

Identificación Genética y Resistencia al Patógeno Asociado a la Marchitez del Aguacate (*Persea americana* Mill) en Localidades de Guatemala.

Glenda Edelmira Pérez García¹, Joseline Karina Colop Velásquez³, Luz de María Montejo Domínguez²

Abstract

RESUMEN

La marchitez, conocida como tristeza del aguacate (*Persea americana* Mill), se le atribuye comunmente a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Esta enfermedad causa decaimiento paulatino de la planta y una marchitez generalizada por la infección de raíces, ocasionando la pérdida de plantas en vivero y plantaciones en producción. En Guatemala, se ha reportado la enfermedad en la mayoría de las zonas productoras de aguacate, y hasta la fecha la información acerca de la diversidad genética del o de los agentes causales es limitada. Por lo tanto los objetivos fueron aislar e identificar genéticamente el patógeno asociado a la pudrición radicular del aguacate; así mismo, realizar pruebas de patogenicidad en porta-injertos criollos. En 2019, se colectaron muestras de suelo con raíces de aguacate de plantaciones enfermas, y colecta de semilla de plantas madre de cinco ecotipos de aguacate criollo, en tres localidades: San Marcos, Quetzaltenango y Retalhuleu. Como resultado, se obtuvieron cinco aislamientos identificados morfológica y genéticamente como *Mortierella alpina*, en un 99 % de similitud. Mediante inoculación al tallo, se determinó la resistencia de los ecotipos, donde el ecotipo de aguacate ICTA-EI Rincón IV presentó 15.42 % del area bajo curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), seguido de ICTA-Cabricán XVII e ICTA-Santa María V con 39.16 % y 26.63 % CPE, respectivamente. El testigo Hass presentó 99.33% de ABCPE. Basado en lo anterior, se demuestra que hay distintos hongos causantes de la pudrición radicular del aguacate, que se activarán de acuerdo al espacio y condiciones climáticas. En ese sentido ICTA-EI Rincón IV presentó resistencia a la inoculación de *Mortierella alpina*, y se recomienda su evaluación con otras cepas de patógenos asociados a la pudrición radicular, para considerarlo como posible portainjerto para la región occidental.

Palabras clave: Identificación, patógeno, asociado, tolerancia, aguacate.

The avocado wilt, well known as the sadness of avocado (*Persea americana* Mill), is commonly attributed to be caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. This disease causes the gradual decay of the plant and generalized wilting due to root infection, causing the loss of plants in nursery and plants in production. In Guatemala, the disease has been reported in most avocado-producing areas, and to-date information about the genetic diversity of the causative agent(s) is limited. Therefore, the objectives of the study were to isolate and genetically identify the pathogen associated with avocado root rot; likewise, carry out pathogenicity tests on native avocado rootstock. In 2019, soil samples were collected with avocado roots from diseased plantations, and seed collections from mother plants of five ecotypes of native avocado, from three locations: San Marcos, Quetzaltenango, and Retalhuleu. As a result, five isolates were obtained, and morphologically and genetically identified as *Mortierella alpina*, with 99% similarity. Resistance was evaluated by using stem inoculation, where ICTA-EI Rincón IV avocado ecotype presented 15.42% of the area under the disease progress curve (AUDPC), followed by ICTA-Cabricán XVII and ICTA-Santa María V, with 39.16% and 26.63%, respectively. The check, Hass, presented 99.33% ABCPE. Based on that, it is shown that different fungi can cause avocado root rot, which will be activated according to space and climatic conditions. In that sense, ICTA-EI Rincón IV presented resistance to evaluated strain of *Mortierella alpina*, and its evaluation with other strains of pathogens associated with root rot is recommended, to consider it as a possible rootstock for the western region of Guatemala.

Key words: Identification, pathogen, associated, tolerance, avocado.

¹Ingeniera agrónoma, Investigadora especializada en Protección Vegetal en el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), Guatemala. Glendaperez@icta.gob.gt.

³ Tesista de la Carrera de Ingeniería Agronómica en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad San Carlos de Guatemala (USAC).

² MSc en Ciencias de las Plantas, Coordinadora del Programa de Protección Vegetal , ICTA, Guatemala.

INTRODUCCIÓN

En el análisis de la cadena de aguacate realizado por el Consorcio Regional de Investigación Agropecuaria del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-CRIA) en Guatemala (2016), el cultivo de aguacate presenta diversos problemas de producción, entre ellos la enfermedad radicular conocida como tristeza del aguacate. Esta limita la producción por la infección de plantas en vivero y árboles adultos en campo. Diferentes patógenos del suelo generan síntomas similares a pudrición radicular del aguacate, y por falta de diagnóstico precisos, se atribuye al Oomycete *Phytophthora cinamomi* como el único causal. Sin embargo, existen reportes de fitopatógenos aislado de raíz de aguacate como: *Cylindrocladium parasiticum*, *Phytophythium*, *Nectria liriodendri*, *Mortierella spp*, reportando este último, con más de 100 especies entre patógenos y contaminantes del suelo (Hernández, 2018).

Los hongos del suelo del género *Mortierella* pertenecen a la familia Mortierellaceae, dentro del orden *Mortierellales*, clasificado como Zigomicetos. Con una sola familia presentan más de 79 especies con cinco géneros, la mayoría de las especies son organismos acumuladores de lípidos. Según Rayaroth et al., (2017), estas especies presentan hifas cenocíticas con esporangio hialino y tiene un olor a cebolla o ajo. Las colonias tienden a ser blancas o blanquecinas y se caracteriza por tener un crecimiento en anillos. Se aíslan con frecuencia de suelos y rizosferas de plantas. De acuerdo con Hernández (2016), en búsqueda de microorganismos antagónicos aislaron *M. elongata* y *P. cinnamomi* e inocularon plantas con 5 hojas verdaderas, determinando que los síntomas fueron similares a la enfermedad conocida como tristeza del aguacate, siendo este el primer reporte en la región Mexicana.

Según Godínez, et al. (2000), esta enfermedad limita la producción de plantaciones establecidas debido a que no se cuenta con portainjertos de aguacate certificados o con resistencia al patógeno del suelo. Los portainjertos provienen del mercado local, que son ecotipos criollos de las diferentes regiones del país.

De acuerdo a lo anterior los objetivos del estudio fueron aislar e identificar genéticamente al patógeno causal, a través de la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal (ADNr); y realizar pruebas de

patogenicidad del hongo en porta injertos criollos de aguacate.

MÉTODOS, PROCEDIMIENTOS Y MATERIALES

Las diferentes actividades de aislamiento y moleculares se ejecutaron en las instalaciones del Laboratorio de Protección Vegetal, ICTA Labor Ovalle, Quetzaltenango. La fase de evaluación de tolerancia en plantas se llevó a cabo en un vivero particular que se ubicó en San Juan Ostuncalco, Quetzaltenango. La caracterización molecular se llevó a cabo por medio de secuenciación de ADN en el Laboratorio MACROGEN, Corea del Sur. El estudio se llevó a cabo durante el periodo de marzo del 2019, a abril del 2021. La fase de campo consistió en la colecta suelo con raíces de árboles enfermos, con síntomas de marchitez, en parcelas de productores; así mismo, se realizó colecta de semilla de las plantas madre de los ecotipos criollos seleccionadas por el Programa de Frutales de ICTA (2004). La colecta de las semillas se realizó según la época de fructificación de cada ecotipo seleccionado. La segunda fase consistió en el aislamiento e identificación genética del microorganismo asociado al síntoma de marchitez del aguacate. Luego, se incrementó el patógeno aislado para realizar las pruebas de resistencia en el invernadero.

Para la evaluación de resistencia de plantas para porta injertos se utilizó el diseño Bloques Completamente al Azar (BCA), con siete tratamientos y ocho repeticiones. Una planta conformó una unidad experimental. Se consideró la severidad como variable de respuesta. Para ello, se midió el ancho (cm) y largo (cm) de la lesión 15 días después de la inoculación, durante tres meses. Se determinó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC por sus siglas en ingles) (Shanner and Finney, 1977)

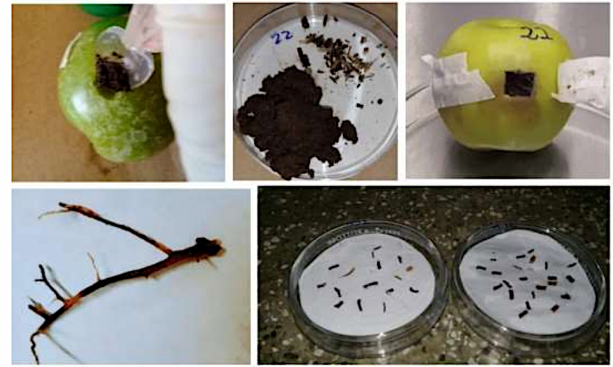
$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Las colectas de semilla de aguacate se realizaron en diferentes épocas, por la fecha de madurez fisiológica del fruto, fueron desinfectadas con metalaxil 25 %, se germinaron en macetas con sustrato peat moss. Al germinar las semillas se trasplantaron a bolsas con una mezcla de sustrato (tierra – arena – Peat Moss), previamente esterilizado. Las plantas se fertilizaron con nitrógeno, fosforo y potasio (15-15-15) cuando alcanzaron 12 cm de altura. Se realizó la segunda fertilización cuando alcanzaron 25 cm de altura, antes de la inoculación.

Para el aislamiento se utilizó un cultivo trampa, que fue la manzana verde. Las raicillas colectadas del aguacate, fueron seleccionadas al presentar síntomas de la enfermedad: necrosis leve y/o raíces con tono rojizo y se cortaron en segmentos 1-2 mm. Luego las raíces se desinfectaron y sembraron en el cultivo trampa. Las manzanas se colocaron en cámara húmeda durante 3-8 días. Después, los segmentos infectados de manzana se sembraron en dos medios de cultivo. Para el aislamiento y purificación del patógeno se utilizaron: Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Corn-Agar, con antibiótico específico para evitar el crecimiento de bacterias (Figura 1).

Figura 1 Aislamiento utilizando raíces y cultivo trampa.



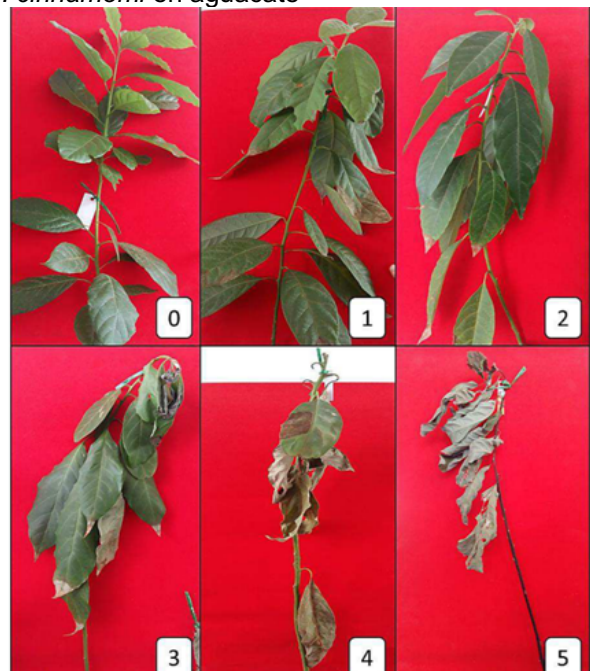
Posteriormente se realizó la identificación morfológica de las colonias de los aislamientos. Se seleccionaron las que presentaron un crecimiento arrosado, y micelio de color blanquecino (Gallo, *et al.*, 1990). Para la extracción de ADN se utilizó 0.1 gramos de micelio cultivado en medio líquido y macerado con nitrógeno. Para la extracción de ADN se utilizó el método convencional. Se colocó el micelio macerado en microtubo de 1.5 ml para luego cuantificar y determinar la pureza de ADN con un biofotómetro marca Eppendorf®. Se utilizaron el par de primers universales de ITS y EF para realizar el PCR y amplificar la región del genoma del patógeno, los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación.

Figura 2 Inoculación de *M. alpina* al tallo en cultivo de aguacate.



En cuanto a la inoculación por método del tallo en porta injertos de ecotipos criollos, se utilizaron plantas de aguacate a 25 cm de altura (6 meses de edad aproximadamente). Las plantas se inocularon colocando un plug de 1 cm de diámetro de PDA con el micelio del patógeno. Luego la herida se cubrió con película selladora (Parafilm®) (figura 2). Las plantas inoculadas se mantuvieron en oscuridad (vivero cubierto de nylon negro), controlando la temperatura entre 18°C - 25°C y 70% - 80 % de humedad. Se regaron las plantas cada dos a tres días. La herida del tallo se humedeció todos con atomizador y agua, todos los días hasta terminar el ensayo. A los 15 días posteriores a la inoculación se evaluó la severidad con un intervalo de 15 días, hasta cumplir tres meses utilizando la escala de figura 3.

Figura 3 Escala visual de incidencia a inoculación de *P. cinnamomi* en aguacate



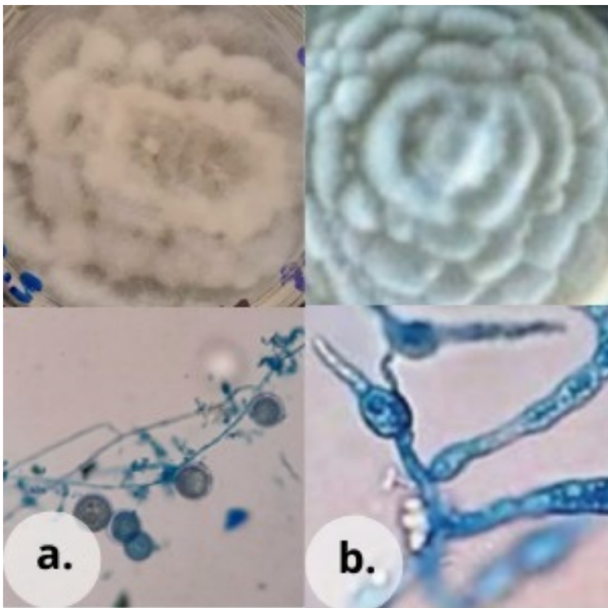
Fuente: Sánchez, 2018.

RESULTADOS

Aislamiento

Se colectaron 37 muestras de suelo con raíces y se aislaron exitosamente cinco cepas del patógeno de las muestras colectadas (figura 4). Estas son provenientes de campos de agricultores con plantas que presentaron síntomas de marchitez. De acuerdo con lo anterior, la utilización de cultivos trampa permite simplificar la técnica y aislar al patógeno en menor tiempo.

Figura 4 a y b Colonias y micelio del aislamiento invitro de *M. alpina*

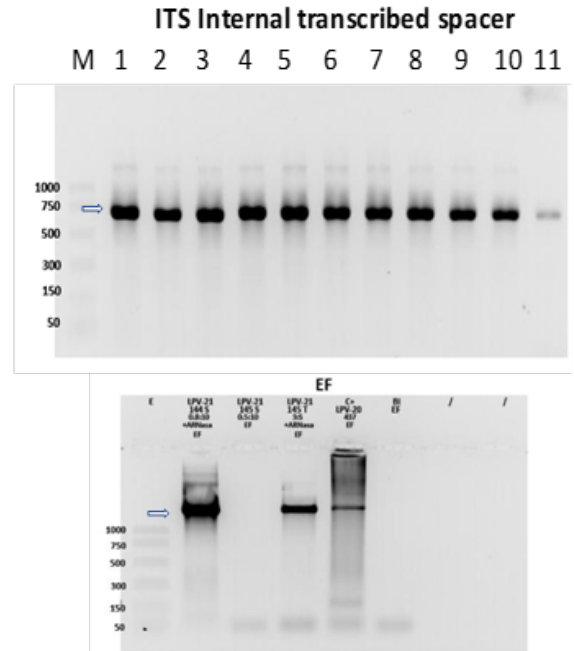


Identificación molecular

La amplificación de ADN se realizó con iniciadores universales para la región ITS, obtenidas con los oligonucleótidos ITS1-ITS4; EF-1 α ; y la visualización de los productos de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se identificó similitud entre el tamaño de los fragmentos de 700 pares de bases (pb), con cebadores, ITS y 1250 pb con el cebadores EF como se aprecia en figura 5.

Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa (1%) obtenida de ITS 1/ITS4, M-marcador de peso molecular.

De acuerdo con la homología de los alineamientos de las secuenciaciones en la base



de datos del NCBI-BLAST, se muestra una estrecha relación genética entre los cinco aislamientos con *Mortierella alpina*, con identidad entre 99.67 % y 99.84 % entre las cepas aisladas (tabla 1).

Tabla 1 Caracterización molecular de los aislamientos con las secuencias intergénicas ITS del DNAr, 2020.

Código de muestra	Localidad de la muestra	Identificación	Porcentaje de similitud
HP _{Cct} -01-20	San Andrés Semetabaj, Sololá.	<i>Mortierella alpina</i>	99.82 %
HP _{Cr} -02-20	Malacatancito, Huehuetenango	<i>Mortierella alpina</i>	99.83 %
HP _{Cr} -03-20	EFA, San Marcos	<i>Mortierella alpina</i>	99.67 %
HP _{Cct} -04-20	Plantas de vivero de Chimaltenango.	<i>Mortierella alpina</i>	99.82 %
HP _{Cct} -05-20	Planta de vivero de Chimaltenango	<i>Mortierella alpina</i>	99.84 %

Nota: ^{Ct}= Cultivo trampa; ^{Cr}=Cultivo de raíz
Fuente. Laboratorio de Protección Vegetal, Labor Ovalle Olinpeque, Quetzaltenango, 2021.

Germinación de ecotipos criollos

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 2 se muestra la cantidad de semillas sembradas por ecotipo de aguacate. El porcentaje de germinación de la mayoría de ecotipos criollos de aguacate fue entre 70 -75 %, esto se considera aceptable de acuerdo con Alvarez, (2018).

La germinación depende de la variabilidad y la calidad de fruto; en cuanto al tamaño y tiempo de almacenamiento, no debe pasar más de dos semanas para su siembra. Esto influyó en la germinación y uniformidad de plantas seleccionadas para la inoculación, únicamente fueron seleccionadas ocho plantas por su uniformidad en altura (23 a 25 cm), descartando las plantas pequeñas, y las que tenían más de 25 cm de altura.

Tabla 2 Porcentaje de germinación en semilla de ecotipos de aguacate criollo colectados, 2020

Código	Ecotipo	Semillas sembradas de	Porcentaje de germinación	Plantas con altura 23-25 cm
A	ICTA-Cabricán XVII	20	75%	8 plantas
B	ICTA-Llano grande II	20	75%	8 plantas
C	ICTA-EI Rincón IV	20	70%	8 plantas
D	ICTA-Llano grande I	20	75%	8 plantas
E	ICTA-Santa María V	22	70%	8 plantas
F	ICTA-Cabricán XVII	20	75%	8 plantas
G	ICTA-Retalhule u V	15	53 %	8 plantas
H	Hass	-----	-----	8 plantas

Fuente. Laboratorio de Protección Vegetal, Labor Ovalle Olinstepeque, Quetzaltenango. Año 2021.

Evaluación de resistencia

Para esto se utilizó el aislamiento con mayor crecimiento *in vitro*, el cual que se inoculó en una herida al tallo de aguacate a la altura del injerto. Se

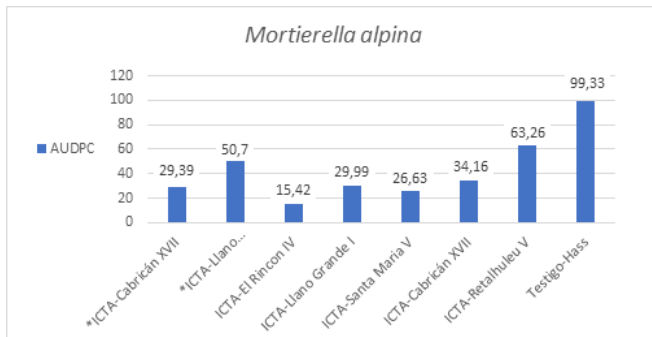
confirmó que el hongo *Mortierella alpina* fue causante de síntomas de la necrosis observados en el tallo, de acuerdo con los resultados obtenidos por Ruiz *et al.*, (2017). Según su estudio, 15 días después de la inoculación inició el crecimiento de la mancha necrótica en la superficie del tallo, avanzando pocos milímetros desde el punto de la inoculación. Por otro lado, el patógeno empezó a esporular en algunos tallos y penetró en el tejido vegetal por sí solo, observando síntomas en los diferentes materiales evaluados y signos del patógeno esto se puede apreciar en la figura 6.

Figura 6 Crecimiento de la necrosis en los tallos inoculados de aguacate, siendo los materiales susceptibles Retalhuleu y Hass.



De acuerdo a la estimación del ABCPE, para los cinco ecotipos de aguacate y el testigo Hass (figura 7), se observa claramente la separación de los grupos que presentan resistencia y susceptibilidad al patógeno. El material ICTA-EI Rincón IV, presentó reacción resistente con el menor valor ABCPE de 15.42 % de infección, comparado con el testigo, Hass que presentó 99,33 %. Seguimiento de ICTA-Cabricán XVII e ICTA-Santa María V con 39.16 % y 26.63 % CPE, respectivamente.

Figura 7 Efecto del daño en el tallo de ecotipos de aguacate (ABCPE) causado por *Mortierella alpina*.



Según Tamayo (2007), el incremento de la enfermedad depende también de varios factores como las condiciones climáticas y agronómicas de los ecotipos evaluados como también la presencia del patógeno en el campo. Teóricamente a mayor humedad ocurre aumento de infección, pero de acuerdo con Agrios (2010), el comportamiento de la enfermedad se asemeja a una infección por patógeno del tipo policíclico, pues estos se caracterizan por procesos infecciosos continuos. Por ello, la severidad tiende a ser constante después de estabilizarse la epidemia en enfermedades vasculares de árboles perennes como es el caso del aguacate.

DISCUSIÓN

Las cinco cepas aisladas fueron identificadas genéticamente como *Mortierella alpina* por medio de la secuenciación de la región ITS del hongo aislado con alto nivel de certeza.

Diversos autores han señalado que se ha logrado aislar *Mortierella sp* del sistema radical de diversas especies de plantas, pero no existe información de su carácter patológico (Lumley et al 2001; Yadav et al 2014; y Uehling et al, 2017). A la fecha, este es el primer reporte de una especie del género *Mortierella* como agente patógeno en aguacate en Guatemala.

Estos resultados son semejantes con lo indicado por Hernández (2016), quién en su investigación sobre la evaluación patogénica de diferentes hongos asociados a la enfermedad de la pudrición radicular del aguacate, reportó *Mortierella elongata*. En su estudio, dicho patógeno causó síntomas muy similares a los de *P. cinnamomi*, donde observó decaimiento de las hojas después de 48 horas de inoculadas. Este es el primer reporte de *Mortierella*

alpina, como patógeno asociado a la enfermedad de pudrición radicular en aguacate en Guatemala. Sin embargo, es necesario continuar con la evaluación de los diferentes aislamientos con los que se cuenta para realizar más pruebas en raíces de aguacate.

En Guatemala no existen centros de producción de porta-injertos certificados con resistencia a la marchitez del aguacate. Por lo tanto, se reportan dos ecotipos de aguacate criollo que demostraron reacción resistente a *M. alpina*: ICTA- El Rincón IV, ICTA-Cabricán XVII e ICTA-Santa María V. Estos materiales deben ser evaluados para otras cepas de patógenos reportados como causantes de la marchitez en este cultivo.

CONCLUSIONES

Se aislaron cinco cepas del patógeno del suelo asociado a la raíz de plantas de aguacate enfermas, se identificaron genéticamente como *Mortierella alpina*, con un porcentaje de similitud entre 99.67 % a 99.84 %, respectivamente.

La inoculación de una de las cepas aisladas de *Mortierella alpina*, resultó ser positiva a las prueba de patogenicidad, confirmado de esta manera que la marchitez del aguacate puede ser causada por distintos hongos presentes en el suelo, siendo este el primer reporte de esta especie asociada a la enfermedad.

El material ICTA-El Rincón IV, ICTA-Cabricán XVII e ICTA-Santa María V, presentaron reacción resistente al aislamiento de *M. alpina* inoculado.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue ejecutado gracias al apoyo financiero del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), y el Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícolas (ICTA). El contenido de esta publicación es responsabilidad de sus autores y de la institución a la que pertenecen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2010. Fitopatología 2ª ed. Editorial Lemus. México D. F. 856p.
- Alvarez-Acosta, C., Marrero-Dominguez, A., Gallo-Llobet, L., & Gonzalez-Rodriguez, A. M. (2018). Physiological response of selected avocados (*Persea americana*) subjected to

- NaCl and NaHCO₃ stress. *Scientia Horticulturae*, 237, 81-88..
- Gallo, LL; Dez J; y Vega, JS. (1990). Enfermedades del aguacate presentes en Canarias con especial referencia a (*Phytophthora cinnamomi*) Rands Podredumbre de la raíz. II Congreso de Fitopatología. Departamento de Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. 7-19.
- Caycho Rios, K. D. (2021). Características reproductivas y manejo de floración del palto (*Persea americana* Mill.) en el valle Interandino de Huarmey.
- Hernández Pérez, A., Cerna Chávez, E., Delgado Ortiz, J. C., Beltrán Beache, M., Hernández Bautista, O., Tapia Vargas, L. M., & Ochoa Fuentes, Y. M. (2018). Primer reporte de *Mortierella elongata* como patógeno del cultivo del aguacate en Michoacán, México. *Scientia fungorum*, 48, 95-98.
- Lumley, T. C., Gignac, L. D., & Currah, R. S. (2001). Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 79(1), 76-92.
- Molano, P. J. T. (2007). Enfermedades del aguacate. *Revista politécnica*, 3(4), 51-70.
- Rayaroth, A. C., Tomar, R. S., & Mishra, R. K. (2017). Arachidonic acid synthesis in *Mortierella alpina*: Origin, evolution and advancements. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(4), 1053-1066.
- Ruiz-Cisneros, M. F., Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., Ornelas-Paz, J. D. J., Acosta-Muñiz, C. H., Romo-Chacón, A., ... & Fernández-Pavía, S. P. (2017). Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 437-462.
- Sánchez, E. I., (2018). Selección de Genotipos de Aguacate Raza Mexicana con Resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051-1056.
- Uehling, J., Gryganskyi, A., Hameed, K., Tschaplinski, T., Misztal, P. K., Wu, S., .. & Bonito, G. (2017). Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. *Environmental Microbiology*, 19(8), 2964-2983.
- Yadav, D. R., Kim, S. W., Babu, A. G., Adhikari, M., Kim, C., Lee, H. B., & Lee, Y. S. (2014). First report of *Mortierella alpina* (Mortierellaceae, Zygomycota) isolated from crop field soil in Korea. *Mycobiology*, 42(4), 401-404.