

## Dinámica del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* en medios de cultivo alternativos

Anselmo Hernández Pérez<sup>1</sup>  
Yisa María Ochoa Fuentes<sup>1</sup>  
Ernesto Cerna Chávez<sup>2</sup>  
Juan Carlos Delgado Ortiz<sup>1</sup>  
Mariana Beltrán Beache<sup>3</sup>  
Omegar Hernández Bautista<sup>3</sup>  
Luis Mario Tapia-Vargas<sup>4§</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (hernandez.anselmo1@gmail.com; yisa8a@yahoo.com; jabaly1@yahoo.com). <sup>2</sup>CONACYT-Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (moe.788@hotmail.com). <sup>3</sup>CULTA SA de CV. Bulevar Luis Echeverría Álvarez núm. 1700, Colonia Altavista, CD. Mante, Tamaulipas, México. CP. 89880. (omegarhbautista@gmail.com; beltranmariana89@gmail.com). <sup>4</sup>Campo Experimental Uruapan-INIFAP. Avenida. Latinoamericana núm. 1101, Col. Revolución, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60500.

§Autor para correspondencia: mariotv60@hotmail.com.

### Resumen

México es el principal país productor, consumidor y exportador de aguacate el en mundo. El estudio de la macrobiótica del suelo cobra mayor importancia en el complejo marchitez del aguacate debido que en esta patología pueden estar implicados agentes causales de tipo biótico y abiótico, siendo el Oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands la principal enfermedad radical del aguacate. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la dinámica del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* en medios de cultivo alternativos. En los meses de octubre y noviembre de 2016, se recolectaron muestras de raíces en arboles de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) en la huerta experimental del INIFAP ubicada en San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Los aislados se identificaron morfológica y molecularmente. Se registró las medidas de diámetros de crecimiento de cada cepa *in vitro* en función al tiempo. Se efectuó una regresión lineal mediante modelos lineales generalizados (GLM) para obtener los parámetros de intercepto y pendiente, significancia de la regresión y el valor de  $R^2$  ajustada. Los análisis se realizaron con el programa estadístico R 3.4. De acuerdo con los resultados obtenidos, el medio de cultivo Centeno-agar fue el más eficiente para la proliferación de *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** aguacate, medios de cultivo, tasa de crecimiento.

Recibido: junio de 2019

Aceptado: julio de 2019

*P. americana* Mill. pertenece a la familia *Lauraceae*, uno de los grupos de angiospermas más antiguos (Renner, 1999). Se caracteriza por su gran variabilidad y por ser una de las familias del reino vegetal más numerosas, con alrededor de 92 géneros descritos y un número indeterminado de especies que varía de 2 840 a 3 340 que se distribuyen por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Renner, 2004). La productividad del cultivo en esta amplia gama de ambientes depende de un conjunto de factores, algunos más o menos ligados con las características agroambientales de los huertos.

Sin embargo, factores bióticos y abióticos son limitantes para obtener buenos rendimientos y calidad de fruto (Anguiano *et al.*, 2003). La microbiota del suelo, sirve como un bio-indicador de la salud de los ecosistemas y agro ecosistemas, reflejando el efecto de los procesos agrícolas y el manejo de los recursos sobre este componente, afectando tanto su biodiversidad, como la densidad de las poblaciones microbianas (Buckley y Schmidt, 2003; Girvan *et al.*, 2004; Ariena *et al.*, 2006).

El estudio de la macrobiótica del suelo cobra mayor importancia en el complejo marchitez del aguacate debido a que en esta patología pueden estar implicados agentes causales de tipo biótico y abiótico, siendo el Oomycete *Phytophthora cinnamomi*, el más relevante, el cual puede causar pérdidas económicas considerables (Pérez, 2008; Richter *et al.*, 2011). La enfermedad fue descrita en 1922 por Rands en árboles de canela, se reporta atacando aguacatero por primera vez en EUA en California, se le considera como la enfermedad más importante del aguacate, para la década de los 1980's se tenía 1 500 ha afectadas (Zentmyer, 1980).

En México, se ha detectado la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras; destacando por la severidad de daños, la región de Atlixco, Puebla, donde ocasionó la desaparición de este cultivo. En la región productora de Michoacán, se considera que alrededor de 4 000 ha están afectadas por la enfermedad, presentando una tendencia exponencial (Téliz, 2000).

En este sentido, es necesario tener amplio conocimiento del comportamiento *in vitro* de *P. cinnamomi* y para esto, es necesario partir de medios de cultivos alternativos para acelerar su desarrollo y por ende efectuar evaluaciones rápidas en cuanto a su crecimiento ya que este fitopatógeno es afectado en su desarrollo *in vitro* por diferentes factores como la temperatura y una opción es generar información de medios de cultivo que aceleren su tasa de crecimiento.

Cabe destacar que a la fecha existe limitada información de medios de cultivo alternativos al PDA y V8 Agar. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la dinámica del crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* en cuatro medios de cultivo alternativos.

## **Materiales y métodos**

### **Muestreo**

En los meses de octubre y noviembre de 2016, se recolectaron muestras de raíces en arboles de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) bajo presión de inóculo que presentaban sintomatología característica de muerte descendente conocida como tristeza del aguacate. El sitio de recolección fue la huerta experimental del Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicada en San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán, cuyas

condiciones climáticas semicálidas, subhúmedas con lluvias en verano, oscilan entre los 1 200 a 1 600 mm y temperaturas de 10 a 28 °C (García, 1981). Se realizó un muestreo dirigido cercano al área de goteo a una profundidad de 30 cm en cuatro puntos equidistantes.

Con ayuda de una pala recta se tomaron las muestras de raíz con presencia de daño (tejido necrosado color café oscuro) de 2 a 6 mm de diámetro y se colocaron en bolsas de polietileno previamente rotuladas con los datos de la huerta, municipio, georreferenciación y manejo agronómico (convencional u orgánico), posteriormente se transportaron al laboratorio de fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### **Aislamientos de los fitopatógenos**

Se lavaron las raíces con agua destilada estéril para fragmentarlas en trozos no mayores a 0.5 cm, con apoyo de un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal seleccionando los límites de tejido sano y enfermo, los cortes de raíz se lavaron en solución de hipoclorito de sodio al 3% por un min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente previamente esterilizado. Una vez secas, se sembraron en medio selectivo V8<sup>®</sup>-PARPH colocando cuatro trozos de raíces en forma horizontal en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro; tres cajas por muestra, dando un total de 12 raíces por árbol muestreado y finalmente los aislados se incubaron a 28 °C por tres días en obscuridad total (Fierro, 2011).

### **Purificación y multiplicación**

Se transfirieron a medio de cultivo V8<sup>®</sup>-Agar cepas con crecimiento característico de *P. cinnamomi*. La técnica de purificación utilizada fue por punta de hifa por triplicado, colocadas el centro de la caja Petri, fueron selladas con cling wrap y se incubaron a 28 °C en cámara bioclimática durante 72 h en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola.

### **Identificación morfológica y molecular**

Los patógenos obtenidos se identificaron morfológicamente según las claves de Davison y Ribeiro (1996) y molecularmente mediante la técnica PCR-ITS, extrayendo ADN de acuerdo con la metodología de Doyle y Doyle (1990); a partir, de 0.2 g de micelio del cultivo puro con buffer de lisis (EDTA 50 mM, pH 8.5; Tris HCl 100 mM, pH 8; NaCl 50 mM; SDS 2%). La visualización del ADN se realizó en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (GenScript<sup>®</sup>).

La amplificación de la región ITS se llevó a cabo con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). De igual manera se visualizó el producto de la reacción por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (GenScript<sup>®</sup>) y el producto del PCR se mandó secuenciar al laboratorio de diagnóstico fitosanitario UA-LAB.

### **Evaluación de la tasa de crecimiento**

Se utilizaron los medios de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), Chicharo-Agar, Centeno-Agar y V8<sup>®</sup>-Agar. Se seleccionaron tres cepas con crecimiento característico diferente (cameloide, arrosado y estrellado), posteriormente para cada medio, se sembraron en centro de una caja Petri

de 8.5 cm de diámetro explantes de 5 mm de diámetro tomados del margen de un crecimiento vigoroso de una colonia pura de 8 días después de la siembra con cuatro repeticiones, las cajas se sellaron y se incubaron en cámara bioclimática donde crecieron como aislamiento puro a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  en obscuridad total, con ayuda de un vernier digital, se tomaron las lecturas del diámetro se tomaron cada 24 h en cuatro puntos equidistantes hasta que la última repetición llenara la caja.

Análisis estadístico: una vez teniendo las medidas de los diámetros de cada cepa en diferente medio nutritivo, se realizó una regresión lineal mediante modelos lineales generalizados (GLM) para obtener los parámetros de intercepto y pendiente (velocidad de crecimiento), significancia de la regresión y el valor de  $R^2$  ajustada. Se efectuó la prueba de homogeneidad de varianza de los errores de los modelos de regresión en cada especie y se contrastaron los coeficientes lineales en función al tiempo, utilizando los valores de la suma de cuadrados de cada regresión mediante una prueba de t (Ott y Longnecker, 2010) empleando las siguientes expresiones:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{Sp \left[ \frac{1}{SS_1} \right] + \left[ \frac{1}{SS_2} \right]}} \quad (1)$$

Donde:  $b_1$  y  $b_2$  son las pendientes de cada regresión para cada aislamiento;  $SS_1$  y  $SS_2$  son la suma de cuadrados de cada modelo de regresión de las ecuaciones.

$$Sp = \frac{MSE_1 - MSE_2}{2} \quad (2)$$

Donde:  $Sp$  es la estimación combinada del error de las dos ecuaciones de regresión con  $n-2$  grados de libertad;  $SME$  = cuadrado medio del error experimental.

Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R 3.4<sup>®</sup>.

## Resultados y discusión

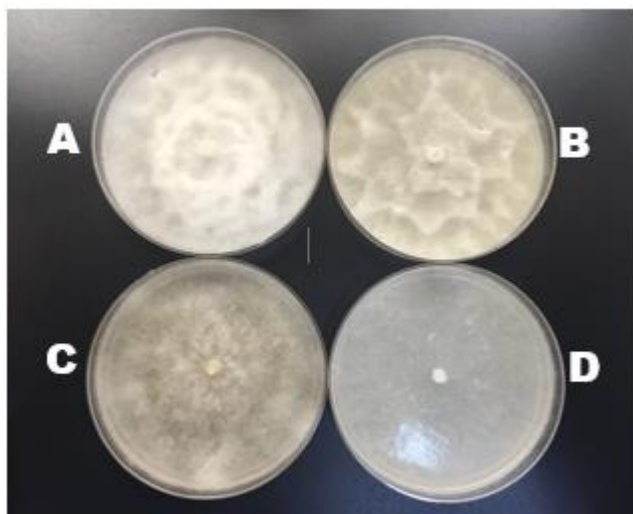
Derivado del aislamiento e identificación morfológica y molecular de los fitopatógenos obtenidos de los muestreos realizados en la huerta experimental bajo presión de inóculo, se lograron obtener diferentes cepas de la misma especie coincidiendo con las claves de identificación de Davison y Ribeiro (1996) para *P. cinnamomi*, confirmando lo antes mencionado al comparar los productos de la secuenciación con los registros de la base de datos del GenBank (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA.**

Cepa <sup>1</sup>	Núm. de acceso <sup>2</sup>	Especie	Similaridad <sup>3</sup>	Origen <sup>4</sup>
Pc-33	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
Pc-41	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
Pc-42	KP183223.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Australia B

<sup>1</sup>= nomenclatura para los diferentes aislamientos; <sup>2</sup>= número de acceso en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information); <sup>3</sup>= índice de similitud entre las secuencias de las especies aisladas y las especies comparadas. <sup>4</sup>= origen geográfico de los aislados.

Respecto a la evaluación temporal del crecimiento de *P. cinnamomi* en diferentes medios de cultivo (Figura 1), se observó que las cepas en los diferentes medios (Cuadro 2), todas tienden a justarse a una curva de crecimiento lineal, dado a que en las regresiones sus  $R^2$  ajustadas son superiores a 0.94, siendo todas altamente significativas ( $\alpha= 0.05$ ).



**Figura 1. Morfología de crecimiento en los diferentes medios de cultivo en donde A= PDA; B= chicharo-Agar; C= V8®-Agar; y D= centeno-Agar.**

**Cuadro 2. Tasa de crecimiento en cm h de los medios evaluados.**

Medio	Tratamiento	Intercepto	Parámetro	$p$ -valor <sup>b</sup>	$R^2$ aj.
V8	Pc-33	0.952	0.041142	< 2.2e-16	0.985
	Pc-41	0.411	0.038884	< 2.2e-16	0.985
	Pc-42	0.642	0.050434	< 2.2e-16	0.958
Centeno	Pc-33	0.731	0.067878	< 2.2e-16	0.976
	Pc-41	0.27	0.070667	< 2.2e-16	0.949
	Pc-42	0.585	0.069160	< 2.2e-16	0.978
Chícharo	Pc-33	1.02	0.067108	< 2.2e-16	0.959
	Pc-41	1.028	0.065788	< 2.2e-16	0.967
	Pc-42	1.052	0.068528	< 2.2e-16	0.944
PDA	Pc-33	0.04	0.039919	< 2.2e-16	0.967
	Pc-41	0.04	0.037524	< 2.2e-16	0.979
	Pc-42	0.0519	0.038151	< 2.2e-16	0.973

b=  $p$  valores <0.05 son altamente significativas; aj.= ajustada.

El medio nutritivo en donde se registraron las tasas de crecimiento más bajas fue PDA, con una media de 0.0385, siendo Pc-41 la de menor registro respecto a las demás, seguido del medio V8 con una media de 0.0434, por otra parte, los mayores valores se presentaron en centeno y chícharo con medias de 0.0671 y 0.0692 respectivamente, siendo en este último donde se registró el valor

máximo en la cepa Pc-41 siendo 0.03314 cm mayor con una razón de 1.8832, reporta un crecimiento de 4.5 cm en 120 h del mismo patógeno, coincidiendo ampliamente con nuestros resultados; sin embargo, estimando el crecimiento de las cepas evaluadas en este estudio la velocidad media fue de 4.5 cm en 85 h.

Al comparar las cepas con los diferentes medios se determinó diferencia estadística entre ellos, para el caso de la cepa Pc-33, las diferencias se encuentran entre los medios chícharo-PDA y centeno-V8, Por otra parte al contrastar Pc-33 con Pc-41 los medios significativos fueron PDA-Chícharo y PDA-Centeno, mismo resultado comparándolo con la cepa Pc-42, esto dado a que PDA presenta las tasas más bajas (Cuadro 3), contrario a lo reportado por Rodríguez *et al.* (2003) quienes registran valores alto de crecimiento, tomando en cuenta la misma medición de  $\text{mm d}^{-1}$  para el oomiceto *P. cinnamomi*.

**Cuadro 3. Valores t student producto de las comparaciones múltiples de la estandarización de las tasas de crecimiento ( $\text{cm h}^{-1}$ ) de diferentes cepas de *P. cinnamomi* en diferentes medios nutritivos.**

		Pc-33				Pc-41				Pc-42			
		M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
Pc-33	M1	-											
	M2	0.044	-										
	M3	2.041	4.693*	-									
	M4	4.249*	1.803	-0.118	-								
Pc-41	M1	-0.102	-0.166	-1.621	-1.245	-							
	M2	0.133	0.084	-12.982**	-1.896	0.094	-						
	M3	4.74*	2.142	0.237	1.997	1.451	1.831	-					
	M4	4.696*	1.732	0.084	0.299	1.137	1.769	-0.184	-				
Pc-42	M1	-0.32	-0.116	-2.101	-3.87*	0.055	-0.207	-4.372*	-6.033*	-			
	M2	-0.026	-0.081	-1.79	-1.29	0.172	-0.143	-1.516	1.346	0.0258	-		
	M3	3.786*	2.24	0.19	0.682	1.461	2.414	-0.162	0.088	3.646*	1.533	-	
	M4	0.963	2.817	-1.157	-0.617	1.194	1.343	-0.9	-0.717	1.025	1.408	-0.899	-

Medios de cultivo: M1= centeno; M2= chícharo; M3= PDA; M4= V8; \*\*, \* = valores estadísticamente diferentes con un  $\alpha = 0.05$  y  $0.1$  respectivamente.

Respecto a la cepa Pc-41, la tasa de crecimiento es indistinto en el medio sembrado dado a que no existe diferencia en función al medio nutritivo, sin embargo, en contraste con Pc-42, el crecimiento es más acelerado en centeno. Es importante destacar, que pese a lo antes mencionado el medio de cultivo si influye en el crecimiento de estructuras reproductivas. Por último, Pc-42 muestra significancia en los medios centeno y PDA siendo el valor en centeno 1.8x más grande respecto a PDA.

Con base a los resultados del Cuadro 2 y las comparaciones del Cuadro 3, los medios centeno y chícharo son medios viables y alternativos para el medio PDA ampliamente utilizado por su mayor tasa de crecimiento y por su parte Cedeño *et al.* (2008) sugiere determinar medios alternativos para cada patógeno debido a los rangos de crecimiento altamente significativos.

## Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, el medio de cultivo Centeno-agar fue el más eficiente para el aislamiento y proliferación de *Phytophthora cinnamomi* obteniendo un mayor crecimiento de estructuras morfológicas. La información generada ayudará a futuras investigaciones para el rápido aislamiento y formación de estructuras de *Phytophthora cinnamomi*.

## Literatura citada

- Anguiano, C. J.; Coria, A. V. M.; Ruiz, C. J. A.; Chávez, L. G. y Alcántar R. J. J. 2003. Caracterización edáfica y climática del área productora de aguacate (*Persea americana*) cv. 'Hass' en Michoacán México. V Congreso mundial del aguacate. Málaga, España. 146-147 p.
- Ariena, H.; Van Bruggen, A.; Semenov, M.; Van Diepeningen, A. de vos O. and Blok, W. 2006. Relation between soil health, wavelike fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. Eur. J. Plant Pathol. 115(1):105-122.
- Buckley, D. and Schmidt, T. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. Environ. Microbiol. 5(6):441-452. Doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00404.x.
- Cedeño, L.; Fermín, G.; Mora, G.; A., Briceño, A.; Quintero, K.; San Román, M. y Moreno, M. 2008. Medios de cultivos alternativos para aislar *Phytophthora infestans* de folíolos de papa. Fitopatol. Venez. 21(2):34-40.
- Davison, E. and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, Minnesota. 269-280 pp.
- Doyle, J. and Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12(1):13-15.
- Fierro, C. D. 2011. Etiología y manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán. Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 18 p.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Adaptado para las Condiciones de la República Mexicana. 3ª Ed. Offset. Lario (Ed.). SA. 252 p.
- Girvan, M.; Bullimore, J.; Ball, A.; Pretty, J. and Osborn, A. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. Appl. Environ. Microbiol. 70(5):2692-2701. DOI: 10.1128/AEM.70.5.2692-2701.2004
- Ott, L. and Longnecker, M. 2010. An introduction to statistical methods and data analysis. Belmont, CA: Brooks/Cole Cengage Learning. 1274 p.
- Pérez, J. R. M. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. The Eur. J. Plant Sci. Biotechnol. 2(1):1-24.
- Renner, S. 1999. Circumscription and phylogeny of Laurales: evidence from molecular and morphological data. Am. J. Bot. 86(9):1301-1315. DOI: 10.2307/2656778.
- Renner, S. 2004. Variation in diversity among Laurales, Early Cretaceous to present. Biol. Skr. 55(2):441-458.
- Richter, B.; Ivors, K.; Shi, W. and Benson, D. M. 2011. Cellulase activity as a mechanism for suppression of *Phytophthora* root rot in mulches. Phytopathology. 101(2):223-230.

- Rodríguez, M.; Santiago, M. A.; Blanco, S.; J. D.; Pozo, Q. M. I.; Colino, N. E. J.; Palo, N. L. and Torres-Vila, M. 2003. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in declining Mediterranean open woodlands (dehesas) in Extremadura (SW Spain) and its growth *in vitro*. Bol. San. Veg. Plagas. 29(4):627-640.
- Téliz, O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa, México, DF. 219 p.
- Zentmyer, G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes. Phytopathological Monograph. No. 10. Phytopathol. Soc. 96 p.