposing effect of water or water stress on the severity of Phytophthora root rot in safflower. Phytopatology 67: 884-889.
- Erwin, D.C., Bernicki, García and Isao P. 1983. Phytophthora, it's Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. The American Phytopathological Society. 392 pp.

- Franco, F.E. 1983 Dinámica de la población de Meloidogine sp bajo distintos manejos del agroecosistema del aguacatero (Persea americana Mill.) y patogenicidad de Fythyum spp a éste frutal tesis de maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 62 pp.
- F.A.O. 1985 Production Yearbook 39:198-199.
- Fuente I.N.E.G.I. 1987.
- Gallegos, G. R. 1983. Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacan. U.A.C.H. Chapingo, México. 317pp.
- Gregoriow, C., and Rajkumar, 1984 Effects of irrigation and mulching on shoot and root growth of avocado (Persea americana Mill.) man go (Manguifera indica) J. Hortsci 59: 109-117
- Griffin, H.D. 1972 Ecology of Soil Fungi Syracuse Univ. Press: Syracuse, N.Y. 193 pp.
- Harvey, J.V. 1945. Fungi associated with decline of avocado and citrus in California. Plant Disease Repr. 29:110-113.
- Hendrix, F. F. Jr. and Campbell, W. A. 1973 Pythium, as plant pathogens Ann Rev. Phytopathology 63: 77-78.
- Hine, R.B., Alaban, C, and Klemmer, H. 1964. Influence of soil temperature on root and heart rot of pineapple cause by Phytophthora cinnamomi and Phytophthora parasitica Phytopathology 54: 1287-1289.
- Hoitink, H.A.J., and Schittner, 1974. Resistance of Rhododendron species and hybrids to Phytophthora root rot. Plant. Disease. Rep. 58: 650-653
- Hollander, H. and Walfe, D.A. 1973. Nonparametric Statistical Methods Ed. J. Wiley and Sons, New York. 151-158.
- Horne, W.T. 1934. Avocado disease in California Univ. Calif. Agric. Exp. Stn. Bull 585. 72 pp.
- Hwang, S.C., and Ko, W.H. 1975. A simplified method for sporangial production by Phytophthora cinnamomi. Micological 67:1233-1234.
- Hwang, S.C. and Ko 1978. Biology of clamadospores, sporangia and zoospores of Phytophthora cinnamomi in soil Phytopathology 68:726-731.
- Jeffers S.N and Marin, S.B. 1986. Comparison of two media selective for Phytophthora and Fythyum species. Plant Diseases. 70:1042-1083.
- Kanwicher, M.E., and Mitchell, D.J. 1981. Relationships of numbers of spores of Phytophthora parasitica var. nicotiana to infection and mortality of tobacco. Phytopathology 71:69-73.
- Kenerley, C. M., Papke, and Eruck, R. 1984. Development of Phytophthora root rot in trees. Phytopathology

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- Kuan, T. L. and Erwin, D. C. 1980. Predisposition effect of water saturation of soil on Phytophthora root rot alfalfa. Phytopathology 70:981-986.
- Leonien, L.H. 1934. Identification of Phytophthora species, W. Va. Univ. Agric. Exp. Stn. Bull. 262. 36 pp.
- Lepik, E. E. 1970. Gene centers of plant as sources of disease resistance. Ann. Rev. Phytopath. 8: 323-344.
- Manning, W.J., and Crossan, D. F. 1966. Variation in degree of pathogenicity of isolates of Phytophthora cinnamomi to cultivars of taxus. Plant Disease Rep. 50: 84-87.
- Mircetich, S., and Matheron, M. E. 1976. Phytophthora root and crown rot of cherry trees. Phytopathology. 66: 549-558.
- Mitchell, D.J., Kenwiche, M. E., and Moore, E. S. 1978. Relationship of numbers of zoospores of Phytophthora cryptozoea to infection and mortality of watercress. Phytopathology. 68: 1446-1448.
- Morales, G. L. 1988. Las enfermedades radicales en el estado de Michoacán.
- Morales, N. 1985. Transformaciones a rangos en diseño parcelas divididas. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados Chapingo, México.
- Mosqueda, V. R. 1981. Situación actual de la utilización de germoplasma y mejoramiento genético de los frutales tropicales y subtropicales de México. Los Baños, Filipinas. 15 p.
- Nesbitt, H. J., Malajczuk, N., and Glenn, A. R. 1979. Effect of soil moisture and temperature on the survival of Phytophthora cinnamomi in soil. Biol. Biochem. 11: 137-140.
- Pfender, W. F., Hine R. B., and Stanghellini, M. E. 1977. Production of sporangia and release of zoospores by Phytophthora megasperma in soil. Phytopathology 67: 657-663.
- Pfender, W. F., and Hagedorn, D. J. 1982. Comparative virulence of Eublenomyces autriches f. sp. and Pythium ultimum on Phaseolus vulgaris at naturally occurring inoculum levels. Phytopathology 72: 1200-1204.
- Ramirez, B. N., and Mitchell, P. J. 1975. Relationship of density of chlamydospores and zoospores of Phytophthora palmivora in soil to infection of papaya. Phytopathology 65: 780-785.
- Reeves, R. J. 1975. Behavior of Phytophthora cinnamomi Rands in different soil and water regimes. Soil. Biochem 7: 18-24.
- Rodríguez, P. y García, R. 1986. Ecología de la enfermedad "tristeza del aguacatero", bajo manejo integrado experimental del cultivo del aguacate, en la región de Atlixco, Puebla. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 118 pp.

- Said, I. G., y Sarate de Lara, G. P. 1988. Metodos estadísticos 3a. edicion. Trillas. 643 pp.
- Salazar, G. A. 1969. Variabilidad en Phytophthora cinnamomi causante de la tristeza del aguacatero. Tesis de maestria en ciencias. Fitopatología. Chapingo, México.
- Sanches, S. C. 1987. Current status of avocado growing in México California Avocado Society Yearbook 71: 157-163.
- Siegel, S. 1972. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. 2a. ed. México. Trillas, 1972, 344pp.
- Smith, C. E. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. Economic Bot. 20: 169-175.
- Standish, E. D., Mc Donald, J. D., and Humphrey, W. A. 1982. Phytophthora root and crown rot of Junipers in California. Plant Disease 66: 925-928.
- Téliz, D., y García, R. 1982. Manejo integrado de la tristeza del aguacatero X Congreso Nacional de Fitopatología de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa. México.
- Wong, D. H., Sivasthamparam, K., and Barbetti. 1986. Influence of soil temperature moisture and other fungal root pathogens of pathogenicity of Phytophthora clandestina to subterranean clover. Trans. Br. Mycol. Soc. 86.
- Zentmyer, G. A. 1951. Avocado diseases, Calif. Avocado Soc. Yearb. 7:103-106.
- Zentmyer, G. A. 1961. Collection for Phytophthora root rot resistance in México and the Caribbean. Cal. Avocado. Soc. Yearb. 45: 59-62.
- Zentmyer, G. A. 1980. Phytophthora cinnamomi and diseases it causes Phytopathological Monograph. 10, Am. Phytopathol. Soc. St. Paul M. N. 96 pp.
- Zentmyer, G. A. 1981. The effect of temperature on growth and pathogenesis of Phytophthora cinnamomi on growth of its avocado host. Phytopathology 71: 925-928.
- Zentmyer, G. A. 1981. Avocado diseases in Latin American Plant Diseases Repr. 43: 129.
- Zentmyer, G. A. 1985. Origin and distribution of Phytophthora cinnamomi Calif. Avocado Society Yearbook. 69: 89-94.
- Zentmyer, G. A., and Richards, S. J. 1952. Pathogenicity of Phytophthora cinnamomi to avocado trees and the effect irrigation on disease development. Phytopathology 42: 35-37.
- Zentmyer, G. A., and Brigham, F. T. 1956. The influence of nitrite on the development of Phytophthora root rot of avocado. Phytopathology 46: 121-124.

- Zentmyer, G. A., and Marshall. 1959. Factors affecting sporangial production by Phytophthora cinnamomi (Abst.) Phytopathology 49: 556.
- Zentmyer, G. A., and Mircetich, S. M. 1966. Saprophytism and resistance in soil by Phytophthora cinnamomi. Phytopathology 56: 710-712.
- Zentmyer, G. A., and Ribeiro, D. E. 1977. The effect of visible and near-visible radiation sporangium production by Phytophthora cinnamomi. Phytopathology. 67: 91-95.
- Zentmyer, G. A., and Guillemet, F. B. 1981. evidence for strains of Phytophthora cinnamomi. Plant disease. 65:475-477.
- Zilberstein, H., and Pinkas, Y. 1987. Detached root inoculation a new method to evaluate resistance to Phytophthora root in rot avocado trees. Phytopathology 77: 841-844.