

CARACTERIZACION MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS POR PCR (ITS1 e ITS4), ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL AGUACATE (*Persea americana*) EN EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA

Natalia Marin Beltrán¹

Juan Diego Rincón López²

RESUMEN

El cultivo de aguacate en Colombia ha presentado un incremento en el área sembrada durante la última década, especialmente en clima frío moderado, entre 1.800 y 2.500 msnm. La variedad Hass se destaca por tener la mayor área sembrada en este clima. Este cultivo presenta grandes retos tecnológicos para su expansión; entre ellos el manejo de enfermedades ocupa un lugar predominante por las implicaciones que tiene en costos, impacto en la salud, ambiente y restricciones para exportaciones. La marchitez, ocasiona la muerte de numerosos árboles en todas las etapas del cultivo y presenta la mayor incidencia y severidad de las enfermedades identificadas para este cultivo. El desconocimiento de los agentes causales de esta enfermedad, ha llevado a realizar prácticas de manejo inadecuadas. Esta investigación tiene como objetivo caracterizar los agentes fúngicos causales de la marchitez de *Persea americana*, de acuerdo a sus estructuras microscópicas y corroborar su identidad mediante técnicas de biología molecular. Los microorganismos que se han encontrado hasta el momento en los municipios de Santa Rosa de Cabal, Quinchía, Pereira, Belén de Umbría, Apia y Balboa son: *Fusarium* sp., *Cylindrocladium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Verticillium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp. No obstante, como es un trabajo en curso, se está haciendo un análisis más amplio de muestras de raíces provenientes de los distintos municipios, y posteriormente corroborar mediante técnicas de biología molecular la identidad de los hongos fitopatógenos aislados.

Palabras claves: Hongos, fitopatógenos, Aguacate, marchitez y Risaralda

INTRODUCCIÓN

En Colombia, se siembra aguacate desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm, principalmente para el mercado local (Bernal & Cipriano, 2008; Ríos & Tafur, 2003). La producción se caracteriza por la siembra de árboles nativos principalmente. El aumento del consumo *per capita* interno y su potencial exportador como fruta fresca y procesada, condujo al incremento de la siembra de variedades mejoradas aptas para varios climas, destacándose la variedad Hass para clima frío moderado. La mayor área sembrada de esta variedad se encuentra en el departamento de Antioquia con 2300 ha y con una proyección de 10 000 ha al 2015 (Ruiz, 2010; Mejía, 2010; Bernal & Cipriano, 2008; Ríos & Tafur, 2003).

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarcedu.co

El cultivo es afectado por importantes problemas fitosanitarios que limitan su producción, por su frecuencia y severidad, se destacan: Pudrición de raíz (*Phytophthora cinnamomi* var. *Cinnamomi*) considerado el patógeno de mayor incidencia y desorden fisiológico (Zentmyer, 1984; Pérez, 2008; Ramírez, 2013). Llaga radical (*Armillaria mellea*) (Ramírez, 2013). Llaga radical (*Rosellinia* sp.) (Lopez *et al*, 1999; Bartoli, 2008). Roña (*Sphaceloma perseae*) (Ceja *et al*, 2000) Antracnosis, muerte descendente (*Glomerella cingulata* (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides*) (Zamora *et al*, 2001; Vidal *et al*, 2005; Reyes, 1996). Mancha negra o Mancha anular (*Pseudocercospora purpurea*) (Mavuso *et al*, 2015). Pudrición chocolate (*Rhizopus stolonifer*) (Tamayo, 2007). Pudrición del fruto (*Dothiorella* sp) (Tamayo, 2007). Secamiento descendente (*Lasiodiplodia theobromae*) (Alama, 2006; Picos, 2015). Fumagina (*Capnodium* sp, *Asteridiella perseae*, *Calothyriolum aphiahynum*, *Lembosia perseae*, *Meliola antioquiensis*) (Tamayo, 2007). Mildeo polvoso (*Oidium* sp) (Bartoli, 2008).

Actualmente se describen problemas radicales por entidades fúngicas diferentes a *Phytophthora cinnamomi*, sus síntomas en campo y su comportamiento en diferentes patrones de aguacate en fase de vivero es una incognita, motivo por el cual, es de importancia conocer sus aspectos epidemiológicos para su manejo.

Según reportes de productores de aguacate (*Persea americana* Mill) en el departamento de Risaralda se presenta síntomas de marchitez ocasionadas por diversas entidades fúngicas, las cuales inicialmente son atribuidas al pseudohongo *Phytophthora cinnamomi*. Actualmente Según Ramirez *et al.*, (2013), diversos patógenos están involucrados en la marchitez del aguacate en Colombia, entre los cuales se encuentran diversas especies de *Fusarium* y el complejo *Cylindro* que lo conforman los hongos fitopatógenos *Cylindrocladium* sp. y *Cylindrocarpon* sp., ocasionando síntomas en campo similares a los de *P. cinnamomi*.

Actualmente no se conoce con precisión los hongos fitopatógenos que se encuentran asociados a la marchitez del aguacate, motivo por el cual es necesario caracterizar los agentes fúngicos de acuerdo a sus estructuras microscópicas y corroborar su identidad mediante técnicas de biología molecular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aguacate es una fruta que tiene un alto potencial, gracias a su aceptado consumo en fresco y las cualidades que tiene para su procesamiento agroindustrial (Ramírez, *et al*. 2014). Sin embargo debido al aumento de la población mundial, el deterioro del medio ambiente, y la gran capacidad de variación genética de los microorganismos fitopatógenos, han llevado al ser humano a desarrollar procesos de producción agrícolas más extensivos, que a lo largo de la historia han traído consigo plagas y enfermedades más agresivas a los cultivos. Como agente causal asociado al marchitamiento de la planta de aguacate, se señala al hongo *Verticillium albo atrum*, no obstante, los signos y síntomas que presenta la planta pueden confundirse con la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi* (Bernal y Díaz, 2005). Por lo que es muy importante realizar un diagnóstico seguro.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

A pesar de que el departamento de Risaralda, presenta condiciones agroecológicas óptimas para el cultivo de *Persea americana*, la variación genética que presenta estos microorganismos, han ocasionado que las enfermedades provocadas por estos hongos varíen constantemente, desencadenando una confusión para su correcto diagnóstico y manejo. Por lo tanto, es necesario desarrollar en primera instancia este tipo de investigación que permita identificar hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del aguacate. Este trabajo permitirá caracterizar entidades fúngicas reportadas o no reportadas en el cultivo de *Persea americana* en el departamento de Risaralda. La pregunta de investigación que se pretende abordar en la elaboración de este proyecto es ¿Cuáles son los hongos fitopatógenos, asociados a la marchitez del aguacate (*Persea americana*) en el departamento de Risaralda?

JUSTIFICACIÓN

Gracias a la alta demanda que tiene la fruta para la exportación y las condiciones agroecológicas que se presentan en el departamento de Risaralda, el cultivo de *Persea americana* se ha convertido en una de las oportunidades más rentables del sector agrícola. Adicional a esto, en la Ley 1753 del 2015 Plan Nacional de Desarrollo (PND), existe una estrategia de transformación del campo, cuyo objetivo es impulsar la competitividad rural a través de la provisión de bienes y servicios sectoriales que permitan hacer de las actividades agropecuarias una fuente de riqueza para los productores del campo (Bases del Plan Nacional de Desarrollo, 2014-2018). De acuerdo con este objetivo, la información derivada de este trabajo servirá como base para desarrollar planes de manejo agronómico que permitan establecer a largo plazo estrategias de control y prevención de los agentes causales del marchitamiento de la planta de aguacate en el departamento de Risaralda. Por esta razón, es muy importante conocer, caracterizar y distinguir los diferentes hongos fitopatógenos que atacan el cultivo y por consecuencia generan una pérdida tanto en el rendimiento como en la economía del agricultor. La realización de este estudio podría llegar a identificar especies de hongos fitopatógenos no reportados a la marchitez del aguacate en el departamento de Risaralda, y a su vez facilitaría la implementación de estrategias para el mejoramiento de la competitividad del sistema productivo, especialmente en el componente fitosanitario.

Aunque no se conoce con exactitud las pérdidas causadas por la marchitez del aguacate, si es importante poder caracterizar estos hongos a nivel microbiológico y molecular para determinar no solo su morfología, sino a su vez poder dar soluciones para el manejo de esta.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar microbiológica y molecularmente hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del aguacate (*Persea americana*) en el departamento de Risaralda.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Reconocer hongos fitopatógenos asociadas a la marchitez del cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.)
2. Identificar mediante técnicas de biología molecular las entidades fúngicas aisladas
3. Caracterizar los síntomas de los patógenos mediante pruebas de patogenicidad y postulados de Koch.

REFERENTE TEORICO

El aguacate es una fruta tropical con creciente aceptación en los consumidores del mundo gracias a su contenido nutricional, a las diferentes opciones para su consumo en fresco y procesado y su uso en la industria cosmética (ICA, 2012). Gracias a estas características, Colombia ha experimentado una alta dinámica, lo que ha generado el incremento de área sembrada como resultado de las expectativas de exportación como fruta fresca o procesada, las buenas condiciones agroclimáticas que posee el país y el aumento en el consumo per cápita interno, lo que lo obliga a ser un país importador (Ríos y Tafur, 2003; Bernal y Cipriano, 2008; Mejía, 2010). El país cuenta con aproximadamente 22.000 hectáreas de aguacate en producción, en 65 municipios de 9 departamentos; De las cuales 2.086 son georreferenciadas en el departamento de Risaralda (Bermúdez, *et al.* 2015). Por consiguiente, el sector frutícola en Risaralda ha contribuido, en la última década, a la diversificación y dinamismo de la agricultura, como consecuencia, en gran medida, de la situación cafetera. Este escenario ha favorecido especialmente a los municipios del occidente del departamento como Belén de Umbría, Santuario, Apía y Quinchía, además de Santa Rosa de Cabal (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, *et al.* 2006).

Pese a las buenas condiciones agroecológicas, el alta demanda de la fruta para la exportación y la alternativa de diversificación que presenta el cultivo de aguacate para las zonas más altas de la zona cafetera central. El cultivo de aguacate es afectado por un importante complejo de enfermedades. Al respecto, el Instituto Colombiano Agropecuario (2012) alertó sobre la disminución del rendimiento, debido al incremento de la incidencia y severidad de enfermedades causadas por hongos y a la proliferación de focos de infección (Reina, *et al.* 2015).

Los hongos son el grupo de microorganismos que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que más investigación se ha realizado. Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas (National Academy of Sciences 1980, Agrios 1988). En Colombia, los hongos asociados al complejo marchitez que se han reportado son: *P. cinnamomi*, *Verticillium* sp., *A. mellea*, *Cylindrocladium* sp., *Rosellinia* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. (Navarro, 1989; Buriticá, 1999; Ciro et al. 2006 y Tamayo, 2007).

La identificación preliminar de fitopatógenos basada en estudios taxonómicos de los hongos y su patología sobre hospedero (Aoki *et al.*, 2005), requiere tiempo y experiencia considerables, sin embargo, los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

analizando regiones específicas dentro de genes (Rincón, *et al.* 2016). Tanto para estudios de variabilidad genética como para análisis de regiones conservadas, se han evaluado diferentes marcadores moleculares. Las regiones que codifican para el ARN ribosómico (ADN mitocondrial, ADN nuclear), tienen mayor interés en estudios de taxonomía y filogenia de hongos, mientras que las zonas no codificantes del ARNr, son más utilizadas en investigaciones de identificación y tipificación de estas especies (Iturralde, 2005). Los genes 18S, 5.8S y 28S del ARNr, (operón de ADN ribosómico), se separa por dos regiones espaciadoras internas que se transcriben, ITS1 e ITS2. Las regiones ITS son consideradas como una secuencia universal de códigos de barras para especies fúngicas (Iturralde, 2005).

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Se están recolectando muestras de raíz de aguacate (*Persea americana Mill*) en diferentes municipios del departamento de Risaralda, las muestras vegetales que se recolectan son aquellas que presentan anomalías, aparentemente originadas y ocasionadas por microorganismos fitopatógenos. Los predios se están visitando ocasionalmente para identificar síntomas y obtener aislados de cada patógeno provenientes de diferentes estados de desarrollo del cultivo.

Posteriormente, las muestras se están llevando al laboratorio de Cultivo de tejidos de la Universidad Santa Rosa de Cabal, UNISARC, para el aislamiento en condiciones controladas y el diagnóstico de los posibles agentes causales.

Para la siembra del material vegetal en medios de cultivo se toman pequeñas fracciones de las raíces que contengan los síntomas y se realiza el proceso de desinfestación.

PROTOCOLO DE DESINFESTACIÓN

Con el objetivo de garantizar que los crecimientos fúngicos observados coincidieran con los síntomas presentes en las muestras, se realiza un protocolo de desinfestación según Agrios (1995) que consiste en los siguientes pasos:

1. Lavado con hipoclorito al 1% por un minuto
2. Lavado con alcohol al 70% por un minuto
3. Lavado con agua destilada estéril (H₂O de) por cinco minutos
4. Secado de la muestra con papel filtro por 5 minutos

Este protocolo de desinfestación nos ayuda a evitar el desarrollo de otros posibles microorganismos contaminantes asociados a la muestra.

AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGOS

Las estructuras afectadas se siembran en condiciones asépticas (Cámara de flujo laminar) en medios de cultivo como: Potato (4,0g/l) Dextrosa (20g/l) Agar (15g/l) – PDA, al que se le adiciona ácido láctico al 1% para evitar el desarrollo de bacterias. Rosa bengala (Peptona 5g/l, Dextrosa 10g/l, fosfato de potasio 1g/l, sulfato de magnesio 0.5g/l, Rosa bengala g/l, cloranfenicol 0.10g/l), medio de cultivo que evita el crecimiento de levaduras, mohos y

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

bacterias contaminantes que interfieren en el reconocimiento del agente causal. Y medio Agar Avena, medio para inducir la esporulación de los hongos en estudio. Hasta obtener los cultivos puros.

Los aislados se someten a la cámara de termoterapia a 28°C, favoreciendo el crecimiento del patógeno. Los cultivos se observan semanalmente y se re aíslan los aislados hasta obtener el cultivo puro e identificarlos con ayuda de claves taxonómicas.

IDENTIFICACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS CEPAS

Una vez obtenido cultivos puros de los aislados, se precede a su clasificación taxonómica por descripción de las estructuras al microscopio. Se realizan montajes en cubre y porta objetos en compañía de azul de lactofenol para teñir estructuras especializadas hialinas y visualizadas en un microscopio óptico a 4X, 10X y 40X. Y para la clasificación de hongos fitopatógenos, se utilizan guías taxonómicas especializadas de Barnett-Hunter (1998) y el libro de Castaño-Zapata (2015).

Debido a que la mayoría de los casos la identificación al microscopio solamente nos permite identificar los órdenes, familias y algunos géneros se procedió a la identificación molecular de cada uno de los aislados para confirmar las especies patógenas. Para la identificación molecular se estandariza la metodología de extracción de ADN a partir de colonias puras de los hongos y de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de regiones conservas del genoma del reino Fungi.

• Extracción de ADN a partir de las colonias puras de hongos

Con el objeto de garantizar una buena calidad de ADN para la amplificación por PCR se procedió a colocar a punto el protocolo de extracción del ADN fúngico a partir del crecimiento micelial en medio de cultivo. En este estudio se está utilizando el protocolo Hafner, *et al.*, (1995):

1. Recoger micelio activo del hongo y triturar con ayuda de un mortero
2. Agregar Sodio Dodecil Sulfato – SDS, al 1% en relación 1:1 con relación al tejido vegetal
3. Agregar Fenol (1:1)
4. Adicionar Cloroformo (1:1)
5. Mezclar vigorosamente
6. Centrifugar a máxima velocidad (13.000 a 14.000 rpm) por 15'
7. Recoger el sobrenadante
8. Re-extraer con un volumen igual de cloroformo
9. Mezclar vigorosamente
10. Centrifugar a máxima velocidad (13.000 a 14.000 rpm) por 15'
11. Recoger el sobrenadante
12. Precipitar los ácidos nucleicos totales con Isopropanol en una relación (1:0,25)
13. Precipitar por centrifugación a máxima velocidad (13.000 a 14.000 rpm) por 10'
14. Secar el precipitado por 5 minutos a temperatura ambiente
15. Resuspender con H₂O biodestilada estéril

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

- **Ampliación de la región ITS**

Para identificar molecularmente las cepas de hongos, se está amplificando por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la zona del genoma comprendido entre las unidades ribosomales 18S rDNA y 25S rDNA, que incluye las regiones no conservadas y el ribosoma 5.8S rDNA. En este trabajo se está utilizando los primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') que amplifican la totalidad de esta región (White, *et al.*, 1990).

La mezcla de la PCR se hace en un volumen total de 50µl, conteniendo un 1X del tampón de reacción, 400nM de cada primer, 100µM de cada dNTPs y 1.0 mM de MgCl₂ y 0.5 unidades de encima *taq polimerasa* (Ref. Biotools B&M, 10042), utilizando las siguientes condiciones del ciclo del termociclador:

94°C – 5 min	} 35 veces
94°C - 30 seg	
40°C - 1 min	
72°C - 2 min	
72°C - 10 min	
4°C ∞	

- **Secuenciación**

Los productos obtenidos serán enviados directamente a MACROGEN Korea, donde los procesaran.

Análisis

Las secuencias se limpiarán de indeterminaciones con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, (1997) y posteriormente serán comparadas utilizando el BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, *et al.*, 1990) para encontrar similitudes en el GenBank.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Con el objeto de verificar los síntomas de campo y su relación con los agentes causales aislados, se está realizando pruebas de patogenicidad en plántulas, las cuales se obtienen de la siguiente manera:

A. Selección y preparación de semillas

Se someten a tratamiento hidrotérmico a 48-50°C por treinta minutos, luego son sumergidas en una mezcla de los fungicidas carboxín + captan durante 15 min (Tamayo 2007) Después se les remueve la testa de la semilla y se realiza un corte basal de dos a cuatro mm y un corte apical de 10 a 20 mm, para acelerar la germinación (Bernal & Cipriano, 2008). Las semillas procesadas se siembran en bolsas plásticas (1kg de capacidad), con sustrato (50% suelo, 25% cascarilla de arroz, 25% humus), previamente esterilizado en autoclave a 15 libras de presión y 121°C, por dos ciclos de 1 h. Las plantas se mantienen en condiciones de casa-malla evitando así factores externos.

B. Inoculación

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

A partir de cepas fúngicas aisladas de árboles con síntomas de marchitez, se prepara la suspensión de esporas de la siguiente manera:

1. Se prepara diluciones de los patógenos a partir de los medios de cultivos puros, raspando el micelio con un asa triangular y diluyendo los fragmentos obtenidos en H₂O destilada.
2. Las mezclas obtenidas se agitan a 120 rpm por una hora se calcula la concentración de unidades infectivas por mililitro con ayuda de un hemocitómetro. Para los patógenos respectivo se utiliza una concentración de 1×10^7 por mililitro.
3. Se inoculan 20 ml de suspensión de esporas sobre plántulas de aguacate de un mes de edad en estado de vivero, que posean 5 hojas completamente expandidas (5-7 cm de altura).

Para cada cepa se realizan 10 réplicas (plántulas) y como variables a evaluar después de 80 días después de la inoculación serán:

- Tiempo medio de aparición de síntomas (TMAS)
- Tiempo medio de muerte de las plántulas (TMMP)
- Diámetro de la raíz
- Peso seco raíz
- Expresión de los síntomas (Necrosis, muerte, manchas foliares, etc)

Los datos son exportados al programa Excel 2016 y analizados mediante el programa Infostat versión estudiantil 2011. Para las variables medidas en las pruebas de patogenicidad se evaluará la homocedasticidad y normalidad de los datos, utilizando los ensayos de Levene y Kolmogorov-Smirnov respectivamente. Después se realizará el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 99%.

RESULTADOS OBTENIDOS

Descripción de los patógenos

Se procesaron un total de 60 muestras de raíces afectadas, de estas muestras se obtuvieron 186 aislamientos, provenientes de 6 predios: finca Guadalupe, municipio de Santa Rosa de Cabal, finca La Primavera, municipio de Balboa, finca La Hermosa, municipio de Quinchía, finca La Maloka, municipio de Pereira, La Maria, municipio de Apia y Finca el Papito, municipio de Belén de Umbría. Los aislados en medio de cultivo fueron descritos macro y microscópicamente, y posteriormente clasificados utilizando las claves especializadas de hongos de Barnett (1967), Samson, *et al.*, (1984), Domsch y Gams, (1993), Kirk, *et al.*, (2001), Barnett y Hunter (2003).

A. Descripción de los síntomas en campo

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

Se encontró marchitez generalizada de los árboles, caracterizándose por la muerte progresiva de las hojas y su posterior caída. Al realizar la extracción de las raíces se observaba coloración oscura y el cilindro presentaba tonalidades rojizas, indicando obstrucción vascular.

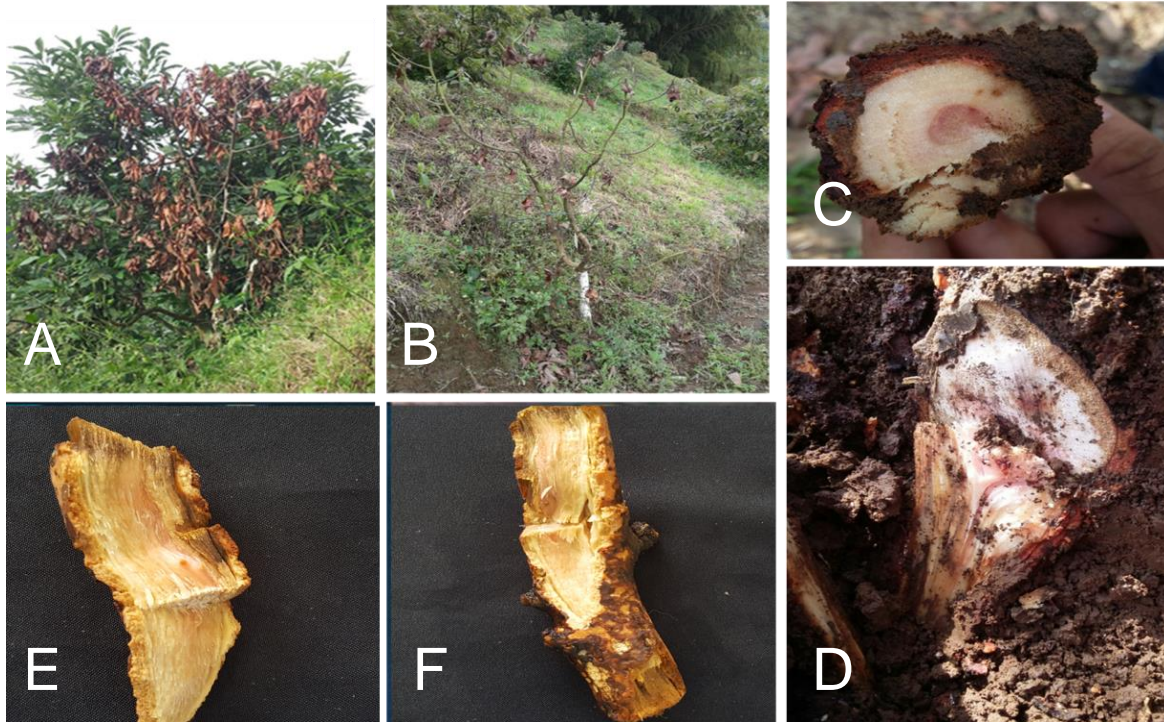


Figura 1. A, B. Síntomas árboles de aguacate. C, D. Coloración oscuro en la corteza de las raíces. E, F. Tonalidad rojizo y marrón en el cilindro central de las raíces.

B. Descripción de los hongos fitopatógenos

De los 186 aislamientos, se ha determinado hasta el momento la presencia de 6 hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*.

El primero, con un crecimiento micelial lento y superficial, de coloración blanca a amarillo pálido u ocasionalmente rosado a violeta, se observó mediante microscopia esporas alargadas, ligeramente curvadas, con extremos agudos, segmentada, propias del género *Fusarium* sp. características que coinciden con Dueñas, *et al* (2008) y, Osorio y Castaño (2011) en estudios de caracterización del género *Fusarium* en diferentes cultivares.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

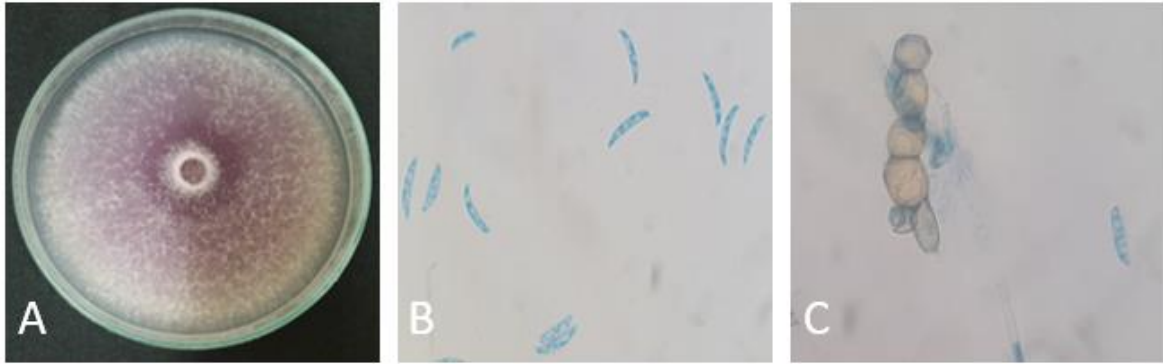


Figura 2. A, B. Crecimiento en medio de cultivo y estructuras de *Fusarium* sp.

Se detectaron dos aislados con alta prevalencia en los aislamientos de raíces afectadas provenientes de los municipios del departamento de Risaralda. El primero se caracterizó por tener un crecimiento lento, de aspecto lanoso y frondoso, con coloración desde verde, pardo hasta amarillo. Microscópicamente se caracterizó por tener esporas rectilíneas, cilíndricas, rectas, de extremos redondeados, de gran tamaño, formadas sobre conidióforos ramificados en forma de árbol o coremio, clamidosporas de color de beige a café claro, formando cadenas. El segundo aislado se caracterizó por tener crecimiento frondoso de textura lanosa, de coloración parda a café oscura y por la presencia de masas conidiales blancas. Microscópicamente se detectó esporas cilíndricas, ligeramente curvadas, segmentadas, ocasionalmente fusoides, clamidosporas redondeadas en dúos unida una de la otra. Estas características son propias de *Cylindrocladium* sp. para el primer aislamiento y *Cylindrocarpon* sp. del segundo.

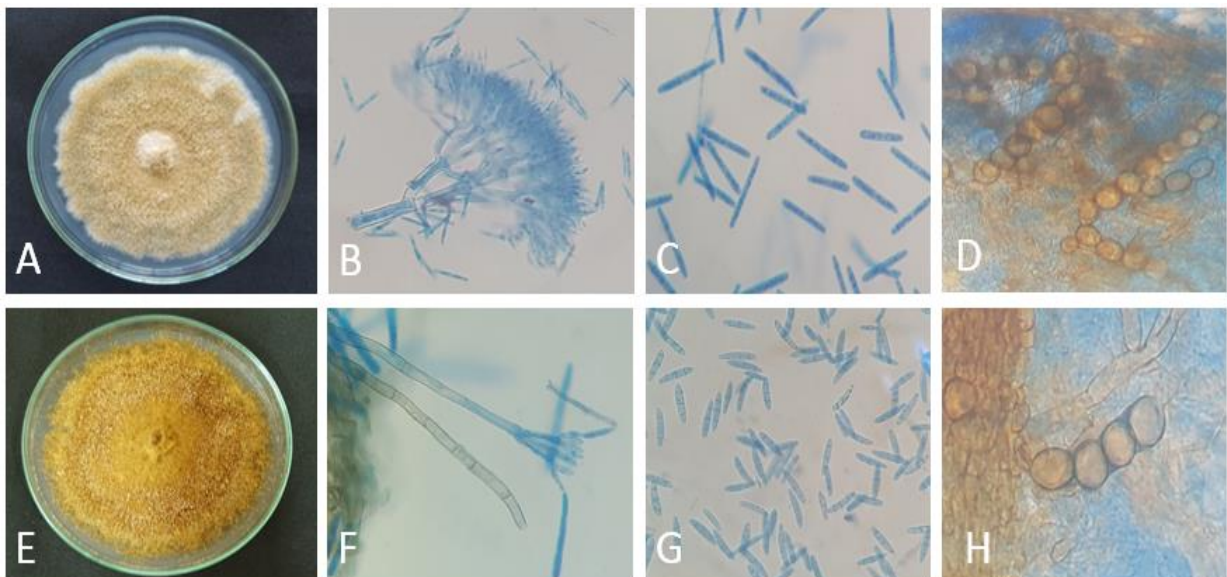


Figura 3. A,B,C,D. Crecimiento en medio de cultivo, conidióforo, conidias y clamidosporas de *Cylindrocladium* sp. **E,F,G,H.** Crecimiento en medio de cultivo, conidióforo, conidias y clamidosporas de *Cylindrocarpon* sp

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

El cuarto aislamiento se caracterizó por presentar crecimiento algodonoso de elevación media, con coloración inicial café, que conforme pasaba el tiempo tornaba a café claro y a los concéntricos de color café. A nivel microscópico se detectó conidióforos ramificados en ángulos agudos, con conidias unicelulares redondeadas. Estas características son propias del género *Verticillium* sp. Estos resultados corresponden a lo descrito por Castaño (2015) en la descripción de especies de *Verticillium* atacando diversos cultivos de importancia económica.

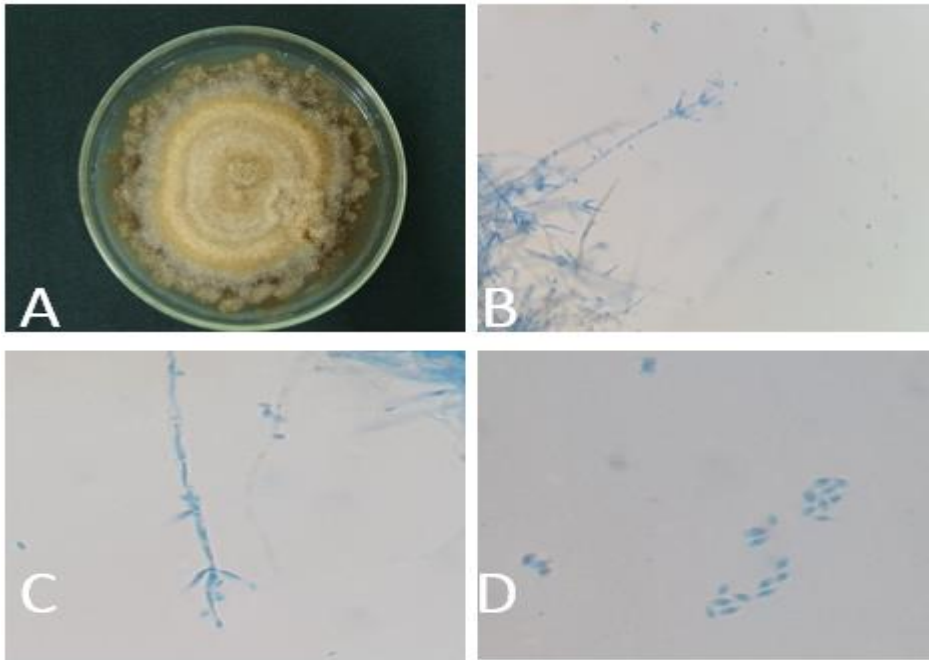


Figura 4. A,B,C,D. Crecimiento en medio de cultivo y estructuras microscópicas de *Verticillium* sp.

El quinto aislamiento se caracterizó por presentar crecimiento algodonoso con altura superficial y de coloración gris oscura. A nivel microscópico se detectó micelio septado formando ángulos de 90°. Estas características son propias del género *Rhizoctonia* sp.

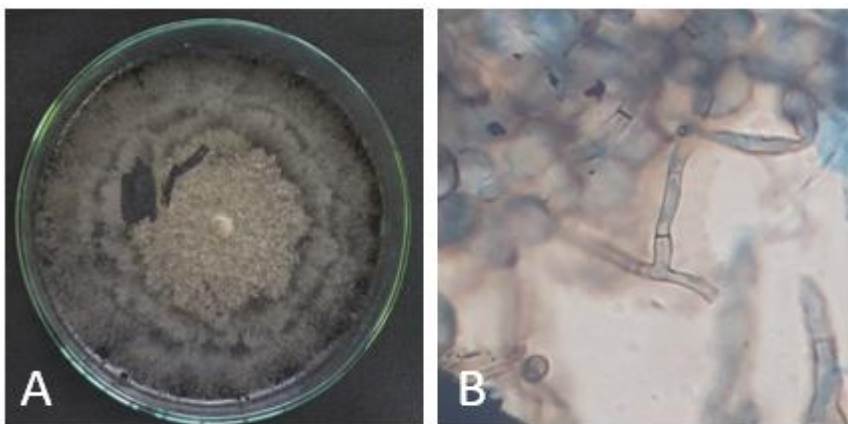


Figura 5. A,B. Crecimiento en medio de cultivo y estructuras microscópicas de *Rhizoctonia* sp.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

El sexto aislamiento se caracterizó por presentar crecimiento algodonoso, con altura superficial e inicia con coloraciones blancas y aros concéntricos oscuros. A nivel microscópico se detectó micelio cenocítico (sin septos) y esporas ovoides que cuando están maduras se tornan oscuras. Estas características son propias del género *Phytophthora* sp.

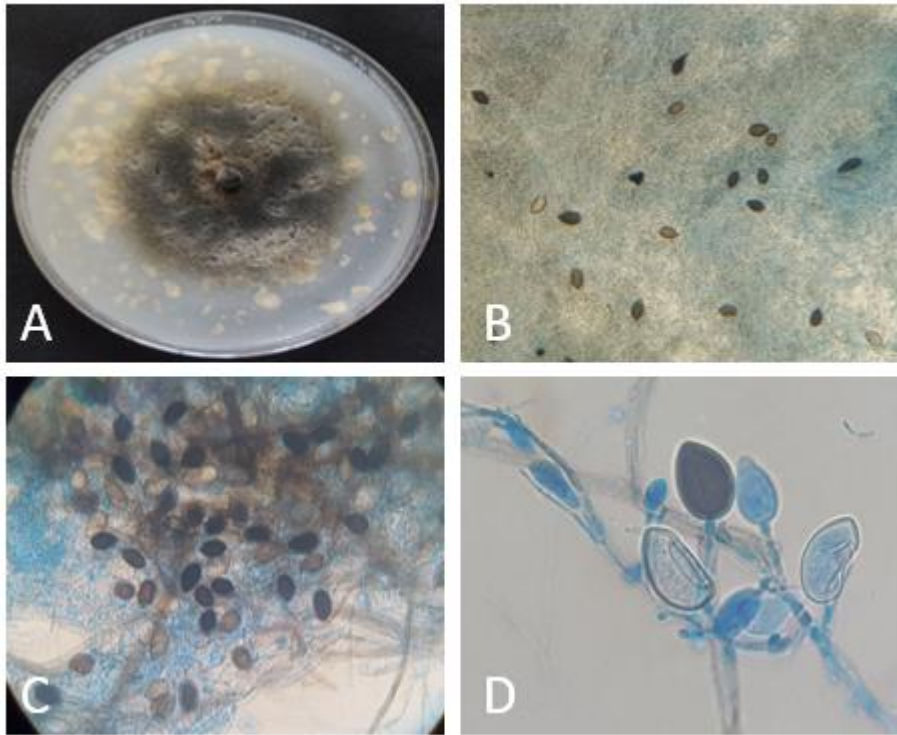


Figura 6. A,B,C,D. Crecimiento en medio de cultivo y estructuras microscópicas de *Phytophthora* sp.

Ceja, *et al* (2000); Tamayo (2007); Perez (2008) y Vitale, *et al* (2012) encontraron especies de los géneros *Phytophthora*, *Cylindrocladium*, *Rosellinia*, *Fusarium* sp., *Cylindrocladiella*, *Cylindrocarpon*, afectando raíces y tallo de aguacate a nivel mundial; estos patógenos pueden afectar la planta en todos sus estados de desarrollo ocasionando 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 (Tamayo, 2007; Pérez, 2008; Ramires y Morales, 2013)

En Colombia, se han reportado como principal causante de la marchitez del aguacate a *P. cinnamomi*, en complejo con patógenos como *Verticillium* sp., *Armillaria mellea*, *Cylindrocladium* sp., *Rosellinia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp (Ciro, *et al*, 2006; Tamayo, 2007). Sin embargo, Ramirez y Morales (2013) determinaron que el organismo causante de la marchitez en aguacate hass en Colombia es *Cylindrocarpon destructans*.

C. destructans causante de la enfermedad Pudrición negra de las raíces no está registrada en los directorios de patógenos de plantas, ni en la literatura revisada para Colombia (Buritica, 1999; Tamayo, 2007; Dann, *et al*, 2011; Vitale, *et al*, 2012). *Cylindrocarpon* sp se

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarce.edu.co

desarrolla preferiblemente en condiciones de saturación de agua (Mahfuzur & Punja, 2005) condición similar a la reportada para el desarrollo de *P. cinnamomi* (Ciro, *et al*, 2006; Tamayo, 2007; Perez, 2008). Debido a la similitud de los síntomas se ocasionan grandes pérdidas económicas por el uso de productos costosos para el control de *P. cinnamomi*, dichos productos que controlan organismo oomicetos son a base de mefenoxam, metalaxyl y cimoxanil los cuales no son efectivos en el control de *Cylindrocarpon sp* (Ramires y Morales, 2013).

RESULTADOS ESPERADOS

- *Análisis más amplio de muestras de raíces de los municipios Muestreados.
- *Corroborar mediante técnicas de biología molecular la identidad de los hongos fitopatógenos aislados.
- *Establecer patrones de síntomas en plántulas de aguacate.

CONCLUSIONES

*Se aislaron de las finca Guadalupe, municipio de Santa Rosa de Cabal, finca La Primavera, municipio de Balboa, finca La Hermosa, municipio de Quinchía, Finca La Maloka, municipio de Pereira, finca La María, municipio de Apia y Finca el Papito, municipio de Belén de Umbría los patógenos: *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Cylindrocladium sp.*, *Cylindrocarpon sp.*, *Verticillium sp* y *Phytophthora sp*.

*Es de importancia identificar a nivel molecular los hongos fitopatógenos hallados y caracterizar los síntomas ocasionados en plántulas de aguacate, cumpliendo así con los postulados de Koch.

IMPACTO SOCIAL

Esta investigación es de importancia, ya que no se cuenta con la caracterización de los hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del aguacate en el departamento de Risaralda. Cabe resaltar que recientemente en Colombia se ha determinado que esta patología no es ocasionada solo por un hongo, por el contrario, se describe la presencia de un complejo de agentes fúngicos, siendo una incógnita en Risaralda la identidad de estos organismos.

Para la estructuración de planes de manejo y control de una patología, el primer paso es conocer las características biológicas del agente causal, tales como ciclo de vida, tipo de parasitismo, medio de diseminación, entre otros.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1995). Fitopatología. *Editorial Limusa S. A.* 838 p.
- Agrios, G.N. (1988). Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. 803 pP
- Agrios, G. (2005). Plant pathology. 5 ed. New York, ud, Academic press. Pp 922.
- Altschul, S. F., Gish. W., Miller, W., Myers. E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 215(3): 403-410.
- Aoki T., O'Donnell K., Scandiani M.M., (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of Fusarium: *Fusarium brasiliense* sp. Nov., *F. cuneirostrum* sp. Nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience.* 46: 162-183.
- Aproare, Sat. (2009). Línea base o diagnóstico de campo. Informativo el aguacate, 2(1):5-7.
- Barnett, H., & Hunter, B. (1998). Ilustred genera of infect fungi. Minnesota: 4ta edition. Aps press. Pp 218.
- Bernal A, Cipriano A. (2008). Tecnología para el cultivo de Aguacate. Manual técnico 5 CORPOICA Centro de Investigación la Selva. Ríonegro, Antioquia. 2008; 241p.
- Bernal, J. A. y Díaz, C. A. (2005) Manual técnico No. 5: Tecnología para el cultivo del Aguacate. Colombia: Ed. Produmedios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Río Negro, Antioquia. (P. 241).
- Besoain X & Pionelli E (1999) Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. *Boletín Micológico*, 14:41-47.
- Bonilla T, Sánchez P, Gonzales M & Pérez M (2011) *Neofusicoccum parvum* y *Phytium vexans*: nuevos patógenos del aguacate descritos en Andalucía. En: VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns. Memorias, editado por avocadosource. p.1-5.
- Buriticá PE (1999) Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. Santafé de Bogotá, Instituto Colombiano Agropecuario. 329p
- Castaño, J. (2015). Principios básicos de hongos fitopatógenos. . Universidad de Caldas. Editorial Universidad de Caldas. 360 p.
- Coffey M (1991) Cause and diagnosis Avocado root rot. *California Grower*, 15:22-23
- Congreso de la República de Colombia. (2015). Ley 1753 del 9 de Junio de 2015, por la cual se expide el plan nacional de desarrollo 2014-2018 “todos por un nuevo país”. 144 p.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisar.edu.co

- Ciro D, Rendon K & Navarro RA (2006) Reconocimiento de la pudrición de raíces (*Phytophthora cinnamomi*) en aguacate (*Persea americana*) en Antioquia. *Revista Universidad Católica de Oriente*, 22:41-51.
- Dann E, Forsberg L, kooke A, Pegg K, Shivas RP & TanY (2011) The 'Cylindro' complex of avocado root pathogens. En: VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns. *Memorias*, editado por avocadosource. p.1-12
- Dueñas G, J., Shagarodsky, T., Fresneda, J., Hernandez, Y., & Gonzales, J. (2008). Caracterización de especies el género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad habana y la Habana. *Revista Agrotecnica de Cuba*.
- Duque DS (2011) Asfixia radicular: estrategias de manejo en Colombia. En: VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns. *Memorias*, editado por avocadosource. p.12-24
- Gutierrez, B., Gonzales, M., & Salih, A. (2006). Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia Solani* Kühn que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) . *Bioagro*. Vol. 18:1.
- Hafner, G. J., Harding, R. M. y Dale, J. L. (1995). Movement and transmission of banana bunchy top virus DNA component one in bananas. *J Gen. VIROL*, 76: 2279-2285
- ICA. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de aguacate Hass, Medida para la temporada invernal. Bogota, Colombia. Pp 75: Instituto Colombiano Agropecuario.
- Iturralde, J. (2005). Identificación genética de hongos. *Sociedad Micológica de Madrid*. España.
- Lafuente, R., Barboza, C., Salcedo, H., Abraham, J., Valadez, L., Quistián, M. y De la Fuente, S. (2016). Identificación Molecular de Hongos Fitopatógenos de Fresa por PCR (*its* y *ef-1 α*) y Susceptibilidad a Bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. Lafuente-Rincón et al. / Vol. 1, No.1. Pp. 417-418.
- Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. BlackwellPublishing, Ames, IA, U.S.A. p. 387.
- Mejia, A. (2010). Cadena Productiva del Aguacate en Colombia. Consejo Nacional del Aguacate. En: *Memorias II Encuentro de la cadena productiva del aguacate*. Ríonegro (Ant).p 1:30.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – MADR Gobernación de Risaralda Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola – FNFH Asociación Hortifrutícola de Colombia Asohfrucol Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle del Cauca – SAG. (2006). *Plan Frutícola Nacional Desarrollo de la fruticultura en Risaralda*.
- Natalia Bermúdez Giraldo, Laura Juliana Valencia y Aldonza Osorio. (2015). Caracterización Socioeconómica de la Producción de Aguacate en uno de los
- ¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com
- ²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

- municipios no certificados del Departamento de Risaralda (Belén de Umbría). Revista Universidad Tecnológica de Pereira. Pp. 6-9.
- National Academy of Sciences. (1980). Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. 223 pP
- Osorio G, L., & Castaño, J. (2008). Caracterización del agente causal de la pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* LINNEO), enfermedad endémica en el municipio de manizales, Caldas. agron. 19(2): 33 - 43.
- 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. G. (2013). Incidencia, Diagnóstico, Comportamiento y Alternativas de Manejo de la Marchitez del Aguacate con Énfasis en *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Revista Universidad Nacional de Colombia*. Pp. 17-19.
- Ramírez J. G., Castañeda D. A. y Morales J. G. (2014). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres* vol.61 no.1. Pp. 50-52.
- Ramírez G, G., & Morales O, J. (2013). Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill) en Colombia. *Rev. Protección Veg.* vol.28 no.1.
- Reina, J., Mayorga M. J., Caldas, S. J., Rodríguez, J. y Varón, E. H.. (2015). El Problema de la Peca en Cultivos de Aguacate (*Persea americana* Mill.) del Norte del Tolima, Colombia. *Revista Corpoica Cienc Tecnol Agropecu.* 16(2). Pp. 265-266.
- Ríos, C., Tafur, R. (2003). Variedades de Aguacate para el Trópico: Caso Colombia. En *Proceedings World Avocado Congress. Actas V Congreso Mundial del Aguacate. Sudafrica.* P 143-147.
- Rodríguez, M. P. (2001). Biodiversidad de los Hongos Fitopatogénicos del Suelo de México. *Revista Acta Zoológica Mexicana (nueva serie), núm. Es1.* Pp. 53-54.
- Schaffer B (2006) Effects of soil oxygen deficiency on avocado (*Persea americana* Mill) Trees. En: Seminario Internacional Manejo del Riego y Suelo en el Cultivo del Palto, La Cruz Chile. Memorias, Editado por Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). P1- 12.
- Sneh, B., Burpee, L., & Agoshi, A. (1998). Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society, APS Press. St. Paul, Minnesota. 135p.
- Stolzy L, Zentmyer GA, Klotz A & Labanauskas C (1967) Oxygen diffusion, water, and *Phytophthora cinnamomi* in root decay and nutrition of avocados. *American Society for Horticultural Science*, 90:67-76.
- Tamayo PJ (2007) Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica*, 4:52-71.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

- Tamayo M, P. (2007). Enfermedades del Aguacate. POLITECNICA No 4, Medellin, Colombia., Pp 51-77.
- Vásquez, L., Ríos, G., Londoño, M., Torres, M. (2011). Caracterización biofísica y socioeconómica del sistema de producción de aguacate cv Hass en los departamentos de Antioquia, Caldas, Risaralda y Quindío. Corporación Colombiana de investigación CORPOICA. 54 p.
- Vitale A, Aiello D, Guarnaccia V, Perrone G, Stea G & Polizzi G (2012) First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160:156-159
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. (pp.315-322) En: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York, USA.
- Zentmyer GA (1984) Avocado diseases. *Tropical Pest Management*, 30:388-400.

¹Estudiante de 9° semestre del programa de Biología de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. naticalama92@hotmail.com

²Director del trabajo, Ingeniero agrónomo y docente de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co