

ARTÍCULOS ORIGINALES

CIENCIAS AGRARIAS Y PECUARIAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN Y CONTROL BIOLÓGICO IN-VITRO DE LA PUDRICIÓN RADICULAR EN *Persea americana* Mill-AYACUCHO-2020

Carrasco Aquino, Guillermo

Programa de Investigación en Cultivos Andinos (PICA), Área de Fitopatología

RESUMEN

Una de las enfermedades más importantes y de amplia distribución en *Persea americana* Mill es la pudrición radicular causada por el pseudo hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands, cuyos síntomas son: decaimiento general de la planta, por este síntoma se le conoce comúnmente como la “tristeza del palto”, hojas pequeñas, clorosis generalizada acompañada de una marchitez, hay una progresiva defoliación y una proliferación de frutos pequeños. A nivel de raíces, las más afectadas son las raicillas que se tornan de un color marrón oscuro a negro y que son muy quebradizas.

La identificación y caracterización del agente causal se basó en las características culturales y morfométricas de la colonia purificada. Para la identificación a nivel de género se utilizó las claves de Plannts-Niterink (1981), Robertson (1980) y Erwin y Rebeiro (1996).

Para realizar la prueba de control biológico in-vitro se trabajó con tres biocontroladores: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Bacillus subtilis*, de los cuales el que controló mejor al fitopatógeno fue el *Trichoderma harzianum*.

En tal sentido el objetivo del presente trabajo es, evidenciar al agente causal de la pudrición radicular en el palto en la Región de Ayacucho,

Palabra Clave: *cinnamomi*, *Trichoderma*

ABSTRACT

One of the most important and widely distributed diseases in *Persea americana* Mill is root rot caused by the pseudo fungus *Phytophthora cinnamomi* Rands, whose symptoms are: general decay of the plant, for this symptom it is commonly known as the "avocado sadness", Small leaves, generalized chlorosis accompanied by wilting, there is a progressive defoliation and a proliferation of small fruits. At the root level, the most affected are the roots that turn from a dark brown to black color and are very brittle.

The identification and characterization of the causal agent was based on the cultural and morphometric characteristics of the purified colony. For the identification at the gender level, the keys of Plannts-Niterink (1981), Robertson (1980) and Erwin and Rebeiro (1996) were used.

To carry out the in-vitro biological control test, three biocontrollers were used: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis*, of which the one that best controlled the phytopathogen was *Trichoderma harzianum*. In this sense, the objective of this work is to demonstrate the causal agent of root rot in avocado in the Ayacucho Region.

Key Word: *cinnamomi*, *trichoderma*.

I.-INTRODUCCIÓN

El palto (*Persea Americana* Mill), es un frutal que en estos últimos tiempos cuenta con mucha demanda, debido a que se ha convertido en un cultivo de exportación, en tal sentido las áreas de cultivo se han ido incrementándose notablemente. Actualmente el palto se produce en los cinco continentes, en las zonas tropicales y subtropicales desde el nivel del mar hasta los 2800 msnm., aunque las mayores áreas se encuentran en América.

Actualmente América Latina y el Caribe son las principales regiones productoras de este cultivo a nivel mundial, puesto que México y Chile son dos de los mayores exportadores de palto sin embargo actualmente el Perú y Colombia vienen ascendiendo en este Mercado.

La pudrición de raíces en el palto puede ser ocasionado por varios fitopatógenos entre ellos el más importante es el ocasionada por especies de *Phytophthora*, los síntomas en muchas variedades de plantas se agravan cuando el suelo se satura por períodos prolongados, que determinan la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora*. Esta condición de inundación del suelo se puede presentar por una mala práctica de riego, presencia de niveles freáticos altos, o bien por el uso de suelos de textura pesada, con drenaje deficiente.

Con el presente trabajo de investigación se pretende evidenciar al agente causal de la pudrición radicular en el palto en la Región de Ayacucho, con lo cual se recomendará las medidas adecuadas para su control, esto evitará que se

disminuya las pérdidas y una reducción en los costos de producción.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS 2.1.- METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se está realizando en dos fases:

FASE I: Trabajo de campo

- **Descripción de sintomatología en campo**
Los síntomas de la enfermedad se analizaron in situ, observando minuciosamente los diferentes órganos afectados de la planta, describiéndolos y tomando fotografías.
- **Recolección de muestras**

Para la recolección de muestras se hizo mediante un muestreo dirigido, el cual consiste en sacar las muestras de aquellas plantas que muestran síntomas de la enfermedad, las muestras fueron mayormente tallos, hojas y raíces, el cual se colocaron en bolsas de polipropileno debidamente codificadas y se llevarán al laboratorio para su diagnóstico respectivo.

FASE II: Trabajo de diagnóstico en laboratorio

Esta fase se a realizado en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

• **Aislamiento y Purificación del fitopatógeno**

El aislamiento se realizado del material enfermo recolectado del campo, de las cuales se escogieron los más representativos, para lo cual se siguió la metodología rutinaria de laboratorio. Para aislar el fitopatógeno, se han realizado los siguientes procedimientos preliminares:

- Esterilización de los materiales e instrumentos
- Preparación de soluciones para la des infestación
- Preparación de medios del cultivo
- Aislamiento de raíces
- Identificación y caracterización
- Prueba de control bilógico in-vitro

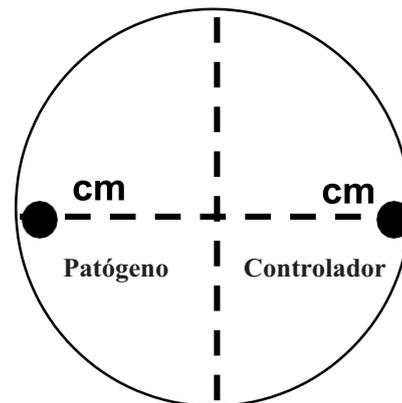
Para esta prueba se ha utilizado el método de la prueba dual o del enfrentamiento, para lo cual se han utilizado los biocontroladores más conocidos como son: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Bacillus subtilis*. Para esta prueba se preparó el medio de cultivo CMA, donde se tuvo cuatro tratamientos con tres repeticiones, la forma de evaluar fue midiendo el ritmo de crecimiento de cada uno de los tratamientos.

Tabla 2.1. Tratamientos de la prueba de control biológico in vitro

TRATAMIENTO	FRENTAMIENTO
T1	Testigo <i>Phytophthora cinnamomi</i>
T2	<i>P. cinnamomi</i> vs <i>T. harzianum</i>
T3	<i>P. cinnamomi</i> vs <i>T. viride</i>
T4	<i>P. cinnamomi</i> vs <i>B. subtilis</i>

Metodología de la Prueba dual:

1. Se realizaron enfrentamientos entre el patógeno y aislamientos de los controladores biológicos como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Bacillus subtilis*.
2. En una placa Petri conteniendo PDA; sobre la superficie del medio se colocó en un extremo, una rodaja de 4 mm de medio conteniendo micelio del patógeno y en el otro extremo otra rodaja del mismo diámetro con micelios del biocontrolador.
3. Para realizar las mediciones del crecimiento micelial del patógeno y del biocontrolador se trazó una línea horizontal y vertical en la parte inferior de la placa que sirvió de guía para tomar las medidas hacia el centro de la placa como se muestra en el siguiente gráfico:



Líneas de medición para el crecimiento micelial diario del patógeno y controlador en placa Petri

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A.- SOBRE LOS SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD:

Los primeros síntomas en arboles infectados fue una clorosis generalizado luego un marchitamiento de la planta a consecuencia de la pudrición de raíces conocida como la tristeza del aguacatero (NEWELL G. 1994), el síntoma de marchitamiento es debido a que disminuye la absorción de agua y nutrientes, induciendo a la clorosis generalizada (Fig.Nº1), que finalmente causa defoliación. Estos síntomas se presentan en cualquier etapa fenológica de la planta. Al perder la vigorosidad el árbol infectado produce una proliferación de frutos pequeños que son generalmente abortados antes de su madurez y finalmente el árbol muere (Fig.Nº 2).

Este patógeno también invade la base del tronco y se desarrollan síntomas de cancro que llega a alcanzar de uno a dos metros de altura y que se caracteriza por presentar coloración de café claro a oscuras debajo de la corteza y exudaciones acuosas acompañadas en algunas ocasiones de gomosis y polvo blanco en la superficie del tronco. A nivel de plántulas de aguacate, *P. cinnamomi* produce necrosis y constricción del tallo (NEWELL G. 1994). En 1959, se observaron por primera vez en California, síntomas de cancro en árboles de macadamia y aguacate, donde los síntomas característicos fue a nivel de las raíces donde se produjo muerte de pelos radiculares el cual se puede observar que las raíces presentan un color marrón oscuro, de igual forma un descortezamiento característico de las raíces (Fig. 3 y 4).

En 1960 se comprobó que el agente causal del cancro en estos árboles era ocasionado por *P. cinnamomi* (Zentmyer et al., 1961 y Zentmyer, 1980). En Michoacán, México Ceja et al. (2000) reportan la incidencia de cancro en aguacate de 1 a 90%. Cuando *P. cinnamomi* infecta la base del tronco y producen un exudado característico de color blanquecino.



Fig. N° 1.- Síntoma de clorosis generaliza en el palto



Fig. N° 2.- Proliferación de frutos acompañado de marchitez de la planta

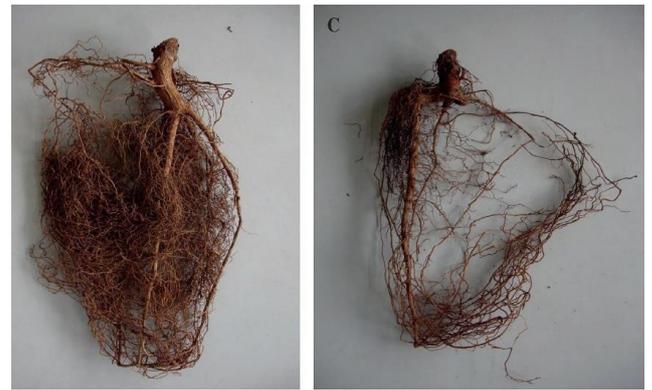


Fig. N°3.- Diferentes grados de muerte de raíces y de pelos radiculares ocasionado por *Phytophthora cinnamomi*.

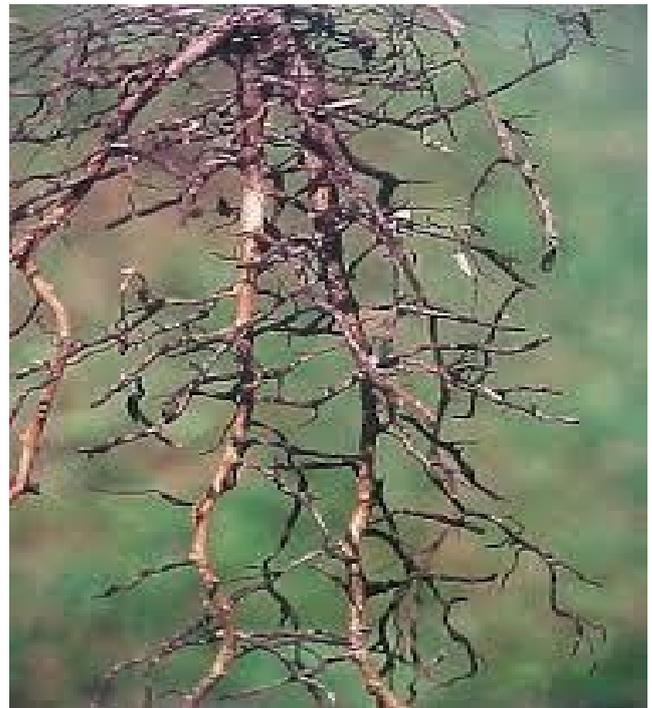


Fig. N°4.- Necrosis a nivel de raíces con un descortezamiento de la misma

B.- RECONOCIMIENTO DEL AGENTE CAUSAL

Caracterización de las estructuras del Fitopatógeno

De acuerdo a los síntomas que se observaron en los diferentes árboles de palto de donde se extrajeron las muestras se presume que el agente causal de estos síntomas es *Phytophthora cinnamomi*, con la finalidad de corroborar la etiología se hizo la caracterización biométrica de las estructuras del patógeno.

El comportamiento de *P. cinnamomi* se debe en gran medida a las estructuras especializadas que posee, las cuales le confieren capacidad de dispersión en el ambiente y resistencia a condiciones adversas. El fitopatógeno hiberna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. Una vez las condiciones son favorables, las oosporas y las clamidosporas germinan, mientras que el micelio prosigue su desarrollo y/o produce

zoosporangios que liberan zoosporas. Estas últimas nadan en el agua del suelo entorno a las raíces y de esta forma infectan a otras plantas, si éstas son susceptibles, el patógeno penetra por la punta de la raíz por medio de una prolongación hifal que penetra la superficie de las mismas. Este pseudohongo forma más micelio y zoosporas en climas húmedos y moderadamente fríos y con un mal drenaje del suelo, la enfermedad se disemina a otras plantas a través del contacto de raíz a raíz. En climas secos, cálidos e incluso demasiado fríos, este patógeno sobrevive en forma de oosporas, clamidosporas o micelio, con las cuales pueden iniciar nuevamente infecciones cuando las condiciones de humedad y temperatura se tornan favorables (Acosta, 2008; Collins et al. 2012). Las características de las principales estructuras son las siguientes:

Micelio: El micelio de *P. cinnamomi*, como estructura somática está compuesta por hifas cenocíticas (sin septos), toruloso, hialino, ramificado, con inchamientos hifales redondos, característicos de la especie. Prolifera dentro de la raíz, alimentándose de los azúcares y destruyendo los tejidos vegetales hasta la pudrición. El diámetro del micelio fue variable, oscilando entre 5 – 8 µm de ancho, posee dilataciones hifales esféricas con racimos de 42 a 60 µm de diámetro, que le dan un aspecto botrioso a coraliforme. Se mantiene viable entre 1 a 60 días, el crecimiento micelial en medios de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), presentó un aspecto algodonoso blanquecino, en forma de camelia o coraliforme. (Fig. 5 A y B).

Zoosporangios: Estructura de la reproducción asexual que puede germinar por elongación hifal directa o por fraccionamiento del citoplasma en compartimentos uninucleados que son liberados al ambiente como zoosporas por disolución del material de la pared del ápice. Pueden ser ovoides, ovopiriformes o elipsoides, con un ápice no papilado (engrosamiento apical sobre el esporangio) compacto, no caducos, su base fue redonda y estrecha, sujeta por una zona terminal. (Fig. N° 6). El tamaño promedio que se midió fue de 43.6 75 µm de largo y 25.9 - 47 µm de ancho, que están dentro del rango para esta especie, aunque tanto la forma como el tamaño varían con las condiciones ambientales y nutricionales. Pueden mantenerse viables por 3-42 días (Acosta, 2008; Castañeda, 2009; Schreier, 2013).

Zoosporas: Esta estructura de propagación son la clave de la diseminación y el establecimiento de la enfermedad, dado que son los principales propágulos infectivos del fitopatógeno, provienen de los zoosporangios, son de vida corta, frágiles y producidas en gran número; poseen movilidad a través de un flagelo anterior que le sirve para desplazarse con un movimiento sinusoidal y otro posterior liso que funciona como timón, son atraídas a los sitios de infección de las raíces por quimiotaxis desde una distancia de 3-4 mm y atacan la superficie más externa de las puntas de la raíz, ya que poseen una marcada habilidad para sintetizar una pared celular enquistada en pocos minutos, de la cual surge una elongación hifal. La pared celular luce intacta durante el proceso de infección, a excepción del punto de entrada del tubo germinativo, donde una pequeña lesión se hace evidente (Newell, 1994; Acosta, 2008).

Clamidosporas: Son estructuras de supervivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados bajo condiciones de crecimiento desfavorables, con un tiempo de vida medio de 84-365 días. Las clamidosporas de *P.*

cinnamomi tienen diámetros promedio de 40 a 135 µm, son de pared delgada (0.5 µm), globosas y muchas son de forma irregular, pueden presentar grupos de dos a tres por hifa de forma terminal, con apariencia similar a un racimo de uvas, o intercaladas en el micelio (Acosta, 2008; Castañeda, 2009).



Fig. N°5

- A) Micelio cenocítico con hinchamientos hifales típico de *P. cinnamomi*
 B) Colonia de *P. Cinnamomi* tipo coroloide o camelia en medio PDA.

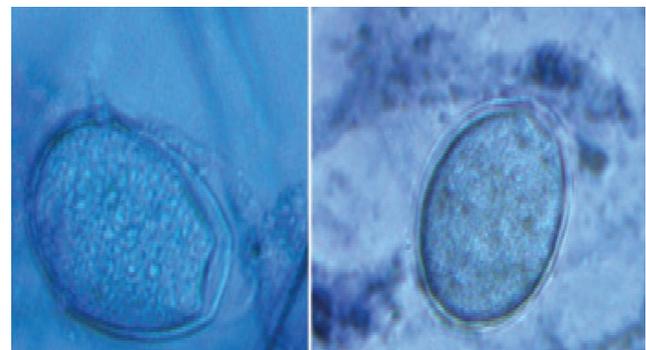


Fig. N° 6.- Zoosporangios de *P. cinnamomi* que es una estructura de reproducción asexual

C). - PRUEBA DE CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO

En el cuadro N° 1, se observa los promedios de la velocidad de crecimiento en cm. de la prueba de control in-vitro; destacan el tratamiento T6 y T4; en el cuadro N° 14 (ANVA), indica que hay diferencia altamente significativa entre los tratamientos.

Cuadro 1: Promedios de datos numéricos del control biológico in-vitro

	TRATAMIENTOS			
	T1	T4	T3	T2
medio	1.65	1.27	1.43	1.06

T1: Testigo <i>P.cinnamomi</i>	T3: <i>T.viride</i> vs <i>P.cinnamomi</i>
T2 <i>T. harzianum</i> vs <i>P.cinnamomi</i>	T4; <i>B. subtilis</i> vs <i>P. cinnamomi</i>

Cuadro 2: Análisis de variancia para la velocidad del crecimiento de *Pythium* frente al control biológico in-vitro.

F.D.V	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft (0.05, 0.01)
Tratamiento	3.0	0.751	0.250	78.32	3.49, 5.95 **
Error	12.0	0.038	0.003		
Total	15.0	0.79			

CV = 5.23 %

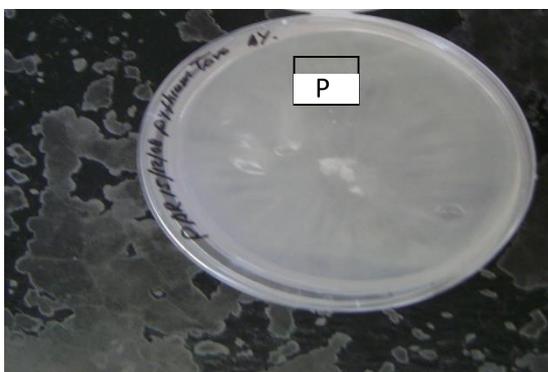
Según la prueba de Tukey (cuadro 3) los tratamientos (T6) mejores biocontroladores de *Pytophthora cinnamomi* *Bacillus subtilis* y (T4) *Trichoderma harzianum* fueron los

Cuadro 3: Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) de la velocidad de crecimiento en cm de *Pytophthora cinnamomi* frente al control biológico in vitro.

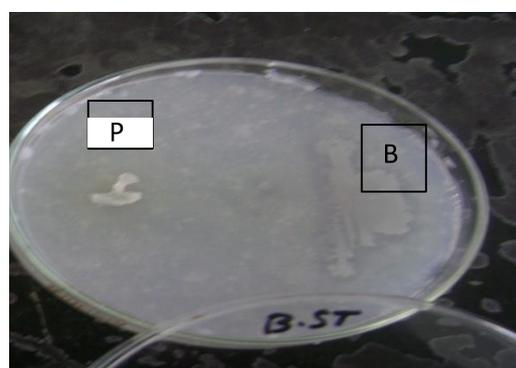
Tratamiento	Ritmo de crecimiento	Tukey
T1	1.65	a
T3	1.43	b
T4	1.27	c
T2	1.06	d

T1: Testigo *P.cinnamomi*

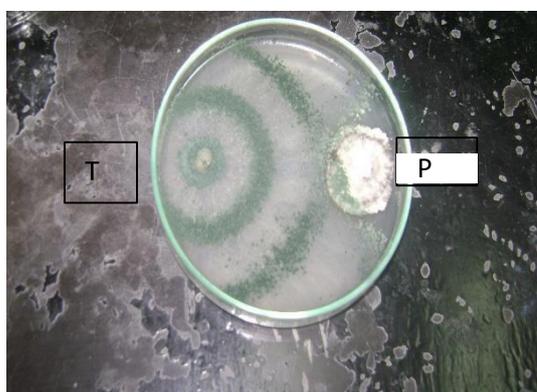
T5: *T. viride* vs *P. cinnamomi*



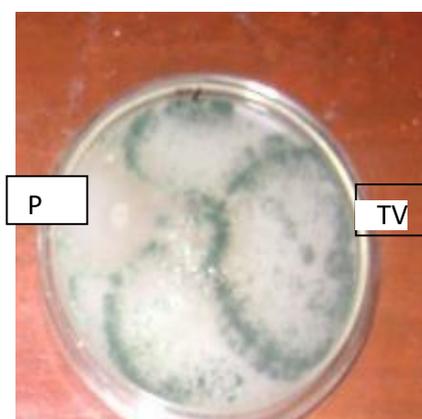
Testigo *P.cinnamomi* (P)



P.cinnamomi (P) y *Bacillus subtilis* (B)



T.harzianum (TH) VS *P.cinnamomi* (P)



T.viride (TV) *P. cinnamomi* (P)

Figura 7. Prueba de control biológico in-Vitro frente a *P. cinnamomi* como patógeno

Los resultados de esta prueba nos indican que se notó una efectividad hiperparasitaria de las especies de *Trichoderma*, el que tuvo mejor control fue el *Trichoderma harzianum*, ya que *Phytophthora cinnamomi* fue limitado significativamente en su crecimiento e incluso tuvo mayor competencia en espacio frente al fitopatógeno, ya que incluso llegó a colonizar encima del fitopatógeno en un periodo de 4 días (fig. 17). Por otro lado, en el enfrentamiento con *B.subtilis*, *Phytophthora cinnamomi* retardó en su crecimiento por lo tanto su desarrollo fue muy lento y la colonia se mostró no compacta, *Bacillus* no llegó a cubrir al fitopatógeno como lo observado en el caso del *Trichoderma harzianum*.

V.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- ABCAGRO. 2002. Agroinformación – El cultivo de palta – A b c A g r o . D i s p o n i b l e e n : http://www.abcagro.com/frutas/frutas_tropicales/palta.asp (consultado el día 8 de setiembre de 2017, a las 8:32 a.m.).
- 2.- Acosta I. 2008. Pruebas de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en plántulas de aguacate criollo Mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Tesis Profesional no publicada, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
- 3.- Agrios, G. N. 1995. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa S.A. De C.V.
- 4.- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. Fourth. Edition American Press. San Diego, California, U.S.A. 635pp.
- 5.- AGROAREQUIPA. 2011. Producción Agraria: Cultivo de palto . D i s p o n i b l e e n : agroarequipa.blogspot.com/2011/08/cultivo-de-palto.html (consultado el 5 de setiembre de 2017, a las 10 a.m.).
- 5.-AGRODATA 2007. La revista agraria. Disponible en <http://www.cepes.org.pe/revista/agraria.htm> (consultado el día 8 de setiembre de 2017, a las 5:21 p.m.).
- 6.- Catalogue of life. 2017. *Phytophthora cinnamomi*. R e t r i e v e M a r c h 8 t h , 2 0 1 7 f r o m : <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/8798708/source/tree>.
- 7.- Castañeda E. 2009. Búsqueda de portainjertos de aguacate tolerantes-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Doctorado no publicada, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México.
- 8.- Erwin C. & Ribeiro K. 1996. *Phytophthora* Diseases World-wide. APS PRESS. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 562p.
- 9.- Franciosi, R. 2003. El Palto, Producción, Cosecha y Post Cosecha. Ediciones Cimagraf. Lima - Perú. 225pp.
- 10.-Gamarra A. 2009. Lasiodiplodia en mango. Disponible en [la página angeldiga2000@hotmail.com](mailto:angeldiga2000@hotmail.com) angeldiga2000@yahoo.com. Publicado el 08 de enero de 2013. Consultado el 23 de marzo del 2015.
- 11.- Gutiérrez, A. 2013. Manejo agronómico del Palto (*Persea americana*. Mill) variedad Hass en Chao-La Libertad. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.
- 12.- Jaramillo S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Monografía. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- 13.- Mont Koc, R. 1993. Principios de control de las enfermedades de las plantas. Departamento de Sanidad Vegetal. U.N.A.M.L. Lima – Perú. 175pp.
- 14.- Newell G. 1994. The effect of *Phytophthora cinnamomi* on the habitat utilization of *Antechinus stuartii* in a victorian forest. Thesis for the degree of Doctor unpublished, Deakin University, Melbourne, Australia.