

Selección de portainjertos de aguacate criollo (*Persea americana* Mill) con tolerancia- resistencia a (*Phytophthora cinnamomi*) (Rands)



Investigadora Principal : Inga. Agra. Glenda Pérez
Investigadora asociada: MSc. Luz Montejo
Investigadora auxiliar: Joselinne Colop

Abril, 2021

Este proyecto fue ejecutado gracias al apoyo financiero del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). El contenido de esta publicación es responsabilidad de sus autores y de la institución a la que pertenecen. La mención de empresas o productos comerciales no implica la aprobación o preferencia sobre otros de naturaleza similar que no se menciona.

Contenido

Siglas y acrónimos	VII
Resumen.....	VIII
Summary.....	IX
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Aguacate en Guatemala	2
2.1.1. Importancia económica del aguacate	2
2.1.2. Ecotipos de aguacate como portainjerto	2
2.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i>	2
2.2.3 Ciclo biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	3
2.2.4. Métodos de evaluación de la resistencia e identificación de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en árboles de aguacate	3
2.3. <i>Mortierella sp.</i>	5
2.3.1. Patogenicidad de género <i>Mortierella sp.</i>	5
2.4. Mecanismos de defensa de la planta al patógeno	6
2.4.1. Portainjertos de aguacate resistentes a <i>Phytophthora cinnamomi</i> como mecanismo de defensa	6
3. Objetivos.....	7
3.1. General.....	7
3.2. Específicos.....	7
4. Hipótesis	7
5. Materiales y métodos	7
5.1. Localidad y época	7
5.2. Muestreo	8

5.3. Tratamientos	8
5.4. Tamaño de la unidad experimental	9
5.6. Variables de respuesta	9
5.7 Análisis de la información	9
5.8. Manejo del experimento	10
5.8.1. Fase uno: colecta y selección de portainjertos de aguacate criollo, con tolerancia a pudrición radicular	10
5.8.2. Fase dos: aislamiento, purificación, conservación e identificación morfológica de <i>Mortierella sp.</i>	12
5.8.3. Fase tres: inoculación plántulas aguacate con <i>Mortierella sp.</i>	16
6. Resultados	19
6.1. Resultados fase 1	19
6.2. Resultados fase 2	20
6.2.1. Aislamiento del patógeno	20
6.2.2. Purificación de las cepas aisladas	21
6.2.3. Conservación de los aislamientos	22
6.2.4. Identificación morfológica.....	22
6.2.5. Caracterización molecular	23
6.3. Resultados fase 3	24
6.3.1. Inoculación de plántulas de aguacate con <i>Mortierella alpina</i>	24
6.3.2. Evaluación de tolerancia.....	26
7. Conclusiones.....	29
8. Recomendaciones.....	29
9. Referencias bibliográficas.....	30
10. Anexos	34

Índice de cuadros

Cuadro 1. <i>Ecotipos criollos de aguacate identificadas por el ICTA en el año 2004.</i>	8
Cuadro 2. <i>Secuenciación de los cebadores para los PCR de ITS y EF</i>	15
Cuadro 3. <i>Accesiones de aguacate inoculadas en el 2020</i>	16
Cuadro 4. <i>Porcentaje de germinación en semilla de ecotipos de aguacate criollo 2020</i>	20
Cuadro 5. <i>Aislamientos puros de <i>Mortierella alpina</i> 2020</i>	21
Cuadro 6. <i>Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA 2020.</i>	24

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> <i>Colecta de muestras de suelo con raíces de árboles de aguacate con síntomas de pudrición</i>	11
<i>Figura 2.</i> <i>Proceso de siembra de semilla de los cinco ecotipos criollos de aguacate en maceta, colectados en 2019-2020.</i>	12
<i>Figura 3.</i> <i>Método de conservación de aislamientos del patógeno</i>	14
<i>Figura 4.</i> <i>Pasos para la identificación molecular</i>	14
<i>Figura 5.</i> <i>Colocación de disco de micelio de <i>M. alpina</i></i>	17
<i>Figura 6.</i> <i>Procedimiento de inoculación de ecotipos criollos con <i>Mortierella alpina</i></i>	18
<i>Figura 7.</i> <i>Medición de altura de la planta</i>	19
<i>Figura 8.</i> <i>Morfología comparativa de a) características macros-microscópicas de <i>M. alpina</i>; b) características macros-microscópicas de <i>P. cinnamomi</i>, de raíces de aguacate; c).<i>Mortierella alpina</i> tomada de Hernández 2018.</i>	23
<i>Figura 9.</i> <i>Electroforesis en gel de agarosa (1%) obtenida de ITS 1/ITS4, M-marcador de peso molecular.</i>	23
<i>Figura 10.</i> <i>Crecimiento de la necrosis en los diferentes tallos de aguacate, siendo los materiales susceptibles (Retalhuleu y Hass).</i>	25
<i>Figura 11.</i> <i>Síntomas de pudrición de <i>M. elongata</i></i>	26
<i>Figura 12.</i> <i>Porcentaje de severidad a la inoculación de cinco ecotipos de aguacate criollo con <i>Mortierella alpina</i>, 2020</i>	27
<i>Figura 13.</i> <i>Efecto del daño de la pudrición radicular del aguacate (AUDPC) causado por <i>Mortierella alpina</i></i>	28

Siglas y acrónimos

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

ADNr = Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal

AUDPC = Area Under Disease Progress Curve

CEPALO = Centro de Producción del Altiplano Occidental

CIAT = Centro Internacional de Agricultura Tropical

CIALO = Centro Regional de Investigación del Altiplano Occidental

CIP = Centro Internacional de la papa

CPE=Curva del progreso de la enfermedad

CRIA = Consorcios Regionales de Investigación Agropecuaria

ICTA = Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas

IICA = Instituto Interamericana de Cooperación para la Agricultura

ITS = Región Espaciadora Intergénica

ITS 1= Par de Cebador par la Amplificación de la Región ITS

ITS 4= Par de Cebador par la Amplificación de la Región ITS

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA = Medio de Cultivo Agar de Dextrosa y Papa.

Resumen

En Guatemala es necesario contar con patrones de aguacate resistentes a la pudrición radicular, para reducir la pérdida de plantas en vivero y plantaciones en producción. Esta enfermedad es causada principalmente por *Phytophthora cinnamomi*. En México diferentes estudios asocian otros patógenos como *Mortierella sp* en plantaciones de aguacate y manzano. El objetivo del estudio fue estimar la tolerancia de cinco ecotipos criollos de aguacate seleccionados por ICTA a la inoculación por herida al tallo con un aislamiento de *Mortierella alpina*. En el 2019 se realizó la colecta de semilla de plantas madre de cinco ecotipos en tres localidades: San Marcos, Quetzaltenango y Retalhuleu. También se colectó muestras de suelo y raíces de aguacate en plantaciones enfermas para el aislamiento del patógeno. Entre tres a ocho días después de la siembra *in vitro* se realizaron sub-cultivos de cada aislamiento en el medio papa dextrosa agar (PDA) con antibiótico. Realizando la identificación morfológica y genética del patógeno: *Mortierella alpina* en un 99 % de similitud. Se terminó la resistencia de los cinco ecotipos de aguacate criollo a la inoculación de la cepa del patógeno. El ecotipo de aguacate ICTA-El Rincón IV presentó 15.42 %, de la curva del progreso de la enfermedad (CPE), seguidos de ICTA-Cabricán XVII e ICTA-Santa María V, que alcanzaron 39.16 % y 26.63 % CPE, considerados tolerantes, comparados con el testigo Hass que presentó 99.33% de CPE. Los resultados indican que el ecotipo criollo ICTA-El Rincón IV tiene mayor resistencia a la inoculación de *Mortierella alpina*, este material debe ser evaluado con otras cepas de patógenos asociados a la pudrición radicular para considerarlo como posible portainjerto para la región occidental.

Palabras clave: patogenicidad, tolerancia y *Mortierella alpina*

Summary

In Guatemala it is necessary to have avocado rootstocks resistant to root rot, to reduce the loss of plants in nurseries and plantations in production. This disease is mainly caused by *Phytophthora cinnamomi*. In Mexico, different studies associate other pathogens such as *Mortierella sp* in avocado and apple plantations. The objective of the study was to estimate the tolerance of five creole avocado ecotypes selected by ICTA to inoculation by wounding the stem with an isolate of *Mortierella alpina*. In 2019, the seed collection of mother plants from five ecotypes was carried out in three locations: San Marcos, Quetzaltenango, and Retalhuleu. Soil samples and avocado roots were also collected in diseased plantations for the isolation of the pathogen. Between three to eight days after in vitro sowing, subcultures of each isolate were performed on potato dextrose agar (PDA) with an antibiotic. Performing the morphological and genetic identification of the pathogen: *Mortierella alpina* in 99% similarity. The resistance of the five ecotypes of Creole avocado to the inoculation of the pathogen strain was terminated. The avocado ecotype ICTA-El Rincón IV presented 15.42% of the disease progress curve (CPE), followed by ICTA-Cabricán XVII and ICTA-Santa María V, which reached 39.16% and 26.63% CPE, considered tolerant, compared to the Hass control who presented 99.33% CPE. The results indicate that the criollo ecotype ICTA-El Rincón IV has greater resistance to inoculation of *Mortierella alpina*, this material should be evaluated with other strains of pathogens associated with root rot to consider it as a possible rootstock for the western region.

Key words: pathogenicity, tolerance and *Mortierella alpina*

1. 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 *y que limita la producción, a su vez también manifiestan que no cuentan con portainjertos certificados con resistencia al patógeno.*

Según Godínez, *et al.* (2000), esta enfermedad limita la producción de plantaciones establecidas debido a que los portainjertos de aguacate provienen del mercado local, que son ecotipos criollos de las diferentes regiones del país. Al Oomycete *Phytophthora cinamomi* hasta la fecha se le atribuía como el único patógeno responsable de esta enfermedad. Sin embargo, existen reportes de fitopatógenos aislado de tejidos de raíz de aguacate como: *Cylindrocladium parasiticum*, *Phytophthium*, *Nectria liriodendri* *Mortierella spp*, reportando este último, con más de 100 especies entre patógenos y contaminantes del suelo. (Hernández, 2018)

Por lo tanto, una prioridad en la presente investigación es estimar la tolerancia de cinco ecotipos criollos de aguacate seleccionados por ICTA a la inoculando del patógeno *Mortierella alpina*, a través de herida al tallo. En Guatemala, desafortunadamente no existe información certera que los patrones que utiliza el productor presenten características de resistencia a patógenos relacionados a la pudrición de la raíz del aguacate y que puedan ayudar al control de la enfermedad.

Esta investigación inicia con la colecta de semilla de las plantas madre de las accesiones seleccionadas, que posteriormente se germinaron y sembraron. Al mismo tiempo se realizaron colectas de plantas enfermas en parcelas de agricultores. Como resultado, se aislaron cinco cepas diferentes del patógeno que posteriormente se utilizaron para inoculaciones en plantas de 25 a 35m de altura. Los aislamientos se caracterizaron genéticamente para determinar la diversidad de especies asociadas a la enfermedad ya que el diagnóstico convencional se ha visto limitado por depender únicamente de las características morfológicas que pueden causar dificultad a la hora de identificar al patógeno (Pallás et al 2008).

2. Marco teórico

2.1. Aguacate en Guatemala

2.1.1. Importancia económica del aguacate

El aguacate es una planta perteneciente a la familia de las Lauráceas, originaria de Guatemala, parte de Centro América y México (Vásquez 1984). La posición geográfica de Guatemala proporciona una ventaja en la producción del fruto en los diferentes climas puesto que los departamentos donde se cultiva fruto son: Sacatepéquez, Chimaltenango, Quetzaltenango, Sololá, Huehuetenango, San Marcos, Suchitepéquez y Santa Rosa con una producción para el año 2015 de aproximadamente 31,000.00 toneladas métricas. Esta producción cubre básicamente la demanda nacional y una parte se exporta. En el 2015 por falta de lluvias se redujo la producción en un 30 %, comparado con el 2014 según Agexport (2015). Además, existe una importación anual de México de 725,000 toneladas métricas con tendencia creciente que indica que existe una demanda insatisfecha de producción local de fruto, según Becerra (2021).

2.1.2. Ecotipos de aguacate como portainjerto

Un ecotipo se refiere a una accesión proveniente de un clima, altitud y suelo determinado (Benítez *et al.*, 2006). En Guatemala existe alta diversidad de zonas productoras de aguacate, se cuenta con 10 regiones fisiográficas, 14 zonas de vida, tres vertientes y 38 cuencas importantes, 7 biomas, y 9 ecorregiones terrestres (Castañeda 1995).

En la región del occidente de Guatemala se cultivan diferentes ecotipos criollos que se adaptan a distintas altitudes, clima y suelo que presentan potencial fisiológico como portainjertos. El programa de frutales del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) durante el 2004 realizó la selección de materiales de aguacate que presentaron tolerancia a la pudrición de radicular en campo. Seleccionaron materiales basados en tres zonas climáticas conocidas por los productores y la adaptación de estos: cálida (costa sur), zona templada (boca-costa), zona fría (altiplano).

2.2. *Phytophthora cinnamomi*

Generalmente la podredumbre de la raíz de aguacate se le atribuye a *P. cinnamomi* que es un Oomicete polífago del cual se conocen más de 300 especies, entre las que se encuentra, las hortalizas y dicotiledóneas. Esta variada lista de especies susceptibles al ataque del hongo confirma la importancia de controlar este patógeno. Esta enfermedad fue reportada por primera vez en el cultivo de aguacate en España 1987 (López Herrera, 1989). El ataque en la base del tallo inicia

con la germinación de los esclerocios presentes en el suelo condiciones de alta humedad y temperatura templada. El esclerocio germina produciendo un micelio blanco que invade los tejidos de la raíz superficiales e invadiendo la base del tallo. El hongo posteriormente invade los tejidos internos del tallo basal de la planta causando la marchitez foliar y posteriormente la muerte de la planta.

2.2.3 Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi*

La penetración del hongo en la planta puede producirse, por heridas, por las estomas o atravesando la cutícula. Una vez dentro de la planta, el micelio invade los espacios intercelulares y luego el interior de las células utilizando enzimas y toxinas, dificultando notablemente la defensa de la planta. La marchitez foliar que caracteriza a los ataques de la raíz y base del tallo se debe a la obstrucción de los vasos conductores.

2.2.4. Métodos de evaluación de la resistencia e identificación de *Phytophthora cinnamomi* en árboles de aguacate

a. Evaluación de *Phytophthora cinnamomi*

Existen diferentes métodos, que se han desarrollado en la búsqueda de resistencia a *P. cinnamomi* en el cultivo de aguacate de forma directa e indirecta.

Según Jaramillo *et al* (2009), compararon diferentes métodos de inoculación para determinar de una manera rápida la resistencia de *P. cinnamomi* en portainjertos de aguacate, donde se determinó que la inoculación en brotes etiolados a nivel de laboratorio y la inoculación en el sistema radicular es similar para evaluar porta-injertos de *P. americana*, de acuerdo a los autores del trabajo la inoculación indirecta (diferentes tejidos de la raíz) se puede obtener buenos resultados en poco tiempo, si se busca resistencia en germoplasma de aguacate. También se encontró que los patrones Thomas, Duke-7, resultaron ser susceptible utilizando inoculación en el tallo, lo que nos muestra que este método es riguroso y con mayor precisión para evaluar resistencia. El método de inoculación por herida al tallo e inoculación en raíz se determinó que es directamente proporcional, por lo que se ha presentado como una alternativa para la determinación de resistencia al patógeno en estudio Jaramillo *et al.*, (2009).

De acuerdo con Robin y Desprez (1998) la técnica de inoculación en tallo nos permite discriminar de forma estable y consistente en los aislamientos del patógeno, así también es más conveniente que inocular en suelo.

b. Identificación de *Phytophthora cinnamomi* a través de marcadores moleculares

La necesidad de utilizar diagnósticos más sensibles y específicos ha llevado a los diferentes investigadores a utilizar técnicas con Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). Según Li, Abad, French, & Monar, (2009), esta técnica fue establecida en 1985, utilizada en la biología molecular actual (Li, et al 2009). La PCR ha permitido establecer la identidad de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, esto ha revolucionado la identificación de hongos, sobre todo los que son utilizados como organismos biológicos debido a que la determinación tradicional basada en la observación de estructuras morfológicas y propiedades fisiológicas no es lo suficiente para obtener una identificación confiable. Haciendo uso de (PCR) se obtiene la identificación en un menor tiempo y con resultados más confiables de organismos o patógenos (Mohond y Van Berg, 2011).

La PCR es una amplificación *in vitro*, de ADN y se determina en tres pasos: la desnaturalización es la copia del ADN molde del patógeno en estudio, incrementando la temperatura para separar las dos cadenas que la componen; luego pasa a la hibridación aquí se aparean los oligonucleótidos del ADN y se requiere que la temperatura baje, causando que estas cadenas pequeñas de ADN se una a la secuencia complementaria en el individuo y se limite la secuencia amplificada. Para terminar, se eleva nuevamente la temperatura de la reacción hasta llegar a la óptima de la polimerasa de ADN, provocando la extensión de las cadenas hijas correspondiente dicho de otra manera se duplica el número inicial de ADN. Se repite estos tres pasos logrando obtener un número de cadena delimitada por el oligonucleótido (Li, et al 2009). El proceso descrito anteriormente es para una PCR clásica pues se amplifica exponencialmente el ADN haciendo uso de dos cebadores, existen otras variantes que no pueden ser excluyentes (Treguerres, et al 2003).

Actualmente, se han diseñado y descrito iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nucleico de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estos genes. La variación de la secuencia en esta región

produce polimorfismos que pueden usarse para objetivos taxonómicos. Las comparaciones basadas en estas secuencias (ITS1 e ITS2), presentes en las regiones espaciadoras de los ARN ribosómicos y el diseño de iniciadores (primers) para la amplificación mediante PCR de las regiones ITS ha demostrado ampliamente su utilidad como herramienta de identificación y detección, (Pallás, *et al* 2008).

Las regiones internal Trascrived Spacer (ITS), son regiones de ADN características dentro del genoma de los hongos, se trata de un sistema complejo que incluye los genes 18S, 28S, y 5.8S ARNr. Las secuencias de estos genes están separadas por dos espaciadores internos que se transcriben, llamados ITS-1 e ITS-2, entre estos genes existe un espaciador intergénico que no transcribe, llamado Espacio Intergenético no transcrito (IGS), estas zonas no codificantes tienden a mutar y por lo tanto son de gran interés en estudios de identificación y tipificación de especies de hongos.

2.3. *Mortierella* sp.

El género *Mortierella*, es un hongo del suelo que pertenece a la familia *Mortierellaceae* dentro del orden *Mortierellales* clasificado como Zigomicetos. Con tiene una sola familia, pero presenta 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.

2.3.1. Patogenicidad de género *Mortierella* sp.

Mortierella es uno de los hongos basales diversos, debido a que existen escasa información acerca de la diversidad de los Mortierellales. En México, en búsqueda de microorganismos antagónicos, asilaron diferentes cepas de *Mortierella*, y fueron inoculadas en plantas de manzano a los 15 días las plantas presentaron decaimiento en la parte apical, seguido de una marchitez generalizada en hojas y tallos (Lumley *et al*, 2001). Otro trabajo realizado en plantas de manzana de acuerdo con Hernández (2016), fueron inoculadas en raíces de manzano cepas aisladas de que mostraron síntomas de enfermedad radicular. Evaluó aislados de *P. cinnamomi* y *M. elongata*, en

plantas de aguacate con 5 hojas verdaderas, determinando que son hongos contaminantes. Las plantas mostraron síntomas muy similares a la enfermedad conocida como marchitez de la raíz del aguacate, este es el primer reporte en la región.

2.4. Mecanismos de defensa de la planta al patógeno

Para contrarrestar el ataque de organismos patógenos la planta cuenta con dos mecanismos de respuesta a la invasión del patógeno (Agrios, 2010). Defensa pasiva, que son preformados o constitutivos y se encuentran presente en la planta independientemente si es atacada o no por un patógeno, las barreras estructurales que posee la planta limitando ser invadido ya sea formando capas de corcho, geles o tilosas; también están las células lignificadas que limitan el punto de infección.

Defensa activa que es inducida, por las barreras bioquímicas preformadas, como los compuestos fenoles que se producen alrededor de las células y actúan de forma pasiva intracelular o extracelularmente reformando la pared celular e inhibiendo el crecimiento de hifas de patógeno invasor (Agrios, 2010; Weehouw, et al 2000).

2.4.1. Portainjertos de aguacate resistentes a *Phytophthora cinnamomi* como mecanismo de defensa

En los últimos años se han desarrollado considerables investigaciones en la búsqueda de patrones resistentes a enfermedades y que a largo plazo los agricultores utilicen portainjertos resistentes para tener éxito en el control del ataque del patógeno de la podredumbre en la raíz (Douhan, 2011). En todo el mundo existen programas de selección de patrones criollos con tolerancia a *P. cinnamomi*. En la actualidad las diferentes organizaciones involucradas en la producción de aguacate en Guatemala tienen la preocupación de no contar con patrones seleccionados con resistencia a patógenos del suelo y se quiere iniciar con la búsqueda de portainjertos de aguacate con resistencia al ataque de *P. cinnamomi* y poder de esta manera rescatar germoplasma con características genéticas estables (Ovalle, 2011) que puedan ser utilizadas en el mercado como portainjertos para la región occidental.

3. Objetivos

3.1. General

Estimar la tolerancia de cinco ecotipos de aguacate criollo a la pudrición radicular utilizando la técnica de inoculación de herida al tallo.

3.2. Específicos

- Establecer un protocolo de aislamiento y conservación del patógeno causante de la pudrición radicular del aguacate.
- Aislar e identificar morfológicamente el aislamiento del patógeno causante de la pudrición radicular proveniente de muestras de campo.
- Colectar semillas de cinco ecotipos de aguacate seleccionados por el Programa de Frutales como portainjertos.
- Caracterizar aislamientos del patógeno causante de la pudrición radicular del aguacate por medio de marcadores moleculares microsatélites.

4. Hipótesis

Ho. Los ecotipos criollos de aguacates no serán tolerantes a la inoculación del aislamiento causante de la pudrición radicular.

Ho. Ninguna de las muestras colectadas de suelo con raíz tendrá presencia de patógenos relacionados a la pudrición radicular.

5. Materiales y métodos

5.1. Localidad y época

El trabajo se desarrolló durante el periodo comprendido de marzo del 2019 - abril del año 2021. Las diferentes actividades se ejecutaron en las instalaciones del Laboratorio de Protección Vegetal, ICTA Labor Ovalle, Quetzaltenango; la fase de infección para evaluar tolerancia en plantas se llevó a cabo en un vivero particular que se ubicó en San Juan Ostuncalco; la caracterización molecular se llevó a cabo con el apoyo del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad de Valle de Guatemala.

5.2. Muestreo

Se colectaron frutos maduros de cinco ecotipos criollos seleccionados por el Programa de Frutales, ICTA (2004), ubicados en tres zonas productoras de aguacate: 1. Zona cálida (Costa sur): Retalhuleu, Retalhuleu y Catarina, San Marcos; 2. Zona templada (boca-costa), Santa María de Jesús, y El Rincón, San Martín Sacatepéquez; 3. Zona fría (Altiplano), Cabricán, Quetzaltenango, y Llano Grande, San Pedro Sacatepéquez, ver anexo 1. Para realizar esta actividad se realizaron visitas a 11 fincas, y dos viveros con plantas de aguacate en un periodo de 12 meses debido a las distintas épocas de producción. En total se colectaron 37 muestras de suelo, la base de datos del muestreo se encuentra en anexo 2.

5.3. Tratamientos

Los ecotipos de aguacate criollo fueron seleccionados por el Programa de Frutales del ICTA, basándose en los trabajos que realizó en 2004, los cuales se presentan en el cuadro 1 (Vásquez 2006).

Cuadro 1. *Ecotipos criollos de aguacate identificadas por el ICTA en el año 2004.*

Accesión	Productor	Comunidad	Municipio	Departamento	Latitud
ICTA El Rincón IV	Candelaria de Morales	Aldea Rincón	El San Martín	Quetzaltenango	Lat 16°37'28" N Log 15°64'05" E Altitud 1,724 msnm
ICTA Santa María V	Raymunda Chim	Santa María de Jesús	Zunil	Quetzaltenango	Lat 16°28'81" N Log 15°65'88" E Altitud 1581 msnm.
ICTA Cabricán XVII	Amilcar López Baten	Aldea Flor de Peña	Cabricán	Quetzaltenango	Lat 15°04'32" N Log 91°39'46" W Altitud 2300 msnm
ICTA Retalhuleu V	Canuto Machic	Calzada Palmas	Las Retalhuleu	Retalhuleu	Lat 16°09'38" N Log 15°64'49" E Altitud 300 msnm
ICTA Catarina I	Mercedes Cajas		Catarina	San Marcos	Lat 16°41'57" N Log 15°59'80" E Altitud 220 msnm

ICTA	Roberto	Aldea	Llano	San Pedro	San Marcos	Lat 16°51'11''N
Llano	Ramírez	Grande				Log 15°63'45''E
Grande I						Altitud 2000 msnm

Base de datos de ecotipos de aguacate criollo(tratamientos) utilizados para esta investigación. Laboratorio de Protección Vegetal, Labor Ovalle, Olintepeque, Quetzaltenango, 2021.

5.4. Tamaño de la unidad experimental

Para la fase dos que correspondió a la infección de plantas se utilizó una planta como unidad experimental. Se utilizaron 8 repeticiones y 7 tratamientos

5.5. Modelo estadístico

Bloques completamente al azar

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \beta_j + Q_{ij} \quad i = 1, \dots, t \quad j = 1, \dots, b$$

μ = medida general

t_i = efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = efecto del j-ésimo bloque

Q_{ij} = error experimental en la unidad j del tratamiento i

Q_{ij} = NID (0.02)

5.6. Variables de respuesta

Se consideró la severidad como variable de respuesta. Para ello se midió el ancho y largo de la lesión 15 días después de la inoculación durante tres meses para determinar el progreso de la enfermedad y determina el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (AUDPC por sus siglas en ingles)

- Tamaño en (cm) de la necrosis de la herida en el tallo.
- Diámetro del tallo (mm).
- Altura de planta (cm).

5.7 Análisis de la información

Para evaluar la resistencia de un determinado material genético se recomienda utilizar, el parámetro conocido como área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), este parámetro se basa en los porcentajes del área foliar afectada por el patógeno de acuerdo con Forbes, et al (2014.).

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

Dónde: t = Es el tiempo de cada lectura (cada 15 días por 3 meses)

y = Porcentaje de follaje afectado en cada lectura

n = número de lectura

5.8. Manejo del experimento

La elaboración de esta investigación se conformó en dos fases las cuales se describen a continuación.

5.8.1. Fase uno: colecta y selección de portainjertos de aguacate criollo, con tolerancia a pudrición radicular

a. Colecta de muestras de suelo y raíces en campo

Se contactaron a los agricultores que participaron en la cadena de aguacate (CRIA) para evaluar árboles en su parcela que presentaban síntomas en la parte aérea y radicular de pudrición radicular.

Se utilizó un muestreo aleatorio, identificando plantas que presentaban síntomas de la enfermedad como se muestra en figura 1. Se extrajeron cuatro submuestras en forma de cruz en la zona de goteo del árbol a 20 cm de profundidad, cerca de las raíces del árbol, seleccionando raíces con necrosis leve. En los viveros seleccionaron las plantas completas que se observaban decaídas o muertas. Las muestras fueron identificadas y sellaron en bolsas plásticas para conservar la humedad. Luego fueron trasladadas al Laboratorio de Protección Vegetal del ICTA-CEPALO, Labor Ovalle, Olinstepeque, Quetzaltenango.



Figura 1. Colecta de muestras de suelo con raíces de árboles de aguacate con síntomas de pudrición

b. Siembra

La colecta de las semillas se realizó según la época de fructificación de cada ecotipo seleccionado. Las semillas se desinfectaron 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 como se muestra en figura 2.

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. Se estableció el ensayo del 2 de septiembre al 2 de diciembre, 2020. Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo oscuridad (vivero cubierto de nylon negro), controlando la temperatura entre 18°C - 25°C y 70% - 80 %. Se regaron las plantas cada dos a tres, la herida del tallo se humedeció todos los días hasta terminar el ensayo. A los 15 días posteriores a la inoculación se tomaron datos con un intervalo de 15 días hasta cumplir tres meses luego de la inoculación.



Figura 2. Proceso de siembra de semilla de los cinco ecotipos criollos de aguacate en maceta, colectados en 2019-2020.

5.8.2. Fase dos: aislamiento, purificación, conservación e identificación morfológica de *Mortierella* sp.

a. Aislamiento del patógeno

Se implementaron dos métodos para aislar el patógeno los cuales fueron:

Cultivo trampa: se utilizaron manzanas verdes como trampa. Los aislamientos fueron obtenidos de la siembra de segmentos de manzanas y tejido de raíces en cajas petri con medio papa dextrosa agar (PDA), malta con ácido láctico, rosa de bengala, Corn agar, y PDA con antibiótico específico (ver medios de cultivo en anexo 3). Posteriormente los aislamientos se sometieron a un proceso de selección mediante la identificación morfológica, seleccionando las colonias que presentaron un crecimiento rosáceo, y micelio de color blanquecino (Gallo, et al 1990).

Método directo: consistió en seleccionar raicillas entre 1 a 2 cm de largo que presentaron síntomas de la enfermedad (necrosis leve y/o raíces con tono rojizo) en medio PDA y Corn agar con antibiótico específico. Dichas raíces se colocaron previamente en cámara húmeda, cinco a siete días después al observar desarrollo de micelio se realizaron montajes para seleccionar el patógeno y sembrarlo. La descripción de dichos métodos se encuentra en anexo 3.

b. Purificación de aislamientos

Después de identificar al patógeno por sus características morfológicas se utilizó el cultivo monomicelial para incremento, análisis molecular y conservación. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos.

-Se sembraron porciones de la colonia del patógeno en los medios de cultivo PDA, corn agar y V8. A cada medio de cultivo se le aplicó un antibiótico específico (Ovalle, 2011), y fungicida (himexazol al 70 %). La preparación de los medios de cultivo se aprecia en anexo 5.

-Posteriormente se incubaron durante seis días a 25 °C.

-Al término de los seis días se transfirieron cuadros de 0.5 mm² del aislamiento a nuevo medio de cultivo para seguir purificando, esto se realizó para cada cepa aislada.

-Finalmente las colonias se midieron diariamente por siete días con un vernier a partir del punto de siembra en los tres medios (PDA, corn agar y V8). Los datos de estas mediciones se visualizan en anexo.

c. Conservación de aislamientos del patógeno

Las cepas aisladas se conservaron en microtubos con capacidad de 1.5 ml y agua destilada estéril. Se conservaron cinco tubos por muestra en distintas fechas conteniendo doce segmentos de 5 mm² de medio PDA con micelio del patógeno (figura 3). Los tubos se sellaron con papel Parafilm® y se empacaron con papel aluminio. Finalmente, se resguardaron en obscuridad a temperatura ambiente durante seis y ocho meses, después de este tiempo se reactivaron y renovaron los aislamientos.



Figura 3. Método de conservación de aislamientos del patógeno

d. Identificación molecular

La identificación molecular consta de cuatro pasos como se muestra en figura 4.

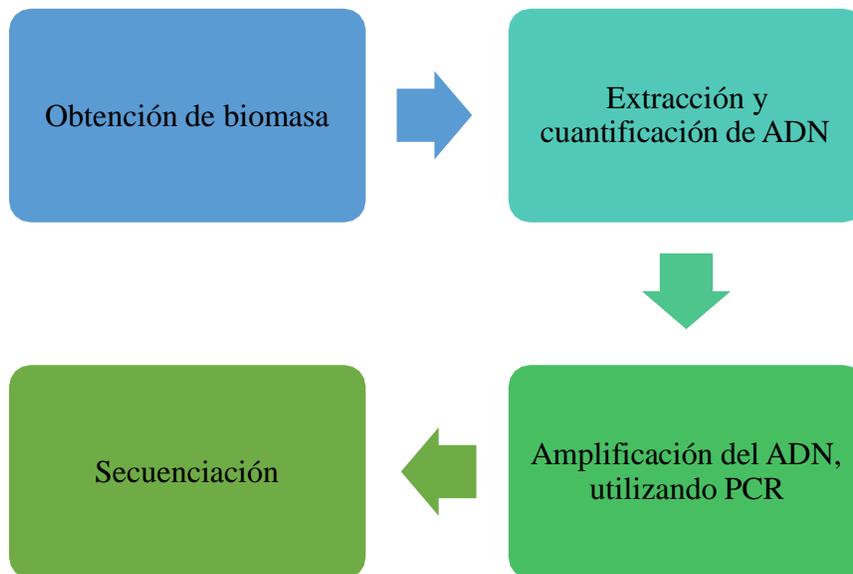


Figura 4. Pasos para la identificación molecular

Cada uno de los pasos mencionados se describe a continuación:

- Obtención de biomasa del micelio en medio líquido

Se suspendió el micelio de los aislamientos en medio líquido rico en sacarosa. Se colocaron 25 ml de medio líquido en un Erlenmeyer, la solución se agitó a 50 revoluciones por minutor (rpm) durante ocho a 12 días a temperatura ambiente según metodología del CIAT (2016).

-Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó 0.1 gramos de micelio cultivado en medio líquido y macerado con nitrógeno. Se utilizaron dos métodos de extracción de ADN, el protocolo de cada método se puede visualizar en anexo 6. 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®. El procedimiento fue agregar en una cubeta 90 µl de agua de grado de biología molecular y 10 µl de ADN de cada muestra. Las muestras que resultaron contaminadas se limpiaron agregando 10 µl de ARNasa cuantificando en el biofotómetro nuevamente.

-Amplificación del ADN utilizando PCR microsatélite

Se utilizaron el primer universal de ITS y EF para amplificar regiones del genoma del patógeno aislado. Se usó la secuenciación de la región ITS del ADNr, se usaron los cebadores para el PCR de cuadro 2, los cuales se han usado para identificar hongos patógenos de suelo. Se utilizaron los dos juegos de cebadores para realizar el PCR y la corrida de geles para verificar la integridad de las bandas respectivas de cada muestra. Al visualizar los geles identificó que las muestras corresponden a la misma especie y se seleccionaron las muestras de ADN para su secuenciación.

Cuadro 2. Secuenciación de los cebadores para los PCR de ITS y EF.

Cebador	Secuencia	
ITS Universales	ITS 1	5 –TCC GTA GGT GAA CCT GCGG- 3
	ITS4	5 –TCC TCCG CTT ATT GAT ATG C -3
EF	EF-1	5 – ATG GGT TAAG GAA GAC AAG AC -3
	EF-2	5 – GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT -3

Fuente. Laboratorio de Protección Vegetal, Labor Ovalle Olinztepeque, Quetzaltenango, 2021.

-Secuenciación

Las muestras de ADN se enviaron al Laboratorio de la Universidad del Valle Guatemala, Campus Central, para realizar la amplificación de ADN mediante PCR con microsatélites. Luego

las muestras se secuenciaron en Laboratorio de Macrogen en Corea, las secuencias obtenidas se analizaron en Blast con base de datos en Gen Bank del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI), se determinó el nombre del microorganismo con mayor grado de semejanza en la secuencia genética. En la base de datos y el porcentaje de similaridad entre las cepas, confirmando los resultados realizados con la región ITS.

5.8.3. Fase tres: inoculación plántulas aguacate con *Mortierella sp.*

a. Inoculación al tallo

Teniendo las diferentes cepas del patógeno identificadas morfológicamente y en cultivo puro, se procedió a seleccionar la cepa de crecimiento más rápido para la inoculación de las plantas de aguacate. Las accesiones inoculadas son las que se presentan en cuadro 3.

Cuadro 3. Accesiones de aguacate inoculadas en el 2020

Código	Accesión	Comunidad	Municipio	Departamento	No. plantas inoculadas	Latitud	Longitud	Altitud
Pa-02-20	**ICTA-Llano Grande II	Aldea Llano Grande	San Pedro	San Marcos	8	16°51'11''N	15°63'45''E	2000 msnm
Pa-04-19	ICTA- Llano Grande I	Aldea Llano Grande	San Pedro	San Marcos	8	16°51'11''N	15°63'45''E	2000 msnm
Pa-01-20	* ICTA Cabricán XVII	Aldea Flor de Peña	Cabricán	Quetzaltenango	8	15°04'33''N 91°39'46''W		2300 msnm
Pa-03-19	ICTA- El Rincón IV	Aldea El Rincón	San Martín	Quetzaltenango	8	16°37'28''N	15°64'05''E	1,724 msnm
Pa-05-19	ICTA -Santa María V	Santa María de Jesús	Zunil	Quetzaltenango	8	16°28'81''N	15°65'88''E	1581 msnm.
Pa-06-19	ICTA- Cabricán XVII	Aldea Flor de Peña	Cabricán	Quetzaltenango	8			2300 msnm
Pa-07-19	ICTA-Retalhuleu V	Calzada Las Palmas	Retalhuleu	Retalhuleu	8	16°09'38''N	15°64'49''E	300 msnm.

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

Las plantas fueron seleccionadas a los 4 meses de desarrollo aproximadamente. A cada planta se le realizó una herida en el tallo a 5 cm arriba del punto donde se realiza el injerto. En la

herida se le colocó un disco de 0.5 mm de diámetro con micelio del patógeno figura 5, posteriormente se cubrió la herida con película selladora (Parafilm®), como se ve en figura 6. Se utilizaron como testigo plantas injertadas de la variedad Hass, estas fueron inoculadas de la misma manera.



Figura 5. Colocación de disco de micelio de *M. alpina*



Figura 6. Procedimiento de inoculación de ecotipos criollos con *Mortierella alpina*.



Figura 7. Medición de altura de la planta.

La evaluación de la incidencia y severidad se llevó a cabo mediante mediciones del desarrollo de la necrosis en el área de la herida. como se ve en figura 7, midiendo el ancho y largo de la necrosis de la herida cada 15 días. Para determinar la incidencia se utilizó la escala visual (anexo 7).

Las plantas inoculadas se ubicaron en un invernadero oscuro (cubierto de nilon negro) y con sombra, para darle condiciones de infección. El riego se realizó cada 2 días a capacidad de campo evitando el salpique entre ellas.

6. Resultados

6.1. Resultados fase 1

Las colectas de semilla de aguacate se realizaron en diferentes épocas, debido a que vienen de diferentes climas y varía la fecha de madurez fisiológica del fruto. De acuerdo con los resultados obtenidos en el cuadro 4 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 % al 75 %, esto se considera aceptable de acuerdo con (Álvarez, 2018). La germinación depende

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

Cuadro 4. *Porcentaje de germinación en semilla de ecotipos de aguacate criollo 2020*

Código	Ecotipo	Semillas sembradas	Porcentaje de germinación	Plantas con una altura de 23-25 cm
A	ICTA-Cabricán XVII	20	75%	8 plantas
B	ICTA-Llano grande II	20	75%	8 plantas
C	ICTA-El 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- Retalhuleu V	15	53 %	8 plantas
H	Hass	-----	-----	8 plantas

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

6.2. Resultados fase 2

6.2.1. Aislamiento del patógeno

Las dos técnicas en este trabajo han permitido obtener el aislamiento del patógeno presente en las muestras colectadas en campo. Los resultados se diferencian por el tiempo de desarrollo de las primeras colonias y la eficiencia para la detección del patógeno. El aislamiento por el método directo a partir de raicillas presenta desarrollo lento y con una mayor contaminación, por lo tanto, baja propagación del propágulo. La utilización de la manzana como cultivo trampa posibilitó detectar con mayor rapidez al patógeno y una menor presencia de otros hongos contaminantes, pero presentó problemas de contaminación con bacterias.

Se colectaron 37 muestras de suelo con raíces y se aislaron exitosamente cinco cepas del patógeno presente en las muestras provenientes de plantas con síntomas de pudrición radicular, estas muestras provienen de parcelas de agricultores en producción, los mismo se enlistan en cuadro 5. El desarrollo del patógeno en el método directo se observó a los 15 días de siembra donde cubrió únicamente en un 4% de la caja Petri. Cuando se utilizó el método de cultivo trampa

se observó el crecimiento a los tres días después de la siembra *in vitro*, en un 15 % del área de la caja Petri. De acuerdo con lo anterior, la utilización de cultivos trampa permite simplificar la técnica y detectar al patógeno en menor tiempo.

Cuadro 5. Aislamientos puros de *Mortierella alpina* 2020.

Código	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud msnm
HM _{Ct} -01-20	San Andrés Semetabaj, Sololá	14°59'53''N	91°45'08'' W	2398
HM _{Cr} -02-20	Malacatancito, Huehuetenango	14°57'55''N	91°49'23'' W	1,709.34
HM _{Cr} -03-20	EFA San Marcos			2,398
HM _{Ct} -04-20	ICTA-CIALO, Olintepeque, Quetzaltenango.	14°39'22" N	90°53'06" W	2,350
HM _{Ct} -05-20	ICTA-CIALO, Olintepeque, Quetzaltenango.	14°39'22" N	90°53'06" W	2,350

Nota: subíndices indica el método usado para el aislamiento **ct** (cultivo trampa) y **r** (raíz). Los aislamientos corresponden a las localidades que se encuentran en el anexo 2. Fuente. Laboratorio de Protección Vegetal, Labor Ovalle Olintepeque, Quetzaltenango, 2021.

6.2.2. Purificación de las cepas aisladas

En la fase del aislamiento inicial donde se utilizó el medio PDA y V8 con antibióticos, aun se presentaron contaminantes. Para purificar el aislamiento fue necesario agregar un fungicida en el medio de cultivo y realizar dos a tres subcultivos con el fungicida para ir reduciendo la contaminación y suprimiendo el crecimiento de otros hongos (*fusarium*, *phytium*, y hongos saprofitos) y bacteria. Por otra parte, para eliminar contaminación se utilizaron medios de cultivo acidificados de Malta y PDA.

Como resultado se purificaron cinco aislamientos del patógeno en el medio PDA, utilizando la técnica de separación y transferencia de secciones del micelio del hongo a caja Petri con medio. Se transfirieron las cepas a medio nuevo cada ocho días, por el crecimiento acelerado.

6.2.3. Conservación de los aislamientos

Se confirmó que el procedimiento de conservación descrito por Molina *et al* (2016) aplicado en esta investigación fue satisfactorio. Por lo que, al término de seis meses el banco de aislamientos conservados se regeneró para confirmar su viabilidad. Basado en los resultados se concluye que el método de conservación en microtubos es una excelente alternativa de conservación para este patógeno.

6.2.4. Identificación morfológica

Se llevó a cabo utilizando las colonias monomicelial del patógeno en el medio de PDA, se colocó un disco de 5 mm en platos nuevos con medio para observar los patrones de crecimiento característico de la especie *Mortierella alpina*.

Las cinco colonias crecieron uniformemente en el medio PDA. Se observó el crecimiento micelial de forma algodonosa, color blanco en forma o patrón de crecimiento arrosada. El micelio observado fue cenocítico, con hifas coraloides, todo esto a nivel de género. Dichas características coincidieron con lo reportado por Hernández (1969) para el hongo *P. cinnamomi*, y *Mortierella*, donde explica que los dos hongos tienen una similitud en sus características morfológicas, como el crecimiento arrosado en forma de camelia, con micelio hialino, algodonoso.

La temperatura óptima para el crecimiento de *Mortierella* es de 28 °C, y el de *P. cinnamomis* entre 24°C a 28 °C. Según Watanabe (2010), el hongo *Mortierella sp*, de acuerdo con las características macro y microscópicas, tiene un crecimiento radial rosácea; el micelio cenocítico o tabicado; por lo general los esporangios son esféricos y ovalados, con un crecimiento rápido del micelio de forma algodonosa de color blanco, en algunos casos cambian de color blanco amarillo (Dedyukhuna et al 2014). Nicola *et al* (2017) descubrieron que el género de *Mortierella* coloniza raíces de las plantas y que está relacionado a enfermedades en plantas de manzano.

En la figura 8, se observan las comparaciones entre los aislamientos realizados en este estudio y los dos géneros de la pudrición radicular (*P. cinnamomi* y *Mortierella alpina*) reportados; es notorio que existe mucha similitud entre dichas características

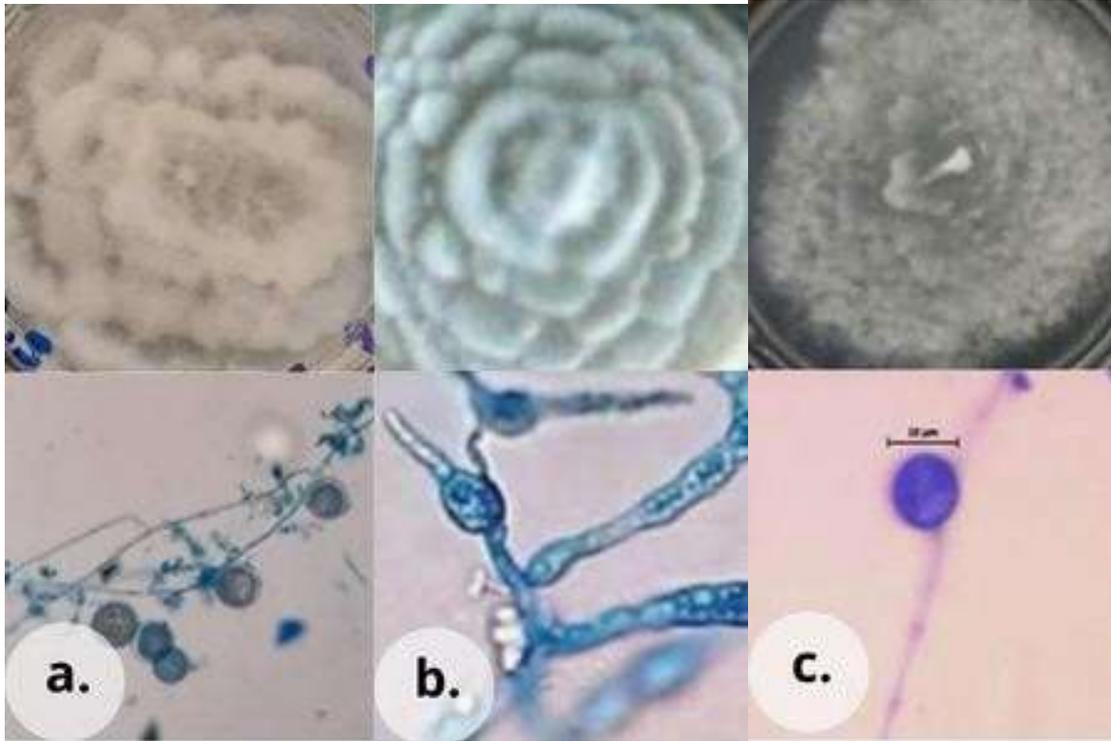


Figura 8. Morfología comparativa de a) características macros-microscópicas de *M. alpina*; b) características macros-microscópicas de *P. cinnamomi*, de raíces de aguacate; c) *Mortierella alpina* tomada de Hernández 2018.

6.2.5. Caracterización molecular

La amplificación 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 cebadore EF-como se ve en la figura 9.

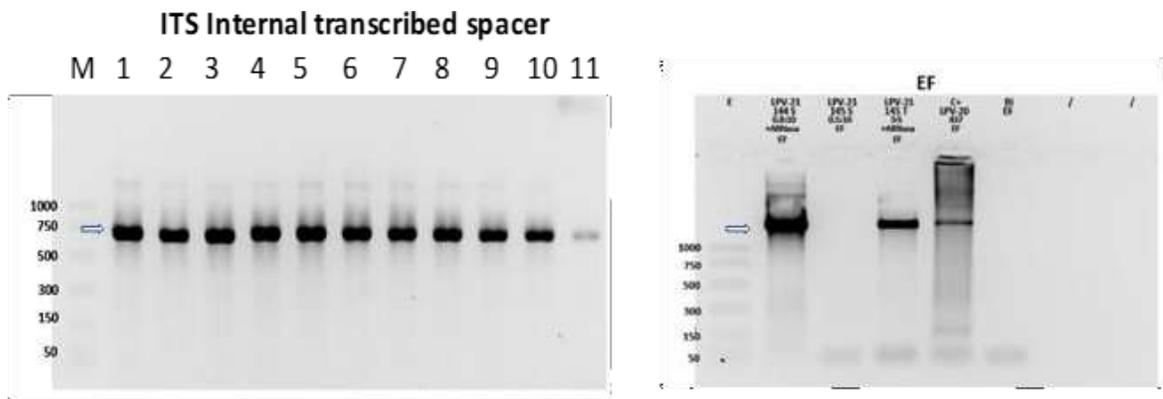


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1%) obtenida de ITS 1/ITS4, M-marcador de peso molecular.

Como resultado, de acuerdo con su homología, alineamientos en la base de datos del NCBI-BLAST, y la caracterización morfológica, se muestra una estrecha relación genética entre los cinco aislamientos identificados como *Mortierella alpina*, con una identidad entre 99.67 % y 99.84 % entre las cepas aisladas (cuadro 6).

Cuadro 6. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA 2020.

Código de muestra	Localidad colectada de la muestra	Identificación	Porcentaje de similaridad
HP _{Ct} -01-20	San Andrés semetabaj, Solola.	<i>Mortierella alpina</i>	99.82 %
HP _{Cr} -02-20	Malacatancito, Huhuetenango.	<i>Mortierella alpina</i>	99.83 %
HP _{Cr} -03-20	EFA, San Marcos	<i>Mortierella alpina</i>	99.67 %
HP _{Ct} -04-20	Plantas de vivero de Chimaltenango.	<i>Mortierella alpina</i>	99.82 %
HP _{Ct} -05-20	Planta de vivero de Chimaltenango	<i>Mortierella alpina</i>	99.84 %

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

6.3. Resultados fase 3

6.3.1. Inoculación de plántulas de aguacate con *Mortierella alpina*

Para la prueba de inoculación se utilizó el aislamiento con mayor crecimiento *in vitro*, el cual que se inoculo 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. Los síntomas se observaron dos semanas después de la inoculación, 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 penetro en el tejido vegetal por sí solo, observando síntomas en los diferentes materiales evaluados y signos del patógeno esto se puede apreciar en figura 10.



Figura 10. Crecimiento de la necrosis en los diferentes tallos de aguacate, siendo los materiales susceptibles (Retalhuleu y Hass).

Estos resultados son semejantes con a 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. (figura 11). Este es el primer reporte de *M. elongata* como patógeno asociado a la enfermedad de pudrición radicular en aguacate.



Figura 11. Síntomas de pudrición de *M. elongata*.
Fuente: Tomada de Hernández (2016)

6.3.2. Evaluación de tolerancia

Basado en las evaluaciones de la severidad del patógeno cada 15 días después de la inoculación, se encontró que la severidad aumentó entre septiembre y diciembre, es decir 110 días después de la inoculación. Como se observa en figura 11, la infección aumenta en la herida del tallo, donde el testigo susceptible Hass muestra 99.33 % de infección, siendo el de mayor grado de severidad.

Por otro lado, ICTA-El Rincón IV alcanzó una infección del 10 %, seguido de los ecotipos ICTA-Cábrican XVII, e ICTA-Santa María I. Los ecotipos susceptibles con 100% o más de área absoluta de infección fueron Hass e ICTA-Retalhuleu V. El patógeno causó síntomas visibles a los 8 días después de la inoculación en los materiales susceptibles.

La curva del desarrollo de la severidad concuerda con Ramírez (2013), cuando inoculó diferentes materiales de aguacate observó un crecimiento acelerado de la infección el primer mes de la inoculación, acumulando la tasa de variación, en todo el período de evaluación.

Porcentaje de severidad de *Mortierella alpina*

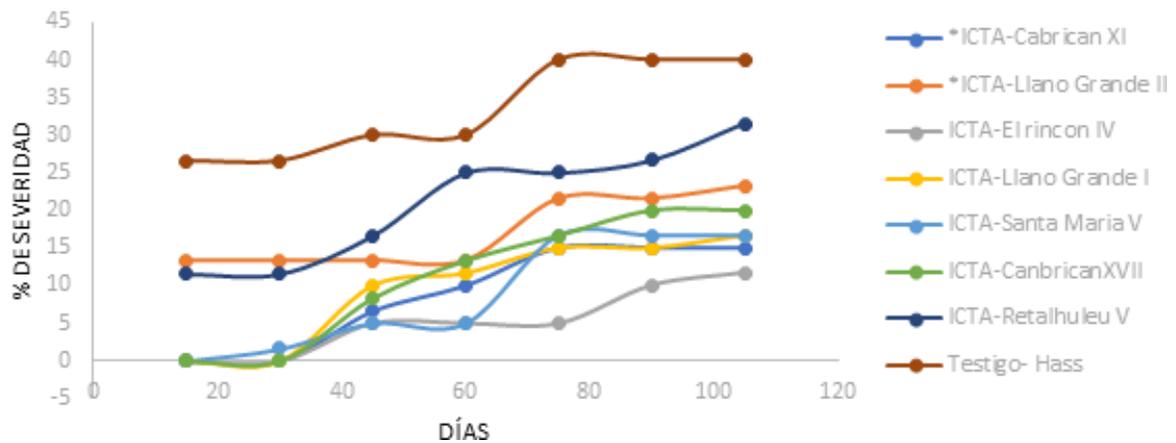


Figura 12. Porcentaje de severidad a la inoculación de cinco ecotipos de aguacate criollo con *Mortierella alpina*, 2020

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.

Posteriormente se indican los valores obtenidos de la estimación del AUDPC, para los cinco ecotipos de aguacate y el testigo Hass (figura 13). Se observa claramente la separación de los grupos que presentan resistencia, tolerancia y susceptibilidad. El material ICTA-El Rincón IV, fue resistente por tener un valor de 15.42 % de infección comparado con el testigo, Hass que presentó 99,33 % de (AUDPC)

Le sigue el material susceptible ICTA-Retalhuleu V, con 63.26 % de infección, dichos valores son el promedio de ocho repeticiones por material. Los materiales de aguacate que presentaron valores superiores al 90 % de infección se consideran susceptibles y los que se encuentren por debajo de 50 % se consideran tolerantes a la infección del patógeno *Mortierella alpina*. Nicola *et al.*, (2017) descubrieron que el género *Mortierella* es un

hongo asociado a la colonización de las raíces de las plantas y que generalmente se asocia con enfermedades de raíz en plantas de manzana y aguacate. Los ecotipos de aguacate resistente y tolerante deben ser evaluados con otros patógenos asociados a la enfermedad de la pudrición de raíz del aguacate, pues únicamente podemos decir que se consideran como posibles patógenos de aguacate para la región del occidente de Guatemala.

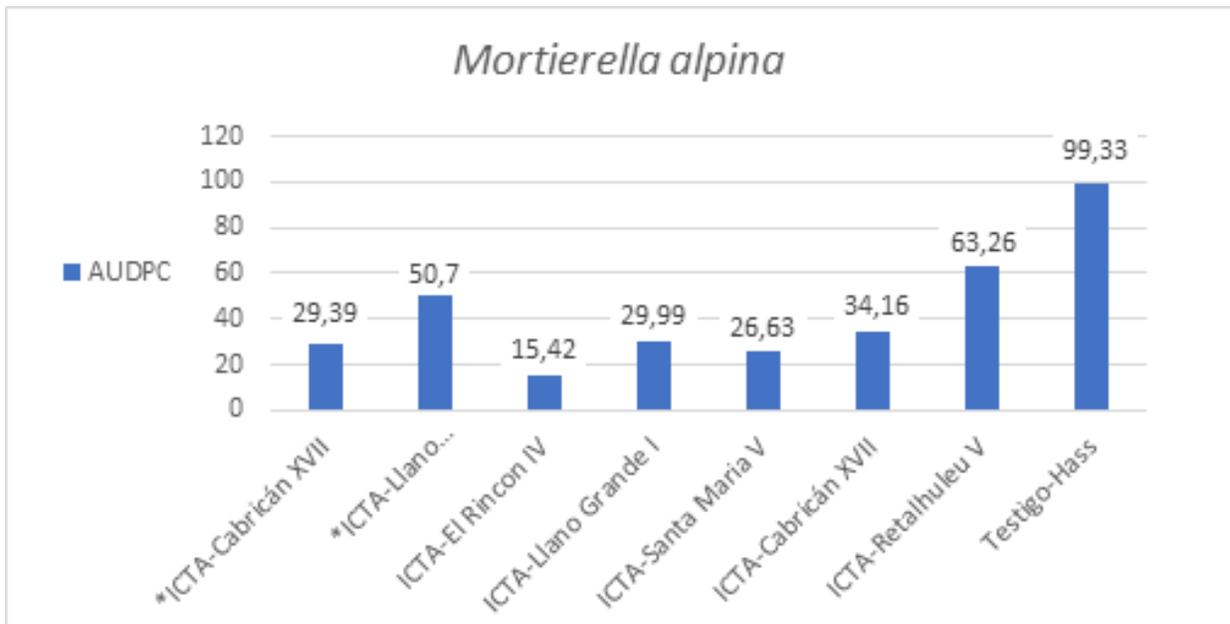


Figura 13. Efecto del daño de la pudrición radicular del aguacate (AUDPC) causado por *Mortierella alpina*.

7. Conclusiones

- Se estableció un protocolo funcional para el aislamiento y conservación de *Mortierella alpina* a partir de muestras de suelo y raíces infectadas utilizando cultivo trampa.
- Se identificaron y conservaron cinco aislamientos de *Mortierella alpina*, identificado como el patógeno causante de la pudrición radicular en las áreas evaluadas del occidente de Guatemala. Esto se comprobó mediante la inoculación de herida al tallo de plantas.
- De los cinco ecotipos criollos de aguacate inoculado con *Mortierella alpina*, ICTA-El Rincón IV presentó resistencia a la infección del patógeno con 15.42 % de AUDPC; luego ICTA-Santa María I e ICTA-Cábrican XVII con 26.63 % y 34.16 % de AUDPC, respectivamente, considerados como tolerantes.
- Los 5 aislamientos del patógeno en el suelo y raíces de aguacate enfermas se identificaron genéticamente como *Mortierella alpina*, con un porcentaje de similitud entre 99.67 % a 99.84 % respectivamente.

8. Recomendaciones

- Continuar la identificación de diferentes patógenos del suelo causantes de la pudrición radicular y otras enfermedades en aguacate.
- Continuar con las evaluaciones de resistencia a *Mortierella alpina* con otros ecotipos criollos de aguacate seleccionados como posibles patrones de aguacate.
- Evaluar los otros cuatro aislamientos de *Mortierella alpina* obtenidos en el laboratorio de Protección Vegetal-ICTA con los tres ecotipos criollos de aguacate que resultaron tolerantes a la inoculación.

9. Referencias bibliográficas

- Agrios, GN. 2010. Fitopatología 2ª ed. Editorial Lemus. México D. F. 856p.
- Becerra, B. (Periódico el sol de México). 2021. Aumento producción de aguacate para consumo nacional y exportación. Ciudad de México. Consulta 12 de sept de 2021. Finanzas - El Sol de México | Noticias, Deportes, Gossip, Columnas (elsoldemexico.com.mx).
- Ben, A. 1992. A Study of avocado germoplasm resources, 1988 – 1990. 11 – Finding from the central parts of Mexico. Proa. Of second World avocado congreso 1992. 543 p.
- Benítez, RC. Cardozo LA; Hernández Ch. L; Lapp M. y Rodríguez H. 2006. Botánica sistemática, fundamentos para su estudio Universidad Central de Venezuela. 17-19 p.
- Coemans, E. 1863. Quelques hyphomycetes nouveaux. 1. *Mortierella polycephala* y *Martensella pectinata*. *Bull Acad R Sci Belg Cl Sci* 2. 1863;15: 536–544.
- Dann, E; Forsberg, L; kooke, A; Pegg, K; Shivas RP; & Tan, Y. 2011. The 'Cylindro' complex of avocado root pathogens. En: VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns. Memorias, editado por avocadosource. P.1-12.
- Dedyukhina EG; Chistyakova, TI; Mironov, AA; Kamzolova, SV; Morgunov, IG; and Vainshtein, MB. 2014. Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116:429-437. Consultado 4 de sept de 2021 <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300358>
- Del Río, JA.; González, A; Fuster, MD; Botía, JM; Gómez, P; Frías, V; and Ortuño, A. 2002. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathology Mediterranean*. 40: S394-S399.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea). 2008. Decisión de la comisión y Autorización de comercialización de aceite rico en ácido araquidónico procedente de *Mortierella alpina*. Reglamento (CE) no 258/97 del parlamento europeo y del consejo. 43-44 p.
- Douhan GW; Fuller, E; Mckee B. 2011. Análisis genético de la diversidad de portainjertos de raíz de aguacate (*Persea americana* Miller) seleccionados bajo condiciones de invernáculo para la tolerancia a la pudrición de raíz de *Phytophthora* (PRR) causada por *Phytophthora cinnamomi*, Departamento de patología botánica y microbiología, universidad de california, VII Congreso mundial de Aguacate. Consultado 8 de sept de 2021

http://www.congresomundialdelaguacate2011.com/userfiles/file/Congress%20Proceedings_v3.pdf.

- Drenth, A; Wales, G; Smith, B; Sendall, B; & Irwin, J. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology*. P 147-159.
- Edel. 1998. Identificación microbiana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología bacteriana, Universidad de Oviedo. España, *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(4):238-45.
- Forbes, GA; Pérez W; Andrade, PG; 2014. Evaluación de la Resistencia en genotipos de papa a *Phytophthora infestans*, bajo condiciones de campo. Guía para colaboradores internacionales. Centro internacional de la papa (CIP). 17-31.
- Gabor, B; y Coffey, M. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. *Plant Dis*. p 118-120.
- Gándara, N. 2016. Baja producción de aguacate por segundo año. Prensa libre. Consultado 5 ago 2021. <https://www.prensalibre.com/economia/sigue-otro-ao-con-baja-produccion-de-aguacate/>
- 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.
- Godínez, M; Martínez, M; Melgar, N; Méndez, W. 2000. El cultivo del aguacate en Guatemala. 1ª Edición. PROFRUTA, MAGA, Guatemala. 35 P
- Hernández, A. 2018. Primer reporte de *Mortierella elongata* como patógeno del cultivo de aguacate en Michoacán, México. *Scientia Fungorum Volumen* 48. P95-98.
- Jaramillo, J; Mejía A; Villamizar, P; Orozco, M; Arenas A. 2009. Informe Final del Proyecto: Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a *Phytophthora* spp. CIAT, CORPOICA, PROFRUTALES. Palmira, Valle del Cauca, p. 40-44.
- Li, W; Abad, J; French; & Monar, RD. 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of *Candidatus liberobacter solanacearum* in potato plants with zebra chip. *Publications from USDA-ARS/UNL Faculty*. 59-65 P.

- López, HC. 1989. Podredumbre radicular del aguacate en la costa del sol. Badajoz, Epain. P 172-176
- Martin, KJ; Rygiewcz, PT. 2005. Fungal specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology 5: 28-39.
- Menge, JA. 1994. Strategies to control *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Department of Plant Pathology, University of California Riverside CA 9:25-21.
- ME (Ministerio de economía). 2017. Estudio de mercado de Estados Unidos Aguacate. Informe 2017, Guatemala 24 p.
- Nei, M; y Li, WH. 1979. Modelo matemático para el estudio de variaciones genéticas en términos de restricción endonucleasas. Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, 76, 5269-5273.
- Nicola, L; turco, E; Albanese, D; Donati, C; Thalbeimer, M; Pindo, M; Cavalier ID; and Pertot I. 2017. Fumigation with dazomet modifies soil microbiota in apple orchards affected by replant disease, Applied soil Ecology 113; 71-79. Consultado 6 de sept de 2021 <https://doi.org/10.1016/j.apsoil>.
- Ovalle, JD. 2011. Diagnóstico patológico y caracterización molecular de *Phytophthora cinnamomi*, en el cultivo de Aguacate, Guatemala. Editorial universitaria. 67p.
- Pallas, V; Escobar. C; Rodríguez. P; Marcos, J. 2008. Herramientas Biotecnológicas en fitopatología, Edición mundi Prensa, Madrid. P. 169, 191-192.
- Ramírez, GJ. 2013. Tesis Invidencia, diagnóstico, comportamiento y alternativa de manejo de la marchitez del aguacate con énfasis en *Phytophthora cinnamomi* Rands. Universidad Nacional de Colombia. Medellín Colombia. 189 p.
- Rayaroth, A; Tomar, RS; and Mishra; RK. 2017. Arachidonic acid synthesis in *Mortierella* alpine; Origin, evolution and advancements. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences, 87:1053-1066. Consultado 11 de sept 2021 <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0714-2>
- Robin, C; Desprez, M. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. Eur. J. Plant Pathol. P 104- 465-475.
- Rosales, VM; Peña, E; Medina, C; Mora, R; Araya, C. 2009. Fitopatología Molecular. Mecanismos y Aplicación. INLA Tierra adentro. P. 24-25.

- Roxana, L. 2015. Ada Promueve la venta de Aguacate. Consultado 10 de sept 2021.
<https://WWW.prensalibre.com/tag/Aguacate/55788>.
- Ruiz, MF; Rios, VC; Berlanga, DI; Ornelas, JJ; Acosta, CH; Romo, A; Zamudio, PB; Pérez, DA; Salas, MÁ; Ibarra, RE; and Fernández, SP; 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35:437-462. Consultado 4 de jul 2021.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Tamayo, P. 2007. Enfermedades del Aguacate. Ponencia presentada en el marco del Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate - noviembre 2006. *Politécnica No. 4. Medellín*. pp. 51-70
- Téliz, OD; Mora, AA. 2007. Enfermedades del aguacate y su manejo integrado. Edición mundial-Prensa, Méx P171-208.
- Vásquez, SJ. 2006. Identificación de Aguacates nativos y formación de jardines clonales con aguacate nativos seleccionados. *Agrocyc. Guatemala*. P. 33-61.
- Vásquez, BM. 1984. Cultivo de Aguacate. Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, Guatemala. P 13-76.
- Vidales, JA; y Alcántar, JJ. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands) del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 5:255-259.
- Vleeshouwers, V; Van, WV; Govers, F; Kamoun, S; and Colon, LT. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*. 210:853-864.
- Wang, L; Chen, W; Feng, Y; Ren, Y; Gu, Z; Chen, H; Wang, H; Thomas, MJ; Zhang, B; Berquin, IM. et al. 2011. Caracterización del genoma del hongo oleaginoso *Mortierella alpina*. 6: e28319. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed]
- Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Boca Raton: CRC Press. p. 397.
- Zentmyer, GA; Schieber, E. 1992. *Persea* and *Phytophthora* in Latin America. Proc. of Second World Avocado Congress 1992, pp 61-66.

10. Anexos

Anexo 1. Base de datos de localidades de semillas de aguacate utilizadas, 2020

Código	Accesión	Productor	Comunidad	Municipio	Departamento	Siembra	Latitud	Longitud	Altitud msnm
Pa-01-20	* ICTA Cabricán XVII	Amilcar López Baten	Aldea Flor de Peña	Cabricán	Quetzaltenango	15 en bolsas en vivero y 10 en macetas en invernadero.			2300
Pa-02-20	**ICTA-Llano Grande II	Roberto Ramírez	Aldea Llano Grande	San Pedro	San Marcos	15 en bolsa en vivero y 8 en macetas en invernadero	16°51'11"N	15°63'45"E	2000
Pa-03-19	ICTA- El Rincón IV	Candelaria de Morales	Aldea El Rincón	San Martín	Quetzaltenango	15 en bolsa vivero y 10 en maceta en invernadero.	1637280 N	15°64'0514"E	1,724
Pa-04-19	ICTA- Llano Grande I	Roberto Ramírez	Aldea Llano Grande	San Pedro	San Marcos	15 en bolsa en vivero y 8 en macetas en invernadero	16°51'11"N	15°63'45"E	2000
Pa-05-19	ICTA-Santa María V	Raymunda Chim	Santa María de Jesús	Zunil	Quetzaltenango	15 en bolsas en vivero y 10 en macetas en invernadero.	16°28'81"N	15°65'88"E	1581
Pa-06-19	ICTA Cabricán XVII	Amilcar López Baten	Aldea Flor de Peña	Cabricán	Quetzaltenango	15 en bolsas en vivero y 10 en macetas en invernadero.	15°04'33"N	91°39'46" W	2300
Pa-07-19	ICTA Retalhuleu V	Canuto Machic	Calzada Las Palmas	Retalhuleu	Retalhuleu	12 en bolsa en vivero y 10 en maceta en invernadero	16°09'38"N	15°64'49"E	300

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

Nota. * ICTA Cabricán XVII proviene de la planta madre de ICTA Cabricán XVII de Flor de Peña Cabricán y **ICTA-Llano Grande II proviene de la planta madre de Llano Grande I.

Anexo 2. Localidades y número de muestras de suelo y raíz colectadas en los departamentos obtenidas en parcelas de aguacate.

Código	Localidad	Submuestras	Plantas	Suelo	Raíz	Planta	Latitud	Longitud	Altitud msnm
HPc-01-19	San Andrés Semetabaj, Sololá	24	6	X	X		14°59'53"N	91°45'08" W	2398
HPc-02-19	Jacaltenango (1), Huehuetenango	8	2	X	X				2,600 msnm
HPc-03-19	Jacaltenango (2), Huehuetenango	8	2	X	X				2,600 msnm
HPc-04-19	Aldea La Federación, San Marcos	4	1	X	X				2,398 msnm
HPc-05-19	San Martín, Chile Verde	4	1			X			2,490 msnm
HPc-06-19	Malacatancito, Huehuetenango	4	1			X			1,709.34 msnm
HPc-07-19	EFA San Marcos	3	3			X	14°57'55"N	91°49'23" W	2,398
HPc-08-19	San José Cabén, San Marcos.	16	4	X	X		14°59'53"N	91°45'08" W	2398
HPc-09-20	El Plan Zaragoza, Chimaltenango.	20	5	X	X		14°39'14"N	90°52'52" W	1,849
HPc-10-20	Laboratorio de Biotecnología, ICTA- CIALO, Olintepeque, Quetzaltenango.	10	10			X	14°39'22" N	90°53'06" W	2,350
HPc-11-20	El Tumbador, San Marcos.	8	2	X	X				931 msnm "

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

Anexo 3. Protocolos de aislamiento, conservación y reactivación del patógeno

1. Protocolo de cultivo trampa (manzana verde) para aislar *Phytophthora cinnamomi*

Los pasos para llevar a cabo este método son:

- Desinfección de manzana en agua durante 30 minutos bajo el grifo, remojar en alcohol al 70% durante 3 minutos y se lavaron con agua estéril.
- Tamizar el suelo y humedecer con agua destilada estéril previo a sembrar en el cultivo trampa (manzana verde ya desinfectada).
- Selección de raíces y raicillas con coloración rojizas; lavar durante 1 hora bajo el agua del grifo; desinfectar con cloro al 10%, 8 gotas de Tween-20 y benomil (50%) durante 45 minutos en un agitador magnético. Descartar el líquido de la desinfección, lavar 3 veces con agua destilada estéril; dejar en cloro al 10% durante 10 minutos; lavar 3 veces con agua destilada estéril, dejar en alcohol al 70% por 30 segundos; por último, lavar tres veces en agua destilada y cortar las raíces y raicillas desinfectadas en segmentos 3 mm aproximadamente.
- Realizar 4 orificios alrededor de la manzana, llenarlos con suelo tamizado y humedecido y/o raíces/raicillas desinfectadas y cortadas (utilizar 2 o 3 manzanas por material). Cubrir los orificios con masking tape y dejara las manzanas en cámara húmeda a temperatura ambiente por 3 -7 días aproximadamente (los días pueden variar según el avance de la infección generada por el patógeno), verificar la humedad de la tierra todos los días, si es necesario humedecer utilizar agua estéril.
- Al cumplir con el tiempo de infección en el cultivo trampa se procede a sembrar pedazos de manzanas infectadas (los segmentos se deben tomar donde inicia la infección ya que si la infección está avanzada se contaminan con mayor facilidad), los segmentos se cortan de 2 mm² aproximadamente o más pequeños, se dejan secar 45 minutos en papel mayordomo estéril y se siembran en medio de cultivo malta acidificado, PDA acidificado, corn agar con antibiótico e hymexazol y rosa de bengala antibiótico e hymexazol.

2. Raíces en cámara húmeda, para aislar *Phytophthora cinnamomi* / *Mortiellera*

Selección de raíces y raicillas con coloración rojizas; lavar durante 1 hora bajo el agua del grifo; desinfectar con cloro al 10%, 8 gotas de tween 20 y benomil durante 45 minutos en un

agitador magnético. Descartar el líquido de la desinfección, lavar 3 veces con agua destilada estéril; dejar en cloro al 10% durante 10 minutos; lavar 3 veces con agua destilada estéril, dejar en alcohol al 70% por 30 segundos; por último, lavar tres veces en agua destilada tres veces. Dejar secar las raíces mayordomo estéril durante 10 minutos y dejarlas en cámara húmeda.

Al transcurrir dos días observar en el estereoscopio para ver si creció micelio y hacer montajes antes de sembrar en medio de cultivo. Cortar las raíces que presentan crecimiento micelar y estructuras del patógeno de interés en medio de cultivo malta acidificado, PDA acidificado, corn agar con antibiótico e hymexazol y rosa de bengala antibiótico e hymexazol.



3. Protocolo de conservación y reactivación.

Los cultivos puros se pueden conservar en microtubos con capacidad de 1.5 ml y agua destilada estéril. Añadir 1.2 ml de agua destilada estéril (5 tubos por muestra), coloca cada tubo 12 segmentos (cuadros de 5 mm² aproximadamente), sellar los tubos con Parafilm® y empacar con papel aluminio, dejar los tubos en obscuridad a temperatura ambiente durante 6 meses o más tiempo (según la contaminación), al cumplir el tiempo reactivar y secar los segmentos durante 45 minutos.

4. Protocolo de producción y cosecha de micelio en medio líquido del oomicete *Phytophthora cinnamomi*.

Los pasos a seguir son:

- Preparar tres Erlenmeyer por muestra previamente esterilizados, añadir 50 ml de medio líquido estéril. Los aislamientos crecidos durante 7 días en medio PDA deben estar libre de contaminantes para ejecutar la producción y cosecha de micelio de patógeno.
- Con la pipeta pasteur se toman 5 ml del medio líquido de cada Erlenmeyer por muestra a evaluar, depositar el medio sobre el micelio en crecimiento en la caja Petri y raspar la superficie para suspender el micelio y las esporas del aislamiento y distribuir la suspensión en los Erlenmeyer de donde se sustrajo el medio líquido.
- Cubrir los Erlenmeyer con tapones de algodón con gasas, papel craft y papel aluminio (previamente esterilizados) y sellar con papel fill la boquilla del frasco. Dejar los Erlenmeyer con la suspensión en un agitador orbital a 100 rpm, durante 8 a 12 días (el tiempo puede variar según el crecimiento micelar). Observar diariamente para descartar frascos con contaminación (el medio debe permanecer cristalino).
- Al cumplir el tiempo se procede a la cosecha del micelio (o según el desarrollo del micelio). Quitar el tapón, flamear la boquilla antes de filtrar el micelio. Se filtra el micelio utilizando un embudo, papel filtro estéril y frasco que captara el líquido a descartar.
- Secar el micelio cosechado en papel toalla estéril y cortar en trozos de 5 mm² aproximadamente, dejar secar en papel aluminio estéril durante 20 minutos (hacer un poco de precio con papel toalla estéril sobre los pedazos que se están secando para eliminar poco a poco el líquido) y almacenar a - 20°C en tubos microtubos de 1.5 ml estériles y rotulados.



Anexo 4. Elaboración de medios de cultivo y antibióticos

A continuación, se describen las recetas para poder realizar los diferentes medios de cultivo utilizados en la investigación.

Medios de cultivo más antibiótico

Corn Agar

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Corn agar	1.7 gr	2.55 gr	3.4 gr	4.25 gr	5.1 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Preparación:

Se disuelve la cantidad en gramos de corn-agar, de acuerdo con el volumen requerido con agua destilada, se pone a coser en una estufa con agitador, hasta que se torne transparente el

medio y se esteriliza en autoclave, por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Cuando el medio se encuentre a 40 °C, se agrega el antibiótico y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

PDA

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Potato Dextrose Agar (PDA)	3 gr	4.5 gr	6 gr	7.5 gr	9 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Procedimiento:

Se disuelve la cantidad en gramos de PDA de acuerdo con el volumen requerido con agua destilada. Se coce el medio en una estufa con agitador, hasta que se ponga transparente el medio y se esteriliza en autoclave, por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Cuando el medio se encuentre a 40 °C se agrega el antibiótico y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

Medio de cultivo - jugo V8

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Jugo V8	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml	60 ml
CaCo3	0.3 gr	0.45 gr	0.6 gr	0.75 gr	0.9 gr
Agar-agar	1.5 gr	2.25 gr	3 gr	3.75 gr	4.5 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Procedimiento:

Se centrifuga en tubos de ensayo de 15 o 25 ml; 28 ml de jugo V8 (para obtener 20 ml de V8 clarificado para 100 ml de volumen total de medio) y se pesa 0.3 gr de CaCo3 y se disuelve en 10 ml de agua destilada, luego se centrifuga a 70 rpm durante 20 min, se decanta en una probeta el jugo V8 clarificado hasta obtener 20 ml y se le agrega la solución obtenida del CaCo3 descartando la parte que se precipita en el tubo, se afora con agua destilada hasta llegar a 100 ml, y se disuelve 1.5 gr de agar - agar, se procede a cocer en una estufa con agitador hasta que este transparente el medio y se esteriliza en autoclave, por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Cuando el medio se encuentre a 40 °C, se agrega el antibiótico y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

Medios de cultivo acidificados

PDA con ácido láctico.

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Potato Dextrose Agar (PDA)	3 gr	4.5 gr	6 gr	7.5 gr	9 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Procedimiento:

Se disuelve la cantidad en gramos de PDA, de acuerdo con el volumen requerido con agua destilada, se pone a coser en una estufa con agitador, hasta que se torne transparente el medio y se esteriliza en autoclave, por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Cuando el medio se encuentre a 40 °C, se agrega el ácido y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

Medio Malta Acidificada

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Extracto de malta	3 gr	4.5 gr	6 gr	7.5 gr	9 gr
Peptona	0.3 gr	0.45 gr	0.6 gr	0.75 gr	0.9 gr
Agar-agar	1.5 gr	2.25 gr	3 gr	3.75 gr	4.5 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Procedimiento:

Se disuelve la cantidad en gramos de cada reactivo, de acuerdo con el volumen requerido con agua destilada, se pone a coser en una estufa con agitador, hasta que se torne transparente el medio y se esteriliza en autoclave, por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Cuando el medio se encuentre a 40 °C, se agrega 1.5 ml de ácido ya preparado y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

Medio Rosa de Bengala

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Extracto de papa	1.25 gr	1.87 gr	2.50 gr	3.12gr	3.74 gr
Rosa de bengala	3 gr	4.5 gr	6 gr	7.5 gr	9 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Procedimiento:

Se ponen a hervir los gramos requeridos de extracto de papa (tubérculo de papa sano) hasta que se cosa se cuele y se afora con agua destilada, se añade rosa de bengala según volumen a preparar, se pone a cocer en una estufa con agitador, hasta que se observe transparente y se procede a esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Al tener el medio estéril, cuando el medio se encuentre a 40 °C, se agrega 1.5 ml de ácido ya preparado y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

Medio líquido para la producción de micelio

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Desxtrosa o sucrosa	2 gr	3 gr	4 gr	5gr	6 gr
Extracto de levadura	0.5 gr	0.75 gr	1 gr	1.25 gr	1.5 gr
Peptone	0.5 gr	0.75 gr	1 gr	1.25 gr	1.5 gr
Agua destilada	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

Procedimiento:

Se disuelven los gramos correspondientes de los ingredientes según medio a preparar en ml de agua destilada o agua desmineralizada, se pone a cocer en una estufa con agitador en agua tibia hasta que todos los ingredientes estén disueltos y se procede a esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C, con una presión de 15 psi. Al tener el medio estéril, cuando el medio se encuentre a 40 °C, se agrega el ácido y se sirve en cajas o tubos de ensayo.

Preparación de ácido láctico y antibióticos**Ácido láctico.**

Ingredientes	Volumen				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Ácido láctico	1.2 ml	2.4 ml	3.6 ml	4.8 ml	6 ml
Agua destilada estéril	8.8 ml	17.6 ml	26.4 ml	35.2 gr	44 gr

Procedimiento:

Para preparar 10 ml de ácido, se toma una pipeta de 5 ml y se mide 1.2 ml de ácido láctico y se disuelve en 8.8 de agua estéril a temperatura ambiente y se guarda a 4°C, por un tiempo máximo de 30 días.

Antibiótico utilizado

Ingredientes	Volumen de medio				
	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml
Vancomicina	0.01 gr	0.015 gr	0.02 gr	0.025 gr	0.03 gr
Ampicilina	0.027 gr	0.04 gr	0.054 gr	0.067 gr	0.081 gr
Ryfampicina	0.002 gr	0.003 gr	0.004 gr	0.005 gr	0.006 gr
Benlate	0.01 gr	0.015gr	0.02gr	0.02.5gr	0.03 gr
Agua destilada estéril	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Etanol	5 gotas	5 gotas	5 gotas	5 gotas	5 gotas

Procedimiento:

Se pesa cada ingrediente por separado, luego se le añade a cada uno 5 gotas de etanol, posteriormente se le agrega a todos 0.5 ml de agua estéril para disolverlos y se centrifuga durante 20 min a 70 rpm, se decanta el sobrenadante en un tubo de 15 o 25 ml descartando el precipitado de cada tubo. Se afora con agua destilada estéril para completar 3 ml.

Anexo 4. Crecimiento de micelio en medio PDA, V8 y corn agar.

Código	Medio	Tiempo de desarrollo (días)	Crecimiento promedio en (mm)	Patrón de la colonia
HMp-c _{ct} -01-20	CORN AGAR	7	0.67	Rosaceo
	V8	7	4.02	Rosaceo
	PDA	7	5.79	Rosaceo
HMp-c _r -02-20	CORN AGAR	7	0.78	Rosaceo
	V8	7	4.06	Rosaceo
	PDA	7	7.09	Rosaceo
HMp-c _r -03-20	CORN AGAR	7	2.41	Rosaceo
	V8	7	4.48	Rosaceo
	PDA	7	8.17	Rosaceo
HMp-c _{ct} -04-20	CORN AGAR	7	2.01	Rosaceo
	V8	7	4.54	Rosaceo
	PDA	7	6.42	Rosaceo
HMp-c _{ct} -05-20	CORN AGAR	7	1.65	Rosaceo
	V8	7	4.57	Rosaceo
	PDA	7	10.46	Rosaceo

Fuente. Laboratorio de Protección Vegetal, Labor Ovalle Olintepeque, Quetzaltenango. 2021.

Anexo 5. Protocolos de extracción de ADN

Método 1 de extracción de ADN

Preparación de reactivos método 1

- 20 ml de buffer de extracción: disolver cada reactivo por separado en 3ml de dH₂O estéril, pesar 1.2 gramos de D-sorbito al 0.34M; pesar 0.24 gr de Tris-HCl al 0.1M con pH 7.6-8.0 esterilizar, pesar 2.88 gr de EDTA al 0.5M se esterilizó; mezclar y aforar con dH₂O, almacenar a temperatura ambiente, un día antes de usar el buffer de extracción se añade 2 µl v/v 2 mercaptoetanol al 0.2%.
- 20 ml de buffer de TE: disolver cada reactivo por separado en 3ml de dH₂O estéril, pesar 0.24 gr de Tris-HCl al 0.1M con pH 7.6-8.0 se esterilizó, pesar 0.074 gr de EDTA al 0.01M se esterilizó; mezclar y aforar con dH₂O.

Protocolo de extracción de ADN método 1

- El micelio cosechado se pulverizó utilizando nitrógeno líquido y se almaceno a -20 ° C.
- Añadir 400 µl de solución buffer de extracción en los tubos que contienen micelio pulverizado para romper la pared celular, macerar y homogenizar el micelio con la solución extractora usando un pistilo de kontes o mortero.
- Agitar el tubo en vortex con el contenido macerado durante 20 segundos para homogenizar la mezcla del micelio con la solución extractora.
- Dejar en reposo el tubo con el contenido durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar el micelio macerado, transferir el sobre nadante a un tubo nuevo con capacidad de 1.5 ml de capacidad.
- Agregar 300 µl de solución isopropanol al 95% y mezclar de arriba y abajo.
- Centrifugar a 12, 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar el ADN del micelio
- Lavar el ADN con 100 µl de una solución de etano al 70%, desechar la solución de etano al 70% con el cuidado de no perder el ADN al momento de transferir la solución. Los tubos

que contienen el ADN son colocados en un papel mayordomo para que se volatilice el resto de etanol al 70%.

- Agregar 50 μ l de la solución buffer de TE y se espera que el pellet se diluya el ADN, los tubos que contienen el ADN son colocados en el refrigerador a una temperatura de -20 °C.

Método 2 protocolo de extracción de ADN

Preparación de reactivos método 2

- 20 ml de buffer de extracción: SDS al 1% disolver 0.2 gr en dH₂O guardar a temperatura ambiente, adicionar al buffer de extracción cuando se use y ajustar el volumen de la solución; NaCl al 0.5M disolver 0.58gr en dH₂O, esterilizar; Tris-HCl al 0.2M pH 7.5 disolver 0.48 gr en dH₂O, esterilizar, guardar a 4 °C; EDTA 10mM pH 8 disolver 0.074 gr en dH₂O; completar el volumen a 15 ml (para terminar de aforar con SDS 1%). Luego de mezclar se almacena a temperatura ambiente.
- 20 ml de buffer 1X TE pH 8: Tris-HCl al 10mM pH 7.5 disolver 0.24 gr en dH₂O, esterilizar; EDTA 1mM pH 8 disolver 0.074 gr en dH₂O estéril mezclar y completar el volumen a 20 ml y guardar a temperatura ambiente.
- 10 ml Acetato de amonio 7.5M: Pesar 5.78 gr de acetato de amonio al 7.5 M y disolver con un poco de en dH₂O estéril y aforar a 10ml de dH₂O estéril.
- 10 ml Acetato de sodio 3 M: Pesar 2.46 gr de acetato de sodio al 3 M y disolver con un poco de en dH₂O estéril y aforar a 10ml de dH₂O.

Protocolo de extracción de ADN método 2.

- Precalentar en baño maría el buffer de extracción a 65 ° C.
- Adicionar 2.1 μ l de proteinasa K y 700 μ l de buffer de extracción (precalentado) al tubo que contiene el micelio macerado con nitrógeno líquido, homogenizar la mezcla mediante vórtex e incubar al baño maría 65 ° C durante 1 hora (como mínimo), mezclar por inversión manualmente cada 20 o 30 minutos. Hay dos opciones en este paso:

* Después de la incubación agregar 0.5 volúmenes del acetato de amonio 7.5 M preparado antes, mezclar por inversión el tubo e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, ó.

* Después de la incubación mezclar nuevamente y agregar un volumen igual a 700 µl de solución de fenol: cloroformo: isoamialcohol (25:24:1) y mezclar en el vórtex, (Esta solución fenólica debe manipularse en cámara extractora de vapores).

- Centrifugar a temperatura ambiente a 12.000 rpm durante 10 minutos, rescatar el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar la interfase y pasarlo a un nuevo microtubo de 1.5 ml.
- Adicionar un volumen igual de la solución cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (la solución debe estar a temperatura ambiente cuando se use y manipularse en cámara extractora de vapores).
- Rescatar el sobrenadante y pasarlo a un nuevo microtubo de 1.5 ml.

* Paso adicional: agregar acetato de sodio 3 M pH 5.2 (1/10 de volumen del sobrenadante) y homogenizar manualmente por inversión.

- Agregar isopropanol frío en una relación 1:1 y homogenizar suavemente por inversión del tubo manualmente.
- Incubar a – 20 °C durante toda la noche.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante invirtiendo el tubo, tener cuidado de no perder el pellet de ADN.
- Lavar el pellet con 800 µl de etanol al 70% frío y centrifugarlo a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y secar el pellet por inversión del tubo a temperatura ambiente durante 45 minutos aproximadamente hasta que no se sienta el olor a etanol.
- Diluir el pellet en el buffer 1X TE ya preparado (usualmente 100 µl) añadiendo 2 µl de RNAasa 1 mg/ml e incubar a 37 °C durante una hora como mínimo.
- Recomendación: resuspender el pellet durante toda la noche a 4 °C con 1X TE y al día siguiente adicionarle la RNAasa; incubar luego a 37 °C.
- Almacenar el ADN a – 20 °C.

Anexo 6. Escala visual de incidencia a inoculación de *P. cinnamomi* en aguacate.



Fuente: Sánchez, 2018



CRIA



**GOBIERNO de
GUATEMALA**
DR. ALEJANDRO GIANMATTEI

MINISTERIO DE
AGRICULTURA,
GANADERÍA
Y ALIMENTACIÓN



Programa de consorcios de Investigación Agropecuaria