CienciAgro
JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
ISSN 2072-1404 (PRINTED) - 2077-317X (ON LINE)

CienciAgro (2015) 1: 57-63
Recibido: 9/09/15
Aceptado: 7/11/15
Artículo científico original
www.ibepa.org

Aislamiento e identificación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en el cultivo de palto variedades Hass y Fuerte

Isolation and identifecation of Phytophthora cinnamomi Rands in avocado crop, varieties Hass and Fuerte

Huaman Castilla N. L.[1]*, Valeriano Zapana J. A[1]., Granados Cuayla E. R.[1]

[1]*Universidad Nacional de Moquegua, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Moquegua, Perú.,*
**Autor para correspondencia: Prolongación Calle Ancash S/N. Moquegua, Perú. E-mail: nilefox@gmail.com*

Abstract

The avocado root rot caused by Phytophthora cinnamomi Rands happen very often in orchards located in clay soils saturated for long periods. This study aimed to characterize and identify the species of Phytophthora associated with avocado root rot in the fields belonging to the province of Mariscal Nieto in the region of Moquegua, Peru. We collected a total of 50 samples which were seeded in Medium acidified Potato Dextrose Agar incubated at room temperature. The samples were isolated and showed a whitish colonies with abundant aerial mycelium, cottony uniform or slightly petaloid growth. Also presented whitish mycelial formations petals mode, resulting in a colony type "rosette" with aerial mycelium sparse, all isolates showed a highly branched mycelia coenocytic, heterothallic with anfiginos pleróticas antheridia and oospores. Concluding that Phytophthora isolates obtained in this study were identified as P. cinnamomi.

Keywords: Isolation, identification, oregano, Phytophthora cinnamomi Rands.

Resumen

La tristeza del palto, causada por Phytophthora cinnamomi Rands ocurre muy a menudo en huertos ubicados en suelos arcillosos y saturados por periodos prolongados. El presente trabajo tuvo el propósito de caracterizar e identificar la especie de Phytophthora asociada a la tristeza del palto en los sectores pertenecientes a la provincia de Mariscal Nieto en la Región de Moquegua-Perú. Fueron colectados un total de 50 muestras las cuales fueron sembradas en Medio Agar Patata Dextrosa acidificado incubadas a temperatura ambiente. Las muestras fueron aisladas y presentaron colonias de una coloración blanquecina, con abundante micelio aéreo algodonoso y crecimiento uniforme o ligeramente petaloide. Así mismo presentaron formaciones miceliares blanquecinas a modo de pétalos, dando lugar a una colonia tipo "roseta", con micelio aéreo escaso, todos los aislados presentaron un micelio cenocítico muy ramificado, heterotálicos, con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas. Concluyéndose que los aislamientos de Phytophthora obtenidos en este trabajo se identificaron como P. cinnamomi.

Palabras clave: Aislamiento, identification, oregano, Phytophthora cinnamomi Rands.

INTRODUCCIÓN

Los estudios arqueológicos indican la presencia del aguacate en México en el año 8000 a. C. y en Perú hacia el 3000-4000 a.C. Su área de origen no es conocida con precisión dada la existencia de varias poblaciones silvestres, pero se considera como tal la región comprendida entre el sur de México y Colombia. El nombre español "aguacate" deriva del azteca "ahuacatl" (FAO, 1998).

Agrios (1985) indica que originalmente existían 3 razas: Mexicana, Guatemalteca y Antillana. Estas tres razas de palta, desde la antigüedad se fueron mezclando y hoy tenemos las variedades: Lorena, Méndez, Trinidad, Criollo, Bacón, Monroe, Hass, Fuerte, entre otras. Sánchez (2004) explica que las variedades de palta predominantes en el mercado nacional de Perú son las variedades Hass y Fuerte.

El género Phytophthora (del griego Phyton: planta; phthora: destructor) fue descubierto por De Bary en 1876 con P. infestans como especie tipo. Este investigador reconoció a dicho hongo como causante del ¨blight¨ tardío en la patata, en Europa (1840), previamente identificado como Botrytis infestans Montagne y luego como Peronospora infestans (Montagne) Caspary (Ho – Hing, 1990). Las especies de Phytophthora producen varias enfermedades en muchos tipos distintos de plantas. La mayoría generan pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tubérculos, cormos, tallos cortos y otros órganos, enfermedades muy semejantes a las ocasionadas por el género Pythium sp. Otras especies causan pudriciones de yema o de frutos y algunos tizones foliares. Algunas especies son específicas al hospedero, pero otras tienen un amplio rango de éstos y pueden producir síntomas similares o distintos en muchos tipos de plantas hospederas (Agrios, 1985).

Diversos estudios demostraron que estos patógenos pueden afectar la planta en todos sus estados de desarrollo induciendo síntomas similares, caracterizados por marchitez generalizada, estancamiento del desarrollo, pérdida de vigor, color, brillo y amarillamiento de las hojas y finalmente en estados avanzados, muerte de los árboles (Pérez, 2008; Tamayo, 2007; Zentmyer, 1984). La tristeza del palto es causada por Phytophthora cinnamomi Rands, hongo que pertenece a la clase Oomycetes, debido a que posee las estructuras características de éstos. Este hongo pertenece al grupo IV, dentro de las especies de Phytophthora (Stamps et al., 1990).

Las características principales de la estructura de Phytophthora cinnamomi Rands son las siguientes: A nivel del micelio no presenta septos y su principal característica que sirve para diferenciarla de otras especies de Phytophthora la constituyen sus hifas con hinchazones, las que adquieren un aspecto botrioso a coraliforme y son formadas más profusamente que por la mayoría de las otras especies de Phytophthora (Erwin y Ribeiro, 1996). Posee esporangios no papilados de forma ovoide, piriforme o elipsoidal a elongado-elipsoidal con un ápice compacto, no sobresaliente. Se estrechan o redondean hacia la base, son no caducos y nacen en el extremo terminal (Erwin y Ribeiro, 1996).

Zamora y Casín (1986) mencionan que las especies del género Phytophthora, presentan dos tipos de reproducción: asexual (con la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas) y sexual (mediante la formación de oosporas), las cuales se detallan a continuación:

Entre los factores que tienen relación directa con el patogeno se incluyen factores físicos (temperatura, humedad textura del suelo entre otras), químicos (pH e intercambio iónico) y biológicos (bacterias, hongos y el crecimiento radical entre otras). Cada uno de estos factores y sus componentes varían en el tiempo y espacio, y cada interacción lleva consigo una secuela de interacciones, por lo que se conoce al ambiente como dinámico, heterogéneo y de gradiente complejo (Cook y Baker, 1983; Duniway, 1983).

Es importante resaltar el papel que ocupa la temperatura entre los factores que limitan el crecimiento vegetativo, razones por las cuales constituye un parámetro de elevada relevancia en la taxonomía. El margen de temperatura en el cual está comprendido el desarrollo del micelio va desde 1 ºC de temperatura mínima hasta los 37 ºC como máxima temperatura de crecimiento activo, situándose entre los 20 – 28 ºC la temperatura óptima para la mayoría de las especies, teniendo en cuenta que este valor es específico para cada una de ellas (Boccas y Laville 1976).

El objetivo del presente trabajo de investigación es aislar e identificar a la Phytophthora cinnamomi Rands en el cultivo de palto variedades Hass y Fuerte

METODOLOGIA

Las muestras radiculares se seleccionaron de cinco campos de cultivos de palto ubicados en el distrito de Moquegua-Perú, en los que se seleccionaron plantones de palto con síntomas característicos de ataque de Phytophthora cinnamomi Rands (ver Tabla 1). Asi mismo al monto de la recolección se evaluaron los factores bióticos y abióticos, características de la vegetacion y número de aislamiento

Tabla 1. Características de los sitos de muestreo de la provincia de Mariscal Nieto.

Poblado	Paraje	Coordenadas	Altitud
Los Angeles	Charsagua	17° 59´49.1" S 70° 58´09"	1431
	Escapalaque	17° 57´30" S 70° 55´59,39"	1438
	El rayo	17° 10´55.33" S 70° 55´32.09"	1430
Chen Chen	Siglo 21	17° 13´37.87" S 70° 55´27.82"	1472
	Asoc Cambrune	17° 14´07.67" S 70° 55´46.50"	1480

Fuente: Elaboración Propia (2015)

Del Aislamiento: Las muestras de las raíces colectadas fueron lavadas con agua destilada esteril, se realizaron cortes de 0.5 cm^3 luego se sometieron a desinfección superficial con etanol (70%) por 30s, seguido de un lavado en agua destilada estéril por 30s, después se sumergieron en hipoclorito de sodio (3%) por 30s y por último se lavan con agua destilada estéril por 30s. De las muestras desinfestadas se cortaron trozos pequeños ($1mm^3$) y se sembraron en el medio semi-selectivos para Phytophthora sp. PDA-acidificado. Las cajas Petri sembradas se incubaron a 28ºC por 15 días, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (Madigan et al., 2004; Hardham, 2005 y Mendoza-Molina, 2013).

Preparacion de Agar patata Dextrosa Acidificado (PDA-acidificado): Para la preparacion de PDA-acidificado se realizó de acuerdo a lo propuesto por Walker & White, (2005); Koike (2007), Mendoza-Molina (2013) que consiste en acidificar el medio de cultivo a un pH de 3.5± 0.1, con ácido tartárico (0.14%), se agregó 39 g/L de APD (BD Bioxon) del polvo en agua destilada antes de vaciarlo en cajas Petri se le agregó una solución estéril de 14 ml de ácido tartárico al 10% (p/v) se esterilizaron en autoclave a 121 ºC por 20 minutos.

Purificación: Se utilizó el médio Caldo Luria-Bertoni, este medio se preparó agregando 20 g/L de medio deshidratado LB (Difco). Posteriormente se colocaron alícuotas de 2 ml en tubos de ensayo con tapa de rosca para proceder a la esterilización por autoclave (Mendoza-Molina, 2013)

Coloración: Se utilizaron los colorantes vegetales rojo allura Nº 40 (16035) y azul brillante Nº 1 (42090). Para cada colorante se preparó una solución compuesta de: colorante vegetal (1 mL), ácido acético (10 mL) el cual se usó como mordiente y glicerina (15 mL) usada como humectante, mezclados en 75 mL de agua destilada esterilizada (Gonzáles et al., 2011).

Identificación: Para la identificación de los géneros se utilizaron las claves correspondientes (Erwin y Ribeiro, 1996; Van Der Plaats 1981; Waterhouse y Waterston, 1966).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento de Phytophthora cinnamomi Rands de los cultivos de palto Variedad Hass y Fuerte: Para el aislamiento de P. cinnamomi: las muestras recolectadas fueron evaluadas según los factores bióticos y abióticos en cada una de las zonas seleccionadas (ver Tabla 2). Las condiciones evaluadas permiten entender la interacción y el daño que ocasiona en los cultivos de palto, características que se pueden evidenciar de acuerdo a la gravedad de infestación.

Tabla 2. Principales factores bióticos y abióticos identificados.

Agente Causal	Charsagua	Escapalaque	El rayo	Siglo 21	Asoc Cambrune
P. cinnamomi	+	+	+	+	+
Riego gravedad	+	+	+	-	-
Daño defoliadores	-	-	-	+	+
Daño barrenadores	-	-	+	-	-
Quema de arboles	-	-	-	-	-
Pastoreo	-	-	-	+	+

+ Presencia. - Ausencia.

Se observa que los sectores correspondientes a Charsagua Escapalaque y el Rayo son lo que utilizan el riego por gravedad, en cuanto el daño de defoliadores y barrenadores se observa en los sectores del Rayo y Siglo 21, no se evidencian daños a consecuencias de la quema de árboles en cuanto al pastoreo se evidencian en los sectores del Siglo y la Asociacion Cambrune.

Se observa que lo sectores de Chalsagua, Escapalaque y el Rayo son los que presenta mayor infestación y daño a los arboles de palto, se ha observado que los agricultores de estos sectores practican el riego por gravedad, Al respecto Fernandez (2002) menciona que la aplicación en exceso del agua en el riego y de las lluvias es el factor más importante en la diseminación de la enfermedad en el campo, porque favorece la reproducción de P. cinnamomi debido a que producen esporangios y éstos liberan zoosporas, tal es asi que el agua es el factor primario y afecta selectivamente la actividad de los microorganismos por lo menos en cuatro formas: 1) intercambio de gases (aireación del suelo), 2) difusión de solutos, 3) movilidad de organismos y 4) energía libre (potencial de agua), la cual determina la disponibilidad de agua para el crecimiento, nutrición y metabolismo (Cook y Baker, 1983; Grove y Boal, 1991, Fernandez 2002).

En la toma de muestras se ha considerado la densidad de árboles de palto por hectárea en cada uno de los sectores (Tabla 3), el sector de Siglo presenta un total de 150 árboles de palto mayor en comparación a lo demás sectores. El número de aislamiento que se obtuvo en cada sector fue de 10. En cuanto a letalidad de infestación, el sector el Rayo evidencia severidad en el ataque de P. cinnamomi.

Tabla 3. Características de la vegetación, número de aislamientos de P. cinnamomi obtenidos de las raíces y agresividad de ataque.

Poblado		densidad de árboles/ha	# de aislamiento de raices	Ligero	Moderado	Severo
Los Angeles	Charsagua	50	10	-	+	-
	El rayo	80	10	-	-	+
	Escapalaque	80	10	-	+	-
Chen Chen	Siglo 21	150	10	-	+	-
	Asoc Cambrune	120	10	-	+	-

+ Presencia. - Ausencia.

Del aislamiento en los medios de cultivo y según la metodología referida anteriormente se pueden observar colonias de color blanco, con abundante micelio aéreo algodonoso y crecimiento uniforme o ligeramente petaloide (Ver figura 1). Las colonias de los aislados presentaron formaciones miceliares blanquecinas a modo de pétalos, dando lugar a una colonia tipo "roseta", con micelio aéreo escaso

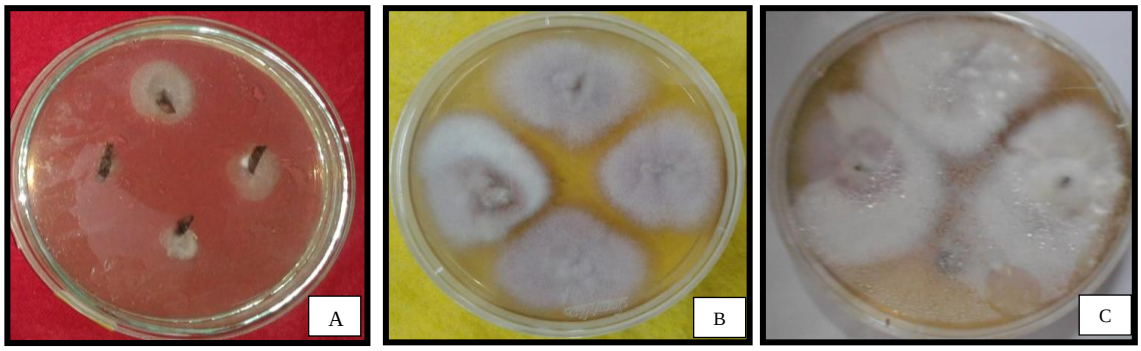

Figura 1. Morfología de las colonias de Phytophthora cinnamomi a los 2, 6 y 10 días de crecimiento a 20° C en el medio Agar Patata Dextrosa, A) Colonia a los 2 dias, B) Colonia a los 6 dias, B) Colonia a los 10 dias

Para la descripción de oomicetos y la estimación de crecimiento micelial de los aislamientos se hicieron mediciones del crecimiento radial en el medio Agar Patata Dextrosa (PDA) e incubados a temperatura ambiente, el crecimiento fue expresado como diámetro de la colonia alcanzado después de 24 - 72 hrs, comparando estos resultados con una cepa de referência de P. cinnamomi con un valor promedio de crecimiento de 46 mm de diámetro a las 24 hrs, alcanzó a cubrir la caja petri a las 48 hrs (ver Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización morfológica de oomicetos de P. cinnamomi.

Localidad	Paraje	Largo Intervalo (media)		Ancho Intervalo (media)	
Los Angeles	Charsagua	30.03 - 64.6	(48.24)	22.2 - 37.24	(31.47)
	Escapalaque	42.3 - 67.2	(55.36)	26.64 - 33.74	(32.87)
	El rayo	26.04 - 66.8	(51.23)	17.76 - 44.4	(32.65)
Chen Chen	Siglo	22.3 - 57.2	(39.8)	15.26 - 34.5	(31.36)
	Asoc Cambrune	32.3 - 57.3	(44.8)	14.76 - 34.6	(30.98)
	Media General	30.6 - 62.6	(47.886)	19.32 - 31.87	(31.866)

Identificación de Phytophthora cinnamomi Rands de los cultivos de palto Variedad Hass y Fuerte: En todos los aislados se observó la formación de hinchazones hifales en medio líquido de extracto de suelo, siendo más abundantes a 15° C que a 20° C. Éstas fueron en su mayoría esféricas, intercalares y en racimos, aunque también las hubo solitarias y terminales, siendo de mayor tamaño y mucho más abundantes las producidas por los aislados. Sin embargo todos los aislados obtenidos se caracterizaron por ser heterotálicos, con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas. Además, los esporangios en posición terminal en el esporangióforo, no papilados. La caracterización de sus estructuras vegetativas y de reproducción fueron realizadas, según las descripciones de Waterhouse (1963), Stamps et al. (1990) y Erwin y Ribeiro (1996) (Figura 2).

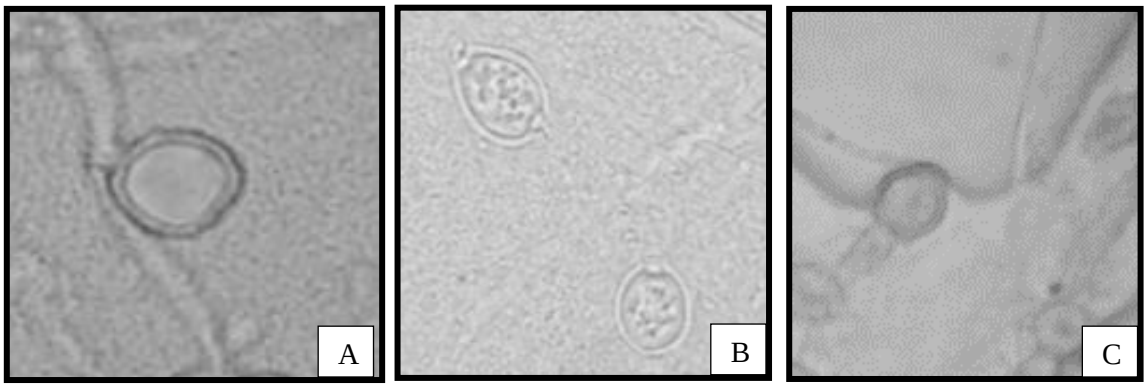

Figura 2: Phytophthora cinnamomi: A.Oospora B. Esporangio ovoide a elipsoide con presencia de zoosporas internamente desarrolladas. y C. anteridio anfígeno.

CONCLUSIONES

Se demostró que todas las colonias identificadas pertenecen al género P. cinnamomi, por cuanto son heterotálicos, con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas, los esporangios en posición terminal en el esporangióforo, no papilados.

AGRADECIMIENOS

Agradecimiento a la Universidad Nacional de Moquegua, por financiar el presente trabajo de investigación.

REFERENCIAS

AGRIOS, G. N. 1985. Fitopatología. México, editorial Limusa. 756 p.

ALVARADO-ROSALES D., SAAVEDRA-ROMERO L., ALMARAZ-SÁNCHEZ, A. 2008. PRIMER REPORTE DE Phytophthora cinnamomi Rands. ASOCIADO AL ENCINO (Quercus spp.) EN TECOANAPA,

BARTNICKI-GARCIA, S. and WANG, M. C. 1983. Biochemical aspects and morphogenesis in Phytophthora Jin: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology. Minnesota, APS Press, pp. 121-137.

BOCCAS, B., Y LAVILLE, E. 1976. Les maladies a Phytophthora desagrumes. IRFA. Francia. Editions SETCO. 162 p.

CADENAS C. (2007) Fitopatógenos que afectan palta Hass y Fuerte en Luricocha y Huanta UNALM 68(1), 2007 ISSN 0255-0407.

COFFEY, M.D. 1991. Strategies for integrated control of soilborne Phytophthora species. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 447 p.

COOK R. J. y K.F. BAKER, 1983, The nature anda practice of biological control of phatogens, American Phytopathological Society, St. Paul, Min. 539 p.

DHINGRA, O.D. y SINCLAIR J.B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. C.R.C. Press. Boca Ratón. Florida. 355 p.

ERWIN, D. C. and RIBEIRO, O. K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. Minnesota, APS Press. 562p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). http://www.fas.usda.gov/htp/horticulture/Avocados/Avocado%20Presentation%202004%20(short).pdf

GISI, U., ZENTMYER, G. A and KLURE, L. J. 1980. Production of sporangia by Phytophthora cinnamomi and P. palmivora in soils at different matric potentials. Phytopathology 70 (4): 301-306.

GRANT, B. R. y P. N. BYRT, 1984. Root temperature effects on the growth of Phytophthora cinnamomi in the roots of Eucalyptus marginata y E. calophylla. Phytophatology 74: 179-184.

GRENTE, J. 1961. Lá maladie de l'encre du chataignier. Annles Epiphyt 1 – 59.

HARDHAM, A.R. 2005. Phytophthora cinnamomi. Molecular Plant Pathology, 6:589-604.

HO – HING, H. 1990. Taiwan Phytophthora. Bot Bull Academia Sinica (31): 89 – 106.

HO, H. and ZENTMYER, G. A. 1977. Morphology of Phytophthora cinnamomi. Mycologia 69:701-713.

HO, H.H.1992. Key to the species of Phytophthora in Taiwan. Plant Pathol. 1:104-109. INIFAP. 1996. Programa nacional de investigación en aguacate. Documento de circulación interna. SAGAR. México.

M. E. SÁNCHEZ, S. ANDICOBERRY, A. TRAPERO, 2004. Patogenicidad de Phytophthora sp. Causantes de podredumbre radical de Quercus ilex ssp. ballota en viveros forestales, Bol. San. Veg. Plagas, p. 391, 30: 385-401, 2004

MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10a.ed. rev. Pearson Education, S. A. Madrid, Esp. 1096 p.

MARTINEZ E. P. y OSORIO J. A. (2007), Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra Phytophthora infestans (Mont.) De Bary, Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2007) 8(2), 5-16.

OUDEMANS, P., Y M.D. COFFEY. 1991. Isozyme comparison within and among wordwide sources of three morphologically distinct species of Phytophthora. Mycol. Res. 95: 19-30.

PÉREZ R.M. (2008) Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. The European Journal of Plant Science and Biotechnology, 2:01-24.

RAMÍREZ J. (2013) Incidencia, diagnóstico, comportamiento y alternativas de manejo de la marchitez del aguacate con énfasis en Phytophthora cinnamomi Rands.

RAMIREZ J. G. (2013), incidencia, diagnóstico, comportamiento y alternativas de manejo de la marchitez del aguacate con énfasis en Phytophthora cinnamomi Rands, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

RAMOS-SANDOVAL, R. U., GUTIÉRREZ-SOTO, J. G., RODRÍGUEZ-GUERRA, R., SALCEDO-MARTÍNEZ, S. M., HERNÁNDEZ-LUNA C. E., LUNA-OLVERA H. A., JIMÉNEZ-BREMONT J. F., ALMEYDA-LEÓN I. H. 2010. Antagonism of

two Ascomycetes Against Phytophthora capsici Leonian, Causing Wilt of Pepper (Capsicum annuum L.), REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA VOLUMEN 28, NÚMERO 2.

RISTAINO, J.B., AND GUMPERTZ, M.L. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus Phytophthora. Ann. Rev. Phytopathol 541-576.

STAMPS, D. J., WATERHOUSE, G. M., NEWHOOK, F. J., and HALL, G. S. 1990. Revised tabular key to teh species of Phytophthora. England, Commonw. Agric. Bur. Inst. Mycol. 28 p. (Paper 162).

TAMAYO PJ (2007) Enfermedades del aguacate. Revista Politécnica, 4:52-71.

VIDALES F. J. (2002), Efecto de factores físico químicos sobre la actividad microbiana de la rizosfera del aguacatero (Persea americana Mili) para el control de Phytophthora cinnamomi (Rands), Universidad de Colima, Apartado Postal No.36, C.P.28100, Tecomán, Colima, México.

WESTE, G. 1994. Impact of Phytophthora species on native vegetation of Australia and Papua, New Guinea. Austr. Plant Pathol. 23:190-209.

ZAMORA, V., Y CASÍN, J.C. 1986. El género Phytophthora como causante de enfermedades en los cítricos. Boletín de Reseñas. Cítriy otros Frutales. No 24.

ZEMTMYER, G. A. 1985. Origen and distribution of Phytophthora cinnamomi Cal. Avocado Soc. Yearbook. 69: 89-94.

ZENTMYER, G. A.1980. Phytophthora Cinnamomi and the disease it causes. Minnesota, APS Press. 96 p. (Monograph 10).

ZENTMYER, G. A.1983. The world of Phytophthora in: Erwin, D.; Bartnicki-Garcia, S. y Tsao, P. Eds. Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology. Minnesota, APS Press, pp. 1-7.