



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**OBTENCIÓN DE PLANTAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.)
LIBRES DE MOTEADO DE LA HOJA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ZAPATA MONTES NERY JAVIER

Bajo la supervisión de:

Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

CHAPINGO, MÉXICO, JUNIO DE 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DIRECCIÓN GENERAL DE ASESORIA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DIRECCIÓN DE EXTENSION PROFESIONAL



Instituto de Horticultura

“OBTENCIÓN DE PLANTAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.) LIBRES DEL MOTEADO DE LA HOJA”

Tesis realizada por Nery Javier Zapata Montes bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

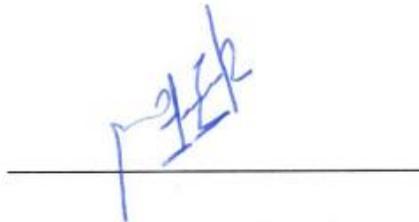
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR



Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

ASESOR



Dr. Juan Ayala Arreola

ASESOR



Dr. Eduardo Campos Rojas

LECTOR EXTERNO



Dr. Erik Acuayte Valdes

Chapingo, Estado de México, Junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado para lograr el grado académico.

Al **Dr. Alejandro F. Barrientos Priego**, quien me ha inspirado por su dedicación, constancia y gran experiencia para lograr el desarrollo de esta tesis, también agradecer su guía y apoyo durante el transcurso del posgrado.

A los **Drs. Juan Ayala Arreola y Eduardo Campos Rojas**, por haber sido parte del comité de tesis y brindar su confianza, y valiosas contribuciones para el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación.

Al Coordinador del Posgrado en Horticultura, **Dr. Juan Martínez Solís** y a los profesores del Doctorado en Ciencias en Horticultura por contribuir en mi formación académica y humana, y compartir sus conocimientos y experiencias profesionales.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **Departamento de Fitotecnia** por haberme dado la oportunidad de continuar mi formación académica y poder obtener el grado de Doctor en Ciencias.

DEDICATORIA

A **Dios** por guiar mis pasos, brindarme salud y sabiduría para lograr las metas propuestas durante toda mi vida.

A mi **Padre Juan Ramón Zapata y a mi Madre Francisca Amalia Montes Osorio**, así como a toda mi familia quienes a pesar de la distancia siempre están a mi lado por sus consejos y apoyo incondicional.

A mi esposa quien ha sido mi mayor inspiración por su apoyo, su tiempo, sus consejos y por brindarme una razón más para creer que la vida es bella, a ti **Margarita**.

A mis amigos **Manuel, Gabriel, Sandra, Arturo, Jefferson, Palomo y Noé**, colegas del posgrado, por haber compartido su amistad, tiempo y compañerismo.

A **Ricardo** por su amistad y apoyo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia.

Al **Departamento de Fitotecnia y al Doctorado en Ciencias en Horticultura**, por darme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente y lograr una meta tan importante.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nery Javier Zapata Montes, nació el 25 de enero de 1979 en León, Nicaragua. Realizó sus estudios de Preparatoria en el Instituto Universitario Mariano Fiallos Gil de 1994-1996. Concluyó sus estudios como Ingeniero en Agroecología en el año 2003. Ingresó al programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo en la generación 2013-2014 finalizando sus estudios satisfactoriamente. En lo referente a su vida profesional se ha desempeñado como profesor-investigador en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua en el Departamento de Agroecología impartiendo cátedras de Entomología, Control Biológico, Manejo Integral de Plagas, Fitopatología, Tecnología Agrícola, Manejo de Cuencas, Ecología y Prácticas Profesionales I-V. También ha laborado como Ingeniero extensionista en Millenium Challenge Corporation CRM-N elaborando Planes de Negocios en los conglomerados agrícolas con asistencia técnica, nutrición, manejo fitosanitario y agronómico de cultivos hortícolas en ambiente protegido y granos básicos. A su vez se ha desempeñado como Ingeniero extensionista en Millenium Challenge Corporation CRM-N/GFA elaborando Planes de Negocios en los conglomerados Forestales, brindando asistencia técnica en el diseño y establecimiento de plantaciones forestales y frutales, nutrición y manejo fitosanitario de los mismos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	i
OBJETIVOS GENERALES.....	7
HIPÓTESIS GENERALES.....	8
LITERATURA CITADA	9
CAPÍTULO I <i>Xylella fastidiosa</i> NO ES CAUSANTE DEL MOTEADO DE HOJA DE AGUACATE.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Transmisión de la enfermedad a plantas sanas mediante injerto de varetas provenientes de plantas enfermas	17
Transmisión de la enfermedad de plantas enfermas a varetas provenientes de plantas sanas.....	17
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
Extracción de ácidos nucleicos	18
Verificación de la integridad de los ácidos nucleicos extraídos.....	20
Cuantificación de ADN utilizando espectrofotometría	20
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen endógeno 16S	21

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i> .	23
.....	
RESULTADOS I	28
Transmisión de síntomas de moteado clorótico a plantas sanas mediante injerto .	28
Transmisión de moteado clorótico del portainjerto a varetas sanas de aguacate ...	29
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i>	
.....	31
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	36
LITERATURA CITADA	37
CAPÍTULO II AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PATOGENICIDAD DE AGENTES	
ASOCIADOS AL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJA DE AGUACATE	41
RESUMEN.....	42
ABSTRACT	43
INTRODUCCIÓN.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Toma de muestras de plantas enfermas.....	47
Preparación de medio Papa Dextrosa Agar (PDA)	48
Preparación de medio Agar Nutritivo (extracto de carne, peptona y agar)	48
Desinfestación del material vegetal	49
Aislamiento de microorganismos	49

Prueba de patogenicidad <i>in vivo</i> en planta de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	50
Prueba de patogenicidad <i>in vivo</i> en plantas de aguacate.....	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN II	53
Aislamiento de microorganismos	53
Prueba de patogenicidad <i>in vivo</i> en planta de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	54
Prueba de patogenicidad <i>in vivo</i> en plantas de aguacate.....	56
CONCLUSIONES.....	58
LITERATURA CITADA	59
CAPÍTULO III TERMOTERAPIA PARA EL MANEJO DEL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJA DE AGUACATE.	62
RESUMEN.....	63
ABSTRACT	64
INTRODUCCIÓN.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS	67
Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (47 a 49 °C) en invernadero de cristal.....	67
Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado.....	68
Tratamiento a varetas con temperaturas bajas (-2 °C).	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN III	71
Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (47 a 49 °C) en invernadero de cristal.....	71

Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado.....	74
Tratamiento a varetas con temperaturas bajas (-2 °C)	78
CONCLUSIONES.....	81
LITERATURA CITADA	82
DISCUSIÓN GENERAL	86
LITERATURA CITADA	91
CONCLUSIONES GENERALES	94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de reactivos para la PCR de gen endógeno 16S.....	21
Cuadro 2. Secuencia de iniciadores para la amplificación del gen endógeno 16S (Trejo-Saavedra <i>et al.</i> , 2015).....	22
Cuadro 3. Programa de temperaturas para PCR del endógeno 16S.	22
Cuadro 4. Concentraciones de reactivos para la PCR con iniciadores RST	23
Cuadro 5. Secuencia de iniciadores para la detección de la bacteria <i>Xylella fastidiosa</i>	24
Cuadro 6. Programa de temperaturas para PCR con iniciadores RST31, RST33, HL5, HL6 para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i>	25
Cuadro 7. Programa de temperaturas para PCR con iniciadores XF1-F, XF6-R (Firrao y Bazzi, 1994).	26
Cuadro 8. Programa de temperaturas para PCR con iniciadores 272-1-int y 272-2- int (Pooler <i>et al.</i> , 1997)	26
Cuadro 9. Resultados obtenidos de la PCR con diferentes iniciadores que detectan la bacteria <i>Xylella fastidiosa</i>	32
Cuadro 10. Análisis de varianza del efecto de tiempos de exposición de plantas de aguacate, con síntomas de moteado a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado. Los datos se trabajaron en proporciones para su mejor análisis.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muerte de vareta 'Hass' proveniente de árboles con síntomas de moteado de hoja y muerte descendente del portainjerto de aguacate 'Don Cris' de cuatro meses de edad.	28
Figura 2. Injertos 'Colín V-33' con síntoma del moteado de la hoja transmitido por una planta con síntomas.	29
Figura 3. Injerto 'Hass' con síntoma característico del moteado de hoja transmitido por una planta sintomática.	29
Figura 4. Amplificación de gen 16S en aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja.....	30
Figura 5. PCR con iniciadores XF1-F, XF6-R para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en muestras de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja.	31
Figura 6. PCR con iniciadores RST31, RST33 y 272-1int, 272-2int para la detección de <i>X. fastidiosa</i> en muestras de aguacate con síntomas de moteado de hoja.....	33
Figura 7. PCR con iniciadores HL5, HL6 para la detección de <i>X. fastidiosa</i> en aguacate con síntomas de moteado de hoja y control positivo de <i>X. fastidiosa</i> de cultivo de vid.....	33
Figura 8. Toma de muestra de savia utilizando la Bomba Scholander.....	47
Figura 9. Muestras de Vena central y parte de hoja afectada con moteado clorótico en medio PDA.	50
Figura 10. Inoculación de suspensión bacteriana (10 ⁸ UFC/ml) en plantas de tabaco con jeringa estéril.	51

Figura 11. Inoculación mediante rodaja de cultivo bacteriano en plantas de aguacate.....	52
Figura 12. Colonias de bacterias aisladas de plantas con síntomas de moteado de hoja.....	54
Figura 13. Síntomas observados días después de inoculación(ddi) con bacterias aisladas de plantas de aguacate con moteado clorótico de hoja a. 6 ddi. b. 19 ddi. c. 27 ddi. d. 34 ddi.	55
Figura 14. Síntomas observados días después de inoculación(ddi) con bacterias aisladas de plantas de aguacate con moteado clorótico de hoja a. 55 ddi. b. 55 ddi. c. 76 ddi. d. 76 ddi. e. 76 ddi. f. 80 ddi.	56
Figura 15. a. Cámara de ambiente controlado (TC-32 Warren Sherer, Kysor Industrial Corp., Division Marshall, Michigan. b. Plantas con síntomas de moteado clorótico de hoja dentro de la cámara.....	69
Figura 16. Temperatura máxima promedio y humedad relativa máxima promedio en el año 2017 en el invernadero de cristal.....	71
Figura 17. Síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate antes del tratamiento de termoterapia.	72
Figura 18. Plantas sin síntomas de moteado clorótico (98 %) después de la aplicación de termoterapia en invernadero de cristal.	73
Figura 19. Segundo grupo de plantas tratadas con termoterapia en invernadero de cristal, mostrando una disminución de 98 % de síntomas de moteado clorótico.	73
Figura 20. Plantas con brotes nuevos sin síntomas de moteado clorótico 8 semanas después de última termoterapia en cámara de ambiente controlado. ...	76

Figura 21. a. Plantas testigo de aguacate 'Duke 7' sin tratamiento, con presencia de síntomas de moteado clorótico de hoja bien diferenciados. b. Planta sometida a bajas temperaturas con síntomas atenuados. 78

Obtención de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) libres del moteado clorótico de hoja de aguacate

Obtaining avocado plants (*Persea americana* Mill.) free of avocado leaf chlorotic mottle

Nery Javier Zapata-Montes¹ y Alejandro F. Barrientos-Priego².

RESUMEN

México es el primer productor y exportador de aguacate en el mundo; en 2017 produjo más del 50 % de la fruta consumida a nivel mundial; desde los 90's se ha observado moteado clorótico de hoja en plantaciones de aguacate. En 2008 en Costa Rica, se identificó a *Xylella fastidiosa* como el causante de síntomas similares al indicado. Dada su importancia económica, se planteó la presente investigación teniendo como objetivos: obtener plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) libres de síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate mediante termoterapia, determinar mediante PCR, la presencia de *X. fastidiosa* en plantas de aguacate con síntomas de moteado de hoja, determinar si el moteado de hoja se transmite por injerto. Resultados. Al injertar vareta sana en planta enferma, 'Hass' presentó 90 % de hojas enfermas con alta severidad (80-90 %), síntomas similares fueron observados en campo, concluyendo que estos son transmitidos por medio de injerto. Los iniciadores RST31, RST33, XF1-F, XF6-R, 272-1-int, 272-2-int y HL5, HL6 arrojaron resultados negativos en la detección de *X. fastidiosa*. Al realizar aislamiento, identificación y patogenicidad de microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate, se obtuvo en medio PDA y Agar nutritivo cuatro bacterias de diferente coloración (blanca, rosa, amarilla y naranja).

ABSTRACT

Mexico is the first producer and exporter of avocado in the world; in 2017, it produced more than 50% of the fruit consumed worldwide; since the 90's leaf chlorotic mottle has been observed in avocado plantations. In 2008 in Costa Rica, *Xylella fastidiosa* was identified as the cause of symptoms similar to those indicated. Given its economic importance, the present investigation was proposed with the following objectives: Obtaining avocado plants (*Persea americana* Mill.) free of avocado leaf chlorotic mottle symptoms by thermotherapy, determining by PCR, the presence of *X. fastidiosa* in avocado plants with leaf mottle symptoms, determine if leaf mottle is transmitted by grafting. Results When grafting healthy budwoods into a diseased plant, 'Hass' presented 90% of diseased leaves with high severity (80-90%), similar symptoms were observed in the field, concluding that the symptoms are transmitted by means of grafting. The primers RST31, RST33, XF1-F, XF6-R, 272-1-int, 272-2-int and HL5, HL6 produced negative results in the detection of *X. fastidiosa*. When carrying out isolation, identification and pathogenicity of phytopathogenic microorganisms associated with the chlorotic mottle of avocado leaf, four bacteria of different coloration (white, pink, yellow and orange) were obtained in PDA and nutritive agar.

Se presentó la bacteria *Clavibacter spp*, con colonias pequeñas de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo al naranja incluso, rosas o rojas. Pruebas de patogenicidad en tabaco mostraron que la bacteria blanca y amarilla fueron más patogénicas con síntomas a partir de 19 días después de inoculación hasta causar la muerte 34 días después. La prueba de patogenicidad *in vivo* en plantas de aguacate resultó en mayor patogenicidad de bacteria de colonia color blanco con síntomas a partir de 55 días con máxima expresión de síntomas a 80 días después de la inoculación.

La termoterapia aplicada en este estudio bajo condiciones de invernadero de cristal resultó en 98 % de plantas sin síntomas de moteado clorótico de hoja. Al realizar el análisis de varianza, se obtuvo que F calculada es igual a 4.171 y con un $\alpha = 0.05$ se obtuvo una F de tabla de 4.17, por lo tanto, como F calculada es mayor que la F de tabla se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los tiempos de exposición afectan de manera significativa a la eliminación de síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate en 'Duke 7'.

Con los datos del análisis de varianza se calculó la T (0.05) = 0.056, y la diferencia de las medias de los dos tratamientos = 0.42; como regla de decisión tenemos que el valor $0.42 > 0.056$, por lo tanto, las medias de los dos tratamientos son significativamente diferentes y además la exposición de las plantas con síntomas de moteado a una temperatura de tres horas dio mejores resultados en cuanto al control del moteado con un promedio de 72 % de disminución de severidad a comparación del tratamiento de hora y media con promedio de 30 % de disminución de severidad de moteado de hojas.

The bacterium *Clavibacter spp* was presented, with small colonies of slow growth, mucoid, convex from yellow to orange, even pink or red. Tests of pathogenicity in tobacco showed that white and yellow bacteria were more pathogenic with symptoms from 19 days after inoculation to cause death 34 days later. The *in vivo* pathogenicity test in avocado plants resulted in greater pathogenicity of white colony bacteria with symptoms as of 55 days with maximum expression of symptoms at 80 days after inoculation.

The thermotherapy applied in this study under glasshouse conditions resulted in 98% of plants without leaf chlorotic mottle symptoms. When performing the analysis of variance, it was obtained that F calculated is equal to 4.171 and with an $\alpha = 0.05$ a table F of 4.17 was obtained, therefore, since F calculated is greater than the table F, the null hypothesis is rejected and it is concluded that the times of exposure affect in a significant way the elimination of symptoms of avocado leaf chlorotic mottle in 'Duke 7'.

With the analysis of variance data, the T (0.05) = 0.056 was calculated, and the difference of the means of the two treatments = 0.42; as a rule of decision we have the value $0.42 > 0.056$, therefore, the means of the two treatments are significantly different and also the exposure of plants with mottle symptoms at a temperature of three hours gave better results in terms of control of the mottled with an average of 72 % decrease in severity compared to the treatment of an hour and a half with an average of 30 % decrease in severity of leaf mottling.

Las plantas en cámara de ambiente controlado, disminuyeron la severidad en 70 % en hojas viejas y desarrollaron hojas nuevas sin presencia de moteado clorótico a partir de 8 a 10 semanas después de efectuada la termoterapia. Bajas temperaturas (-2 °C), no eliminaron el síntoma, pero atenuaron su severidad Conclusiones. Los síntomas de moteado en hojas de aguacate no son causados por *X. fastidiosa*. El factor que causa los síntomas de moteado de la hoja es transmitido por injerto. La termoterapia en seco es un método eficaz para eliminar los síntomas del moteado clorótico de hoja en plantas de aguacate.

Palabras clave: PCR, transmisión por injerto, patogenicidad, termoterapia.

The plants in a controlled environment chamber reduced severity by 70 % in old leaves and developed new leaves without presence of chlorotic mottle from 8-10 weeks after the thermotherapy. Low temperatures (-2 °C), did not eliminate the symptom, but attenuated its severity Conclusions The symptoms of mottle on avocado leaves are not caused by *X. fastidiosa*. The factor that causes the symptoms of mottling of the leaf is transmitted by grafting. Dry thermotherapy is an effective method to eliminate the symptoms of leaf chlorotic mottle in avocado plants.

Key words: PCR, graft transmission, pathogenicity, thermotherapy.

1 Tesista
2 Director

INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es parte de la familia Lauraceae, y está distribuida ampliamente en el mundo, especialmente en Asia y América (Galindo Tovar *et al.*, 2011). Se considera que el género incluye al menos 150 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Gutiérrez-Díez & Mayek-Pérez, 2014). Casi todos los miembros reconocidos del subgénero *Persea* ocurren primariamente en la misma región: desde la parte central de México, a través de Guatemala hasta gran parte de Centroamérica (Sánchez-Pérez, 1999). México es el centro de origen del aguacate, la evidencia más antigua del consumo de esta fruta data de 10,000 años a.C. y fue encontrada en una cueva en Coxcatlán, Puebla. El aguacate se originó en las partes altas del centro y este de México, así como en las partes altas de Guatemala. Esta misma región está incluida en lo que se conoce como Mesoamérica, región que también se considera el área donde se domesticó el aguacatero. A la fecha se conocen tres razas de aguacate: Mexicana, Antillana y Guatemalteca (Barrientos-Priego & López-López, 2000). Estas razas se clasificaron como variedades botánicas: *P. americana* var. *drymifolia* (Mexicana), *P. americana* var. *americana* (Antillana), *P. americana* var. *guatemalensis* (Guatemalteca) (Barrientos-Priego & López-López, 2000).

La importancia socioeconómica del aguacate se deriva del beneficio económico que genera entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores (Gutiérrez-Díez & Mayek-Pérez *et al.*, 2014). El cultivo y comercialización del aguacate genera 47,000 empleos directos y 70,000 empleos estacionales, equivalente a 10.5 millones de jornales anuales (Téliz & Mora, 2007).

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2018), la venta de aguacate mexicano al mundo de enero a noviembre del año 2017 superó los 2710 millones de dólares y representó casi 46 % del valor de las exportaciones globales. Dada su gran importancia socioeconómica se han estudiado las enfermedades principales que afectan a este cultivo, estas enfermedades pueden llegar a afectar la producción hasta un 14 % y reducir la calidad de la fruta en 10 % (Andrés-Agustín *et al.*, 2014), las principales enfermedades estudiadas son la tristeza del aguacatero, “sunblotch” y antracnosis, entre otras. Actualmente está tomando importancia la enfermedad del moteado clorótico de la hoja de aguacate, en un inicio se pensaba que eran deficiencias nutricionales (Hernández-Valdés *et al.*, 2012), sin embargo, en los años 90’s el Dr. Michael W. Borys y Alejandro. F. Barrientos-Priego (comunicación personal) en un vivero en Chiapas observaron que el moteado de hoja se transmitió a plantas sanas por medio de la injertación, por lo que se sospechó de un patógeno causante de dicha enfermedad, por lo tanto debe estudiarse su agente causal y su patogenicidad.

La propagación comercial de cultivares de aguacate generalmente es realizada a través de injertos de púa sobre portainjertos de pie franco, obtenidos de semillas (Campos-Rojas *et al.*, 2012). La injertación puede transmitir enfermedades si no se tiene los cuidados y técnicas correctas para eliminar los patógenos que pueda traer consigo. Existen técnicas como la termoterapia que han dado resultados positivos en eliminar patógenos. La termoterapia consiste en someter las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos que destruyan o disminuyan la velocidad de reproducción de los patógenos sin matar la planta.

Este método ha sido eficaz en erradicar a *Candidatus liberibacter* en cítricos (Fan *et al.*, 2016), y *Phytophthora cinnamomi* en semillas de aguacate (Zentmyer *et al.*, 1958; Durbin *et al.*, 1957), entre otros patógenos.

La comercialización nacional e internacional del aguacate está condicionada al cumplimiento de las normas oficiales fitosanitarias NOM-066-FITO-2002 (Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate) y NOM-069-FITO-1995, para el establecimiento de zonas libres de plagas (Téliz & Mora, 2007). De tal forma que se debe tomar en cuenta el cumplimiento de estas normas oficiales y el producto a comercializar debe provenir de plantas libres de cualquier enfermedad que represente un peligro para la producción de aguacate tanto a nivel nacional como internacional.

OBJETIVOS GENERALES

Obtener plantas de aguacate libres del moteado clorótico de hoja mediante termoterapia físicas.

Determinar mediante PCR, la presencia de *Xylella fastidiosa* en plantas de aguacate afectadas con el moteado de hoja.

Determinar si es transmisible el moteado de hoja mediante el injerto.

Aislar e identificar microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate.

Determinar patogenicidad de microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate.

Determinar la eficacia de la termoterapia para la erradicación del moteado clorótico en hoja de aguacate.

HIPÓTESIS GENERALES

Es posible obtener plantas de aguacate libres del moteado clorótico de hoja de aguacate mediante termoterapia físicas.

La bacteria *Xylella fastidiosa* no está presente en plantas de aguacate afectadas con el moteado de la hoja.

El moteado de hoja de aguacate es transmisible mediante el injerto.

Los microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate son patogénicos.

La termoterapia es eficaz en la erradicación de los síntomas del moteado de la hoja de aguacate.

LITERATURA CITADA

- Andrés-Agustín, J., Rebollar-Alviter, A., & Campos-Rojas, E. (2014). Evaluación de portainjertos clonales tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* Rands en huertos de aguacate de Ario de Rosales, Michoacán. In Gutiérrez-Díez, A. & Mayek-Pérez, N. (eds.). *Los recursos genéticos del aguacatero (Persea spp.) en México su estudio, conservación y aprovechamiento* (pp. 61-65). Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Barrientos-Priego, A. F. & López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. In D. Téliz, H. González, J. Rodríguez, & R. Dromundo (Eds.). *El aguacate y su manejo integrado* (pp. 19-31). Distrito Federal: Mundi-Prensa México, S.A. de C.V.
- Campos-Rojas, E, Ayala-Arreola, J., Agustín, J., & Espíndola-Barquera, M de la Cruz. (2012). *Propagación del aguacate*. SAGARPA, SNICS, SINAREFI, Universidad Autónoma Chapingo. 54 p.
- Durbin, D.R., Frolich, E.F., & Zentmyer, G.A. (1957). Eradication of *Phytophthora cinnamomi* in avocado seed by hot water treatment. *California Avocado Society Yearbook*, 41, 141-142.
- Fan G., Xia, Y, Lin, X., HU, H., Wang, X., Ruan, Ch., Lu, L., & Liu, B. (2016). Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1), 111-119.

- Galindo-Tovar, M., Milagro-Pérez, P., Alejandre-Rosas, J., Leyva-Ovalle, O., Landero-Torres, I., Lee-Espinosa, H., & Murguía-González, J. (2011). Relaciones genéticas del aguacate (*Persea americana* Mill.) en siete municipios del centro de Veracruz, caracterizadas con microsatélites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 339 –346.
- Gutiérrez-Díez, A. y Mayek-Pérez, N. (2014). *Los recursos genéticos del aguacatero (Persea spp.) en México su estudio, conservación y aprovechamiento* (108 p.) Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hernández-Valdés, E. F., Aguilar-Campoverde, S., Aguilar-Taylor, V. & Pérez-Sánchez, R. E. (2012). Concentración nutrimental en hojas de aguacate 'Hass' con síntoma de moteado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 3(3), 621-627.
- SAGARPA. (2018). México principal productor de aguacate. Boletín mensual de producción de aguacate. Recuperado de: www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/438986/Bolet_n_mensual_de_la_producci_n_de_aguacate_enero_2019.pdf
- Sánchez-Pérez, J. L. (1999). Recursos Genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 7-18.
- Téliz, D., & Mora, A. (2007). *El Aguacate y su Manejo Integrado* (2a. edición; 321 p.). Distrito Federal: Ediciones Mundi-Prensa.

Zentmyer, G. A., Thorn, W. A., Paulus, A. O., & Burns, R. M. (1958). Hot-water treatment of avocado seed. *California Avocado Society Yearbook*, 42, 108-110.

CAPÍTULO I

***Xylella fastidiosa* NO ES CAUSANTE DEL MOTEADO DE HOJA DE AGUACATE**

RESUMEN

México es el primer productor y exportador de aguacate en el mundo; en 2017 produjo más del 50 % de la fruta consumida a nivel mundial. Desde los 90's se ha observado moteado clorótico de hoja en plantaciones de aguacate y por varios años se consideró como una deficiencia nutricional. En 2008 en Costa Rica, se identificó a *Xylella fastidiosa* como el causante de síntomas similares a los observados en México. Dada su importancia económica, se planteó la presente investigación con los objetivos siguientes: determinar mediante PCR, la presencia de *X. fastidiosa* en plantas de aguacate con síntomas de moteado de hoja y determinar si el factor causante de la enfermedad se transmite por injerto. Al injertar vareta sana en planta enferma, 'Hass' presentó 90 % de hojas enfermas con alta severidad (80 a 90 %), con síntomas similares observados en campo, concluyendo que el factor causal es transmitido por medio del injerto. Para la detección de la bacteria se utilizaron los iniciadores RST31, RST33, XF1-F, XF6-R, 272-1-int, 272-2-int y HL5, HL6. Todas las reacciones arrojaron resultados negativos en la detección de *X. fastidiosa*, concluyendo que los síntomas de moteado en hojas de aguacate no son causados por *X. fastidiosa*, descartando su presencia. Es necesario continuar con el estudio de esta enfermedad para determinar el agente causal y mantener vigilancia para determinar su avance y su impacto económico.

Palabras clave: *Persea americana* Mill.; PCR; transmisión por injerto; enfermedad.

XYLELLA FASTIDIOSA IS NOT CAUSING THE AVOCADO LEAF CHLOROTIC MOTTLE

ABSTRACT

Mexico is the first producer and exporter of avocado in the world; in 2017, it produced more than 50 % of the fruit consumed worldwide. Since the 90s leaf chlorotic mottle has been observed in avocado plantations and for several years it was considered as a nutritional deficiency. In 2008 in Costa Rica, *Xylella fastidiosa* was identified as the cause of symptoms similar to those observed in Mexico. Given its economic importance, it was proposed this investigation with the following objectives: to determine by PCR, the presence of *X. fastidiosa* in avocado plants with symptoms of leaf mottle and to determine if the factor causing the disease is transmitted by grafting. When grafting healthy budwood in diseased plant, 'Hass' showed 90 % of diseased leaves with high severity (80 to 90 %), with similar symptoms observed in the field, concluding that the causal factor is transmitted by grafting. For the detection of the bacterium the primers RST31, RST33, XF1-F, XF6-R, 272-1-int, 272-2-int and HL5, HL6 were used. All reactions produced negative results in the detection of *X. fastidiosa*, concluding that the symptoms of mottling of leaves on avocado are not caused by *X. fastidiosa*, discarding its presence. It is necessary to continue with the study of this disease to determine the causal agent and to maintain vigilance to determine its progress and its economic impact.

Keywords: *Persea americana* Mill.; PCR; transmission by graft; disease.

INTRODUCCIÓN

México es el primer productor y exportador de aguacate del mundo; en el año 2017 produjo 1,997,629 toneladas del fruto, más del 50 % de la fruta consumida a nivel mundial, en forma permanente aporta 400,000 empleos, y en las empacadoras 95 % de los trabajadores son mujeres (SIAP, 2018). De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2018), la venta de aguacate mexicano al mundo en el período de enero a noviembre del año 2017 superó los 2,710 millones de dólares y representó casi 46 % del valor de las exportaciones globales.

Dada su gran importancia económica para el país se han estudiado las enfermedades principales que afectan las plantaciones de aguacate como la tristeza del aguacatero, “sunblotch” y antracnosis, estas enfermedades han sido ampliamente estudiadas conociéndose su desarrollo y su manejo. Desde hace décadas se ha presentado en plantaciones de varios estados, un moteado clorótico en las hojas, el cual era relacionado comúnmente con deficiencias nutrimentales (Hernández-Váldés, Aguilar-Campoverde, Aguilar-Taylo & Pérez-Sánchez, 2012), sin embargo, en los años 90s el Dr. Michael W. Borys y Alejandro. F. Barrientos-Priego (comunicación personal) en un vivero en Chiapas observaron que el moteado de hoja se transmitió a plantas sanas por medio de la injertación, por lo que se sospechó de un patógeno causante de dicha enfermedad.

Síntomas similares fueron observados por Montero-Astúa *et al.* (2008) en plantaciones de aguacate asociadas con café y cítricos en Costa Rica, al estudiarlos encontraron a

Xylella fastidiosa afectando el xilema de las plantas, por lo que presentaron el primer reporte de esta bacteria en árboles de aguacate en Costa Rica.

Esta bacteria es una de las más estudiadas, presenta una amplitud de hospedantes con más de 340 especies (EPPO, 2004) y actualmente provoca grandes pérdidas en el cultivo de olivo en Europa (Loconsole *et al.*, 2014) siendo una gran amenaza para cultivos de gran importancia económica como el aguacate en México, es por tal razón que se planteó el presente estudio de investigación con los siguientes objetivos: Determinar mediante técnica molecular de PCR, la presencia de *Xylella fastidiosa* en plantas de aguacate afectadas con el moteado de la hoja, determinar si es transmisible el factor que produce el moteado de hoja mediante el injerto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en los invernaderos de la Academia de Fruticultura ubicados en el campo experimental Xaltepa del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México en los años 2015 y 2016.

Transmisión de la enfermedad a plantas sanas mediante injerto de varetas provenientes de plantas enfermas

Se colectó en agosto de 2015 y marzo 2016, vareta de 'Hass' con síntomas de moteado clorótico en hoja, las plantas seleccionadas están establecidas en la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., Coatepec Harinas, Estado de México. Se injertaron en 200 portainjertos de cuatro meses de emergidos y completamente sanos derivados de semilla de 'Don Cris', para determinar la transmisión de la enfermedad por medio del injerto; se utilizaron tijeras de podar y navajas, desinfectando con cloro al 8 % al realizar cada corte, el riego se realizó según necesidad de la planta utilizando riego por aspersión automatizado.

Transmisión de la enfermedad de plantas enfermas a varetas provenientes de plantas sanas

Se utilizó un diseño completamente al azar, con tres tratamientos que son los injertos de varetas 'Hass', 'Colín V-33' y 'Encinos' provenientes de plantas sanas.

Se consideró cada rama injertada como la unidad experimental, se establecieron 16 repeticiones por tratamiento dando un total de 48 unidades experimentales; los portainjertos utilizados fueron 'Duke 7' con síntomas de moteado clorótico de hoja, se realizaron tres injertos de enchapado lateral por cada planta para probar igualdad de condiciones para cada uno de los injertos y determinar la susceptibilidad hacia la enfermedad de las variedades injertadas. Se aplicaron medidas de desinfección de herramientas con cloro al 8 % después de realizar cada corte con las herramientas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extracción de ácidos nucleicos

Se utilizó el método de extracción Dellaporta, Wood & Hicks (1983) y CTAB (Doyle & Doyle, 1990), con algunas modificaciones. Se eligieron plantas de 'Hass', 'Duke 7' y 'Filtro 8' por presentar síntomas más acentuados, de ellos se tomó muestras de la vena central de las hojas afectadas por el moteado y pecíolo, así como ramas de plantas pequeñas de cuatro meses de edad, se lavó las muestras con alcohol al 70 % y se escurrió en papel secante, se pesó en balanza analítica de 0.3 g, se colocó el tejido en un mortero estéril y congelado a ultra baja temperatura(-60 °C). Se adicionó nitrógeno líquido y se trituró la muestra hasta obtener una consistencia de polvo, este se depositó en un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 mL, en el cual, previamente se había colocado 600 µl, del amortiguador de extracción (Polivinilpirrolidona al 2.5 %, 20 µl de 2-mercaptoenanol en 10 µl de amortiguador), precalentado a 65 °C.

El tubo con la muestra pulverizada y el amortiguador de extracción se colocó a 65 °C y se dejó 20 min, se retiró del “termoblock” y se dejó enfriar, para luego centrifugarse a 21,000 xg, durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregó 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se agitó por 2 min. Se centrifugó a 12,000 xg durante 5 min, se separó la fase acuosa (superior) y se colocó en otro microtubo y se agregó 500 µl de isopropanol frío (-20 °C) y se agitó por inversión suave hasta obtener el precipitado que corresponde a los ácidos nucleicos. Se colocó a -20 °C durante 30 min, se centrifugó a 12,000 xg por 5 min y se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el precipitado y se dejó escurrir sobre una toalla sanitaria, luego se agregó 700 µl de amortiguador cloruro de sodio-tris (hidroximetil) aminometano- ácido etilendiamino tetraacético (STE), se dejó toda la noche a 4 °C para que se disolvieran los ácidos nucleicos.

El proceso continuó agregando 4 µl de RNasa, para eliminar ARN y se mezcló suavemente colocándose a 37 °C por 30 min, al cumplirse el tiempo se adicionó 70 µl de acetato de sodio 3 M y 700 µl de isopropanol frío (-20 °C), se agitó por inversión hasta obtener el precipitado de ADN, este se colocó a -20 °C durante 30 min, se continuó centrifugando a 8,000 xg durante 10 min, se decantó cuidando de no perder el ADN, se adicionó 500 µl de etanol al 70 % (grado reactivo), se agitó para disolver sales, se centrifugó nuevamente a 8,000 xg durante 10 min, se decantó y escurrió sobre una toalla sanitaria, se dejó secar el microtubo en “termoblock” a 40 °C por 10 min. La pastilla seca se disolvió en 50-100 µl de amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano-ácido etilendiamino tetraacético (TE) y se guardó a en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

Verificación de la integridad de los ácidos nucleicos extraídos

Se preparó un gel de agarosa al 2 % en amortiguador tris (hidroximetil) aminometano-acetato-ácido etilendiamino tetraacético 1X y se dejó solidificar por 20 min. Al lograr la consistencia deseada se procedió a cargar el ADN, lo cual se realizó con la mezcla de 4 μ l de amortiguador de carga ("loading buffer" 1X) con 10 μ l de las extracciones obtenidas y se colocó en el gel sumergido en amortiguador tris (hidroximetil) aminometano-acetato-ácido etilendiamino tetraacético 0.25X. Se corrió la electroforesis a 100 volt por 40 min. Transcurrido el tiempo se retiró de la cámara de electroforesis el gel y se procedió a teñir en bromuro de etidio por 15 min. El paso final fue observar la integridad de los ácidos nucleicos en transluminador de luz ultravioleta.

Cuantificación de ADN utilizando espectrofotometría

Se utilizó un Nanodrop (Thermo Scientific), se colocó 3 μ l de ADN sobre la platina del Nanodrop y se bajó el pedestal luego se procedió a determinar la calidad y cantidad de ADN en el espectrofotómetro, para verificar que la calidad de la muestra se encontrara entre 1.8 y 2.0 Nm.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen endógeno 16S

Se realizó con la finalidad de verificar que el ADN esté libre de inhibidores (Trejo-Saavedra, Rodríguez-Negrete & Rivera-Bustamante, 2015), y así tener un resultado más fiable al realizar la detección de *Xylella fastidiosa* por medio de PCR, para lo cual se calcularon las respectivas concentraciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones de reactivos para la PCR de gen endógeno 16S.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por tubo
Amortiguador	10X	1X	0.5 MI
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.5 µL
dNTP's	10 mM	200 µM	1.0 µL
16s1	10 pmoles/µL	20 pmoles	2.0 µL
16s2	10 pmoles/µL	21 pmoles	2.0 µL
Taq polimerasa	5 U/µL	1.5 U/µL	0.3 µL
ADN		50 - 100 ng	2.0 µL
Agua grado PCR			36.2 µL
Volumen Final			50.0 µL

Se utilizaron iniciadores específicos para cloroplasto (gen endógeno) los cuales amplifican una región del gen ribosomal 16S generando un producto de 315 pares de bases (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores para la amplificación del gen endógeno 16S (Trejo-Saavedra *et al.*, 2015).

Iniciadores	Secuencia (5´-3´)	Fragmento pares de bases (pb)
16s1	TGAGAATGGATAAGAGGCTC	315
16s2	TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG	

Se procedió a preparar la mezcla maestra de PCR, sobre hielo y en campana de flujo laminar. Se tomó alícuota de 48 µL de la mezcla de reactivos en tubos de PCR estériles, previamente etiquetados, se adicionó 2 µL del ADN de la muestra y los controles de la reacción de PCR (control positivo y negativo), se introdujo la muestra en el termociclador automático (Eppendorf Mastercycler Mod. 5331) y el programa de acuerdo con el Cuadro 3.

Cuadro 3. Programa de temperaturas para PCR del endógeno 16S.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	1.5 min	1
94 °C	40 seg	
55 °C	40 seg	35
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	1

Luego de sacar los tubos del termociclador (reacción de PCR), se tomaron 7 µL del producto de PCR y se mezclaron con 3 µL de buffer de carga sobre papel parafilm, estos se depositaron en los pozos del gel de agarosa al 2 % sumergido en amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano-acetato-Ácido etilendiamino tetraacético 1X.

Se corrió la electroforesis por 40 min a 100 volt y se procedió a observar sobre un transluminador de luz UV un fragmento de 315 pares de bases y se tomó la fotografía correspondiente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Xylella fastidiosa*.

Para el procedimiento se utilizaron los reactivos en las concentraciones indicadas en el Cuadro 4. Las mismas concentraciones de reactivos fueron empleadas para los iniciadores XF1-F, XF6-R y HL5, HL6. Para obtener la concentración final a 4X, 8X, etc., se multiplicó el número de muestras a evaluar por la concentración final 1X.

Cuadro 4. Concentraciones de reactivos para la PCR con iniciadores RST

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por tubo
Buffer	10X	1X	2.5 µL
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75 µL
dNTP's	500 µM	200 µM	10 µL
RST31	10 mM	0.2 µM	0.5 µL
RST33	10 mM	0.2 Mm	0.5 µL
Taq polimerasa	5 U/µL	1 U/µL	0.3 µL
DNA			2.0 µL
Agua grado PCR			8.55 µL
Volumen Final			25.0 µL

Para realizar la detección de *X. fastidiosa*, se utilizaron los iniciadores RST, estos han sido empleados por varios autores para detectar la enfermedad de Pierce en vid (Minsavage, Thompson, Hopkins, Leite & Stall, 1994) (Cuadro 5), los iniciadores XF para especies no relacionadas con el cultivo de vid (Firrao & Bazzi, 1994), y los iniciadores HL diseñados por Francis, Lin, Cabrera-La Rosa, Doddapaneni & Civerolo (2006), para una mayor sensibilidad en la detección de enfermedades: Pierce's Disease (vid), Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), Quemado de hojas en Almendro (*Prunus amygdalus*) y adelfa (*Nerium oleander*).

Cuadro 5. Secuencia de iniciadores para la detección de *Xylella fastidiosa*.

Iniciadores	Secuencia (5´-3´)	Fragmento (pb)
RST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCTGA	733
RST33	CACCATTTCGTATCCCGGTC	
XF1-F	CAGCACATTTCGTAGTAATAC	404
XF6-R	ACTAGGTATTAACCAATTGC	
272-1-int	CTGCACTTACCCAATGCATCG	500
272-2-int	GCCGCTTCGGAGAGCATTCT3	
HL5	AAGGCAATAAACGCGCACTA	221
HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA	

Después de calcular las concentraciones de los reactivos para la PCR se preparó la mezcla maestra, sobre hielo y en la campana de flujo laminar. Se tomó alícuota de 23 µL de la mezcla de reactivos en tubos de PCR estériles, previamente etiquetados.

Se colocó 2 µL del ADN de la muestra y los controles de la reacción de PCR (control positivo y negativo), se introdujo la muestra en un termociclador automático (Eppendorf Mastercycler Mod. 5331) y se programó con las temperaturas reportadas por Loconsole *et al.* (2014) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Programa de temperaturas para PCR con iniciadores RST31, RST33, HL5, HL6 para la detección de *Xylella fastidiosa*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1
94 °C	30 seg	
55 °C	30 seg	35
72 °C	40 seg	
72 °C	7 min	1

Se realizó PCR utilizando los programas para el termociclador reportados por Firrao & Bazzi (1994) para los iniciadores XF1-F, XF6-R (Cuadro 7) y 272-1-int y 272-2-int, reportados por Pooler, Myung, Bentz, Sherald & Hartung (1997) (Cuadro 8).

Cuadro 7. Programa de temperaturas para PCR con iniciadores XF1-F, XF6-R (Firrao & Bazzi, 1994).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	1 min	1
94 °C	45 seg	
50 °C	30 seg	30
72 °C	30 seg	
72 °C	10 min	1
25 °C	1 min	1

Cuadro 8. Programa de temperaturas para PCR con iniciadores 272-1-int y 272-2-int (Pooler *et al.*, 1997)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	4 min	1
94 °C	1 min	
60 °C	1 min	35
72 °C	1.5 min	
72 °C	5 min	1

Al terminar la reacción de PCR, se tomaron 7 µL del producto de esta y se mezclaron con 3 µL de amortiguador de carga sobre papel parafilm, estos se depositaron en los pozos del gel de agarosa al 2 % en amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano-acetato-Ácido etilendiamino tetraacético 1X. Se corrió la electroforesis por 40 min a 100 volt y se procedió a observar el producto de la electroforesis sobre un transluminador de luz UV.

Se usó un control positivo de *Xylella fastidiosa* en vid proveniente del Comité de Sanidad vegetal de Querétaro (CESAVEQ), con el que se realizó PCR con los iniciadores utilizados en esta investigación.

RESULTADOS I

Transmisión de síntomas de moteado clorótico a plantas sanas mediante injerto

Tres meses después de realizado el injerto de las varetas provenientes de árboles con síntomas de moteado clorótico de hoja sobre plantas sanas se observó el 100 % de mortalidad de las varetas y la afectación del portainjerto con una muerte descendente afectando al 100 % de estos (Figura 1). La afectación de los patrones no es algo común al realizar injertos en plantas de aguacate por lo que se considera que el o los posibles patógenos presentes en las varetas se transmitieron hacia el portainjerto ocasionando su pérdida total.



Figura 1. Muerte de vareta 'Hass' proveniente de árboles con síntomas de moteado de hoja y muerte descendente del portainjerto de aguacate 'Don Cris' de cuatro meses de edad.

Transmisión de moteado clorótico del portainjerto a varetas sanas de aguacate

Se presentó un 13 % de sobrevivencia de los injertos, de estos el 67 % fueron 'Colín V-33', 'Hass' un 33 % y los 'Encinos' no sobrevivieron. En la Figura 2 se aprecia 'Colín V-33' que muestra un 5 a 10 % de hojas con síntomas de moteado en un nivel muy bajo (1 a 2 %) de severidad en comparación con los síntomas de 'Hass' (Figura 3).



Figura 2. Injertos 'Colín V-33' con síntoma del moteado transmitido por una planta enferma.



Figura 3. Injerto 'Hass' con síntoma característico del moteado transmitido por una planta enferma.

'Hass' presentó 90 % de hojas con síntomas de moteado, a un nivel muy alto, 80 a 90 % de severidad (Figura 3), similares a los observados en campo y de donde se han colectado varetas con síntomas para otros experimentos, probando de esta manera que el factor que causa el moteado de la hoja es transmitido a las varetas sanas y de esta forma se presenta el síntoma en los nuevos brotes de la vareta injertada.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen endógeno 16S con 315 pares de bases (Trejo-Saavedra *et al.*, 2015), demostró que no existen inhibidores en el ADN obtenido de plantas de aguacate con síntomas de moteado en las hojas ni contaminantes en la reacción (Figura 4) y por lo tanto se puede realizar PCR para detectar el posible patógeno causante de la enfermedad.

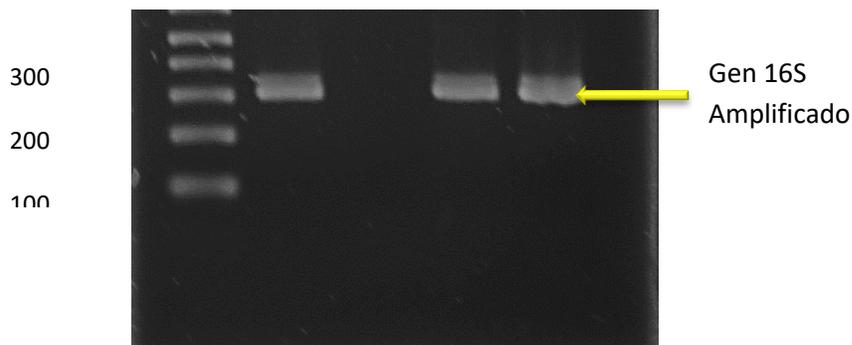


Figura 4. Amplificación de gen 16S en aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Xylella fastidiosa*

Todas las reacciones dieron resultados negativos (Figura 5, 6 y 7) en la detección de *Xylella fastidiosa* en las plantas de aguacate analizadas con síntomas de moteado clorótico en las hojas.

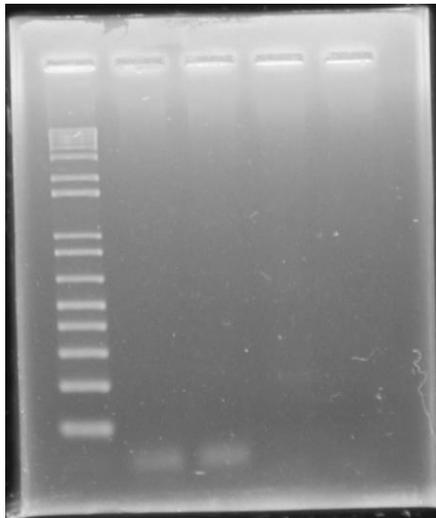


Figura 5. PCR con iniciadores XF1-F, XF6-R para la detección de *Xylella fastidiosa* en muestras de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja.

El Cuadro 9 muestra los resultados de las reacciones de PCR realizadas utilizando los iniciadores XF1-F, XF6-R; RST31, RST33; 272-1-int, 272-2-int y HL5, HL6.

Cuadro 9. Resultados obtenidos de la PCR con diferentes iniciadores que detectan *Xylella fastidiosa*

Iniciador	Identificación positiva	Identificación negativa	Enfermedades	Referencias
XF1-F		X	No relacionadas con	Firrao & Bazzi (1994)
XF6-R			Pierce's Disease	
RST31		X	Pierce's Disease	Minsavage <i>et al.</i> (1994)
RST33				
272-1-int		X	Todas las especies de	Pooler <i>et al.</i> (1997)
272-2-int			<i>X. fastidiosa</i>	
HL5		X	Pierce's Disease,	Francis <i>et al.</i> (2006).
HL6			Clorosis variegada de los Cítricos, quemado de hojas en almendro y adelfa	

El control positivo de *Xylella fastidiosa* que se usó es una clona que solamente amplifica con los iniciadores HL5, HL6 (Figura 7) presentando una banda de 221 pares de bases, las demás muestras no amplificaron con los iniciadores ni mostraron bandas definidas (Figura 6), como en el control positivo. Esto indicó que los protocolos y procedimientos realizados en las reacciones de PCR fueron aplicados de manera correcta, dando pauta para confirmar que no es *Xylella fastidiosa* la que causa el moteado clorótico en las hojas de las plantas de aguacate de este estudio.

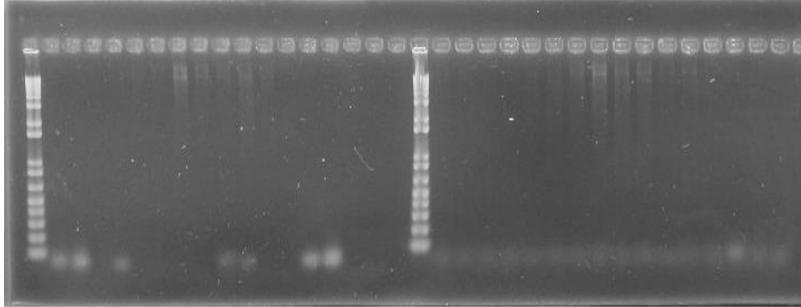


Figura 6. PCR con iniciadores RST31, RST33 y 272-1int, 272-2int para la detección de *X. fastidiosa* en muestras de aguacate con síntomas de moteado de hoja.

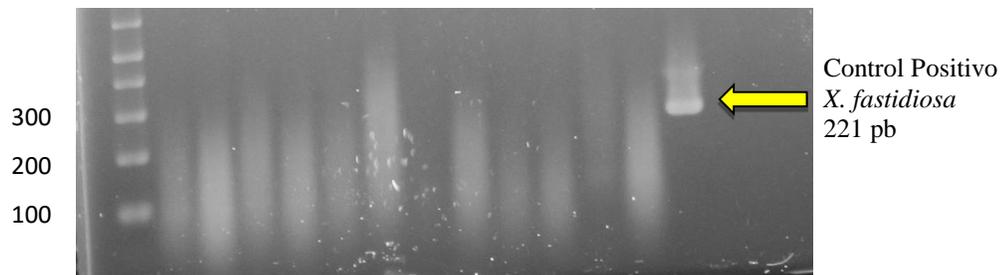


Figura 7. PCR con iniciadores HL5, HL6 para la detección de *X. fastidiosa* en aguacate con síntomas de moteado de hoja y control positivo de *X. fastidiosa* en vid.

DISCUSIÓN

Conforme a los resultados obtenidos se pudo comprobar que el patógeno que causa el moteado clorótico de la hoja de aguacate se transmite por medio de injerto, tal como ha sido reportado en cítricos para el caso de CVC causado por *Xylella fastidiosa* (He *et al.*, 2005), y que para el caso de injertación de vareta infectada con el patógeno sobre portainjertos muy jóvenes (4 meses de edad) resultó incluso con la muerte de estos. De acuerdo a Sanderlin (2005) las plantas de semilla son más susceptibles (88 %) al ser inoculadas con *Xylella fastidiosa* que las variedades (44 %).

De las pruebas de transmisión de planta con síntomas a injerto sano, se estudió la posible susceptibilidad de tres variedades con contraste en dimensiones de elementos de vaso con la idea de que al tener elementos de vaso más estrechos como es el caso de 'Colín V-33' (Reyes-Santamaría, Terrazas, Barrientos-Priego & Trejo, 2002), podríamos pensar en que la posible bacteria no podría moverse libremente. 'Colín V-33' resultó menos afectado con el moteado clorótico de aguacate conforme a lo obtenido, mientras que 'Hass' fue muy afectado, esto tal vez sea explicado por el hecho de que tenga los elementos de vaso muy anchos comparado con otros genotipos (Reyes-Santamaría *et al.*, 2002).

Los autores Firrao y Bazzi (1994), Minsavage *et al.* (1994), Lin & Walker (1997), Pooler *et al.* (1997), Hopkins & Purcell (2002), Francis *et al.* (2006), Janse & Obradovic (2010), entre otros, han basado sus estudios en el desarrollo de protocolos y métodos moleculares para la detección de la bacteria *Xylella fastidiosa* en diferentes cultivos (vid, cítricos, almendro, adelfo, etc.), mismos que han sido aplicados a cultivos como el olivo en Europa (Loconsole *et al.*, 2014), cultivo de papa con síntomas de punta morada en México (Gutiérrez-Ibañez *et al.*, 2009), existiendo asociación de *Xylella fastidiosa* con esta enfermedad y en todos estos estudios han obtenido resultados positivos en la detección de esta bacteria, dichos protocolos se aplicaron en la presente investigación, donde los resultados obtenidos son fiables y permiten descartar la presencia de *Xylella fastidiosa* en las muestras con síntomas de moteado clorótico de hoja del aguacate. Por lo tanto, queda pendiente aislar el posible patógeno que causa el moteado de hoja del aguacate y verificar mediante infección artificial si se replican los síntomas.

Para corroborar los resultados obtenidos en esta investigación, se enviaron muestras de plantas de aguacate 'Duke 7' con presencia de moteado clorótico al Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Posgraduados, para detección de *Xylella fastidiosa* y del viroide de la mancha de sol del aguacate (Avocado Sunblotch Viroid, ASBVd) por medio de PCR. Los resultados obtenidos de las reacciones de PCR en LADIFIT fueron negativos en ambos casos comprobando así que no está presente *Xylella fastidiosa* en las plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja.

CONCLUSIONES

La enfermedad del moteado clorótico de la hoja de aguacate es transmisible por medio de injertos, donde 'Hass' es fuertemente afectada.

La bacteria *Xylella fastidiosa* no está presente en las muestras de plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja al resultar negativas en las pruebas moleculares, por lo que se concluye que no es causante de dicho síntoma.

LITERATURA CITADA

- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- EPPO. (2004). Diagnostic protocols for regulated pests. *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bulletin*, 34, 187-192.
- EPPO. (2014). PQR-EPPO data base on quarantine pests. <http://www.eppo.int>. Fecha de consulta: octubre de 2018.
- Firrao, G., & Bazzi, C. (1994). Specific identification of *Xylella fastidiosa* using the polymerase chain reaction. *Phytopathologia Mediterranea*, 33, 90-92.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H. & Civerolo, E. L. (2006). Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 203-213.
- Gutiérrez-Ibáñez, A. T., Laguna-Cerda, A., Rojas-Martínez, R. I., González-Garza, R., Salgado-Siclan, M. L., Aguilar-Ortigoza, C. & González-Esquivel, C. (2009). Asociación molecular de *Xylella fastidiosa* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con síntomas de punta morada, en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 275-279.

- He, C. X., Li, W. B., Ayres, A. J., Hartung, J. S., Miranda, V. S., & Teixeira, D. C. (2000). Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease*, 84(6), 622-626.
- Hernández-Valdés, E. F., Aguilar-Campoverde, S., Aguilar-Taylor, V. & Pérez-Sánchez, R. E. (2012). Concentración nutrimental en hojas de aguacate 'Hass' con síntoma de moteado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 3(3), 621-627.
- Hopkins, D. L. & Purcell, A. H. (2002). *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, 86, 1056-1066.
- Janse, J.D. & Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92, 35-48.
- Lin, H. & Walker, M. A. (1997). Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *HortScience*, 32, 1264-1266.
- Loconcole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasherri, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M. R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Sabino, V. & Saponari, M. (2014). Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 7-14.

- Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C. & Stall, R. E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84, 446-461.
- Montero-Astúa, M., Saborio, R. G., Chacón-Díaz, C., Garita, L., Villalobos, W., Moreira, L., Hartung, J. S. & Rivera, C. (2008). First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica. *Plant Disease*, 92, 175.
- Pooler, M.R., Myung, I.S., Bentz, J., Sherald, J. & Hartung, J.S. (1997). Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 25, 123–126
- Reyes-Santamaría, I., Terrazas, T., Barrientos-Priego, A.F., & Trejo, C. (2002). Xylem conductivity and vulnerability in cultivars and races of avocado. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 97-105.
- Sanderlin, R. S. (2005). Cultivar and seedling susceptibility to pecan bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* and graft transmission of the pathogen. *Plant Disease*, 89(5), 446-449.
- SIAP. (2018). Anuarios Estadísticos de la Producción Agrícola en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. En línea: <http://www.siap.gob.mx>. Fecha de consulta: octubre de 2018.

Trejo-Saavedra, D. L., Rodríguez-Negrete, E. A., & Rivera-Bustamante, R. F. (2015). Detección de transgenes en organismos genéticamente modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria*, 25(NE-3), 24-39.

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PATOGENICIDAD DE AGENTES ASOCIADOS AL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJA DE AGUACATE

RESUMEN

En el cultivo de aguacate actualmente está tomando importancia la enfermedad del moteado clorótico de la hoja de aguacate a la cual no se le conoce el agente causal; en este contexto se planteó el presente estudio de investigación con el objetivo siguiente: Aislar, identificar y comprobar la patogenicidad de los agentes asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate, se aislaron microorganismos a partir de hojas afectadas por moteado clorótico y savia, estos se identificaron morfológicamente y se inocularon para determinar su patogenicidad *in vivo*. Se aislaron en medio PDA y agar nutritivo cuatro bacterias de diferente coloración (blanca, rosa, amarilla y naranja). La bacteria *Clavibacter michiganensis*, formó colonias pequeñas de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo al naranja incluso, rosas o rojas. La prueba de patogenicidad *in vivo* en tabaco mostró que las bacterias blanca y amarilla fueron más patogénicas con síntomas a partir de 19 días después de la inoculación hasta causar la muerte 34 días después. La prueba de patogenicidad *in vivo* en plantas de aguacate resultó en mayor patogenicidad de bacteria de colonia color blanco con síntomas de moteado clorótico, necrosis con halo clorótico a partir de 55 días con máxima expresión de síntomas a 80 días después de la inoculación.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., *Clavibacter michiganensis*, aislamiento, patogenicidad.

**ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF AGENTS ASSOCIATED
WITH AVOCADO LEAF CHLOROTIC MOTTLE**

ABSTRACT

In the crop of avocado, the disease of avocado leaf chlorotic mottle, to which the causal agent is not known, is currently taking on importance; In this context, the present research study was proposed with the following objectives: Isolate, identify and check the pathogenicity of agents associated with avocado leaf chlorotic mottle, microorganisms were isolated from leaves affected by chlorotic mottle and sap, these were morphologically identified and inoculated to determine their pathogenicity *in vivo*. Four bacteria of different coloration (white, pink, yellow and orange) were isolated in PDA medium and nutritive agar. The bacterium *Clavibacter michiganensis*, formed small colonies of slow growth, mucoid, convex yellow to orange even pink or red. The *in vivo* pathogenicity test in tobacco showed that white and yellow bacteria were more pathogenic with symptoms from 19 days after inoculation to cause death 34 days later. The *in vivo* pathogenicity test in avocado plants resulted in greater pathogenicity of white colony bacteria with symptoms of chlorotic mottle, chlorotic halo necrosis from 55 days with maximum expression of symptoms at 80 days after inoculation.

Keywords: *Persea americana* Mill., *Clavibacter michiganensis*, isolation, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

La superficie plantada de aguacate, así como la producción y el consumo mundial de esta fruta registran tendencia al alza durante la década reciente. México es el más importante productor y exportador mundial, mientras que Estados Unidos es el principal importador y consumidor mundial. El cultivo del aguacate es el tercero en importancia por su contribución en el valor de la producción agrícola primaria en México. La Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación proyectó que, en el 2018, el 2024 y el 2030, la producción de aguacate ascienda a 2.05, 2.61 y 3.16 millones de toneladas, respectivamente (Carreón Cruz, 2018). El cultivo del aguacate impacta positivamente la economía de los productores y del país por la entrada de divisas que genera, además de que es esencial en nuestra dieta. Con una producción de 1,644,000 toneladas, México es líder en su cultivo y exportación a nivel mundial, le sigue República Dominicana con una producción de 387, 546 toneladas al año (SENASICA, 2018).

Las enfermedades están entre los factores que más limitan la productividad y la longevidad del árbol. La importancia de un organismo fitopatógeno varía dependiendo del país, región productora y el tipo de mercado (nacional o internacional) y puede estar dada por la distribución y severidad de daños que los patógenos ocasionan o por su importancia cuarentenaria para un país importador (Téliz y Mora, 2007). Los problemas fitosanitarios se han acrecentado debido, en parte, a la falta de un diagnóstico certero y oportuno que permita a los productores manejar apropiadamente el impacto de las enfermedades.

Diferentes patógenos pueden provocar enfermedades con sintomatología similar, o bien ésta puede deberse a la conjunción de un patógeno con algún factor biótico, como toxicidad de agroquímicos o deficiencia/exceso de ciertos minerales del suelo (Borboa Flores *et al.*, 2009).

De acuerdo con Sandoval (2004), el diagnóstico correcto del agente causal del problema es clave para el manejo integrado de enfermedades. Un diagnóstico preciso requiere del auxilio de técnicas bioquímicas, microbiológicas y moleculares (Barnes, 1994). El moteado clorótico de la hoja de aguacate se presenta en el Estado de México, Morelos y Michoacán, hasta el momento no se ha descrito un agente causal y por lo tanto debe estudiarse, así como su patogenicidad.

Agrios (2005), define la patogenicidad como la capacidad relativa que tiene un microorganismo fitopatógeno para producir una enfermedad. Cuando se piensa que un microorganismo puede ser la causa de una enfermedad cualesquiera y no existen estudios previos que los comprueben, por lo tanto hay que seguir la metodología de los postulados de Koch para verificar o no la hipótesis que el o los microorganismos son la causa para que se produzca la enfermedad (Robles *et al.*, 2014), dichos postulados se presentan a continuación sigue: 1) Hay una relación muy estrecha entre la enfermedad con el microorganismo fitopatógeno, es decir el fitopatógeno debe estar asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen. 2) Se debe aislar y obtener un cultivo axénico o cultivo puro del microorganismo en estudio y anotar sus características (morfológicas, bioquímicas entre otras).

3) El microorganismo en estudio y desarrollado en cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma especie de donde se aisló. Las plantas inoculadas deben reproducir los mismos síntomas de la enfermedad. 4) El microorganismo fitopatógeno debe ser reaislado otra vez en el cultivo puro y sus características deberán ser exactamente igual al paso dos (Hernández, 2010). En este contexto se planteó el siguiente objetivo: Aislar, identificar y comprobar la patogenicidad de los agentes asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de campo de la Academia de Fruticultura ubicado en el campo experimental Xaltepa del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México en los años 2017 y 2018.

Toma de muestras de plantas enfermas

Se tomaron muestras de plantas de aguacate afectadas con moteado clorótico de hoja durante el período agosto 2017 a marzo 2018, se tomaron hojas, pecíolos y haces vasculares de ramas pequeñas (0.5 a 0.7 cm de diámetro), se utilizaron plantas 'Hass', 'Fuerte', 'Filtro 8' y 'Lomas 1' provenientes del invernadero de la Academia de Fruticultura. A su vez se utilizó una cámara de presión o bomba Scholander el cual es un instrumento utilizado para medir el potencial hídrico aproximado de los tejidos de una planta (Figura 8). La bomba Schoolander fue utilizada para obtener muestras de savia de plantas afectadas con moteado clorótico de hoja, al ejercer presión osmótica la savia expulsada por los vasos fue recolectada por una pipeta y vaciada en tubos de 20 μ L estériles.



Figura 8. Toma de muestra de savia utilizando la Bomba Scholander.

Preparación de medio Papa Dextrosa Agar (PDA)

Se resuspendieron 39 g del medio de cultivo PDA (NEONI ®) en un litro de agua purificada, se dejó reposar 10 a 15 min, este se calentó agitando frecuentemente y se dejó hervir por 1 min para disolver completamente el medio. Se selló con algodón estéril y papel aluminio para proceder a su desinfección en autoclave a 121 °C durante 15 min y se dejó enfriar aproximadamente a 45 °C. El medio PDA se vertió en cajas petri estériles haciendo uso de cámara de flujo laminar (Prendo® CFL-100), se utilizó una lámpara de alcohol para flamear y evitar contaminación a la hora de verter el medio; estas se conservaron en refrigeración de 2 a 8 °C.

Preparación de medio Agar Nutritivo (extracto de carne, peptona y agar)

El medio de cultivo agar nutritivo (DIBICO ®) se preparó de la siguiente manera: se rehidrató 23 g del medio en un litro de agua destilada, se dejó reposar por 10 a 15 min, luego se calentó agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 min para disolverlo por completo. Se colocó tapón de algodón estéril y papel aluminio para proceder a su desinfección en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 min y se dejó enfriar aproximadamente a 45 °C. El medio agar nutritivo se vertió en cajas petri estériles haciendo uso de cámara de flujo laminar (Prendo® CFL-100), se utilizó una lámpara de alcohol para flamear y evitar contaminación al momento de verter el medio; estas se conservaron en refrigeración de 2 a 8 °C.

Desinfestación del material vegetal

Se utilizaron hojas y se lavaron con agua de grifo y luego con alcohol etílico al 70 %, posteriormente se realizaron cortes de la vena central; cortes transversales y longitudinales de pecíolos y de ramas pequeñas (0.5 a 0.7 cm). Estos se colocaron con pinzas desinfectadas, en hipoclorito de sodio al 3 % durante 5 min, trascurrido el tiempo se retiró las muestras con unas pinzas y se trasladaron a una caja petri con agua destilada estéril para enjuagar bien las muestras por 5 min. El paso final fue dejar secar en una servilleta de papel (sanita).

Aislamiento de microorganismos

Los aislamientos se realizaron en ambiente estéril dentro de cámara de flujo laminar (Prendo® CFL-100), se utilizó calor seco (lámpara de alcohol) para eliminar algunos microorganismos que hay en el medio ambiente y así evitar que se contaminara el material, se tomaron muestras de vena central y pecíolo con pinzas flameadas en la lámpara de alcohol y se colocaron en 10 cajas petri con medio de cultivo PDA y 10 con medio de cultivo agar nutritivo. Se utilizaron cortes longitudinales y transversales, y la eliminación de la epidermis para ver de cual forma era más eficiente el aislamiento de microorganismos (Figura 9). Estas se colocaron a temperatura ambiente (28 °C) y en zona con poca luminosidad para permitir el desarrollo de los microorganismos presentes en las muestras.

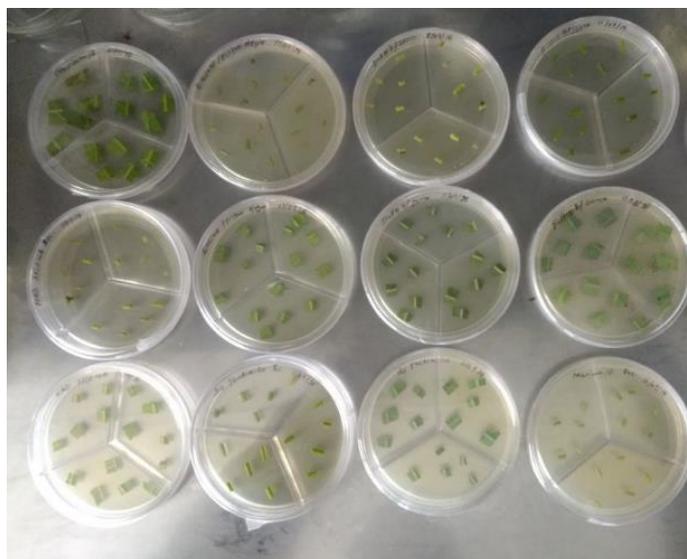


Figura 9. Muestras de vena central y parte de hoja de aguacate afectada con moteado clorótico en medio PDA.

En el caso de savia se colocaron gotas de 3 μ L con una micropipeta en cuatro puntos de cada caja petri para tener un total de cinco cajas con medio PDA y cinco con medio agar nutritivo. Se dejaron a temperatura ambiente (28 °C) y en zona con poca luminosidad para permitir el desarrollo de los microorganismos presentes en las muestras.

Prueba de patogenicidad *in vivo* en planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Se realizaron las pruebas de patogenicidad de acuerdo con los postulados de Koch y la técnica descrita por Agrios (2005). La primera se realizó *in vivo* con bacterias aisladas de plantas de aguacate con moteado clorótico de la hoja, esta se realizó en una planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) producida en invernadero, en estado V1 de la escala de Fehr *et al.* (1971) dejando una hoja sin inocular como testigo.

La inoculación se realizó inyectando en seis puntos en las hojas, vena central, y venas secundarias, un mililitro de una suspensión conteniendo 108 UFC/ml. Luego de la inoculación la planta se colocó a temperatura ambiente (28 °C) para observar el progreso de los síntomas. Los pasos de aislamiento y purificación se repitieron desde la planta donde se desarrollaron síntomas, para cumplir con los postulados de Koch.

Se aplicó diseño completamente al azar teniendo en cuenta daño o severidad contra el tiempo. Los tratamientos fueron inoculación de tres bacterias (blanca, amarilla y naranja), una en cada hoja, a su vez se utilizó un control negativo (agua destilada estéril). Cada tratamiento contó con seis repeticiones (pinchazos), siendo tres unidades experimentales (hoja inoculada) y un testigo negativo. Se realizaron observaciones semanales para determinar el tiempo de aparición de síntomas y su avance en las hojas inoculadas (Figura 10).



Figura 10. Inoculación de suspensión bacteriana (108 UFC/ml) en plantas de tabaco con jeringa estéril.

Prueba de patogenicidad *in vivo* en plantas de aguacate.

Se realizó prueba de patogenicidad *in vivo* de bacterias aisladas de plantas de aguacate con moteado clorótico de la hoja, esta se realizó en cuatro plantas de aguacate 'Don Cris' de 10 meses de edad, con una incisión a 20 cm de altura a partir de la base del tallo, y con aguja flameada en mechero de alcohol se tomó una rodaja de medio (2 cm de diámetro) con crecimiento bacteriano y se colocó en la herida realizada con anterioridad, esta se cubrió con algodón embebido en agua destilada estéril y se cubrió con papel parafilm para mantener la humedad el mayor tiempo posible. Se realizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (aislados de bacteria blanca, rosa, amarilla y naranja) con cuatro repeticiones y un testigo negativo al que solo se le puso el algodón con agua destilada estéril.

Las plantas se mantuvieron en invernadero con riegos cada dos días, se observaron semanalmente las hojas en busca de síntomas, amarillamiento, necrosis, etc. Al estar presentes se registró su avance en las plantas inoculadas.



Figura 11. Inoculación mediante rodaja de cultivo bacteriano en plantas de aguacate.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN II

Aislamiento de microorganismos

Los aislamientos y cultivos puros (Figura 12), fueron obtenidos de plantas sintomáticas con ellos se realizó la identificación fenotípica mediante un esquema tradicional el cual se basa en las características observables de las bacterias, como su morfología y desarrollo. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método de diagnóstico a elegir; este permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos (Robles *et al.*, 2014).

De acuerdo a las características de la colonia se determinó la presencia de la bacteria *Clavibacter* spp (Figura 12), estas son colonias pequeñas de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo al naranja incluso, rosas o rojas, concuerda con lo descrito por Rodríguez-Mejía (2012). De esta bacteria se han descrito cinco subespecies, dentro de las que se comprenden patógenos conocidos, como, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm; cancro bacteriano y marchitamiento del tomate), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms; podredumbre bacteriana en el anillo de la patata), *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* (Cmi; marchitamiento y atrofia en la alfalfa), *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Cmn; marchitamiento y tizón del maíz), y *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* (Cmt; pecas y manchas foliares en el trigo). Las tres primeras subespecies son de importancia cuarentenaria o patógenos regulados de cultivos agrícolas importantes en muchos países (Li *et al.*, 2018).



Figura 12. Colonias de bacterias aisladas de plantas de aguacate con síntomas de moteado de hoja.

Clavibacter spp es de tinción Gram positiva, no formadora de esporas, bacteria aeróbica sin flagelos. Produce colonias mucoides blancas a una temperatura de crecimiento óptima de 20 a 23 °C. No crece en medios CNS o Cloruro de tetrazolio (TTC). No licua gelatina ni produce levana. De acuerdo a Li *et al.* (2018), *C. michiganensis* se diferencia de las otras especies de *Clavibacter* en la producción de ácido tanto de sorbitol como de manitol. Utiliza acetato y succinato, pero no glicerol; hidroliza la aesculina; La actividad de la fosfatasa alcalina es débil, y falta la actividad de la α -manosidasa. Causa la enfermedad de la pudrición del anillo bacteriano de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Crecimiento bacteriano de *C. michiganensis* Subsp. *sepedonicus*, la cual después de 10 a 12 días toman un color amarillo pálido las colonias.

Prueba de patogenicidad *in vivo* en planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Las hojas de tabaco donde se inoculó el patógeno presentaron manchas de color café con halo clorótico, en los puntos inoculados con el patógeno.

La clorosis se extendió y se volvieron necróticas, los márgenes de las hojas mostraron necrosis hasta presentarse muerte total de hojas y de la planta misma (Figura 13).

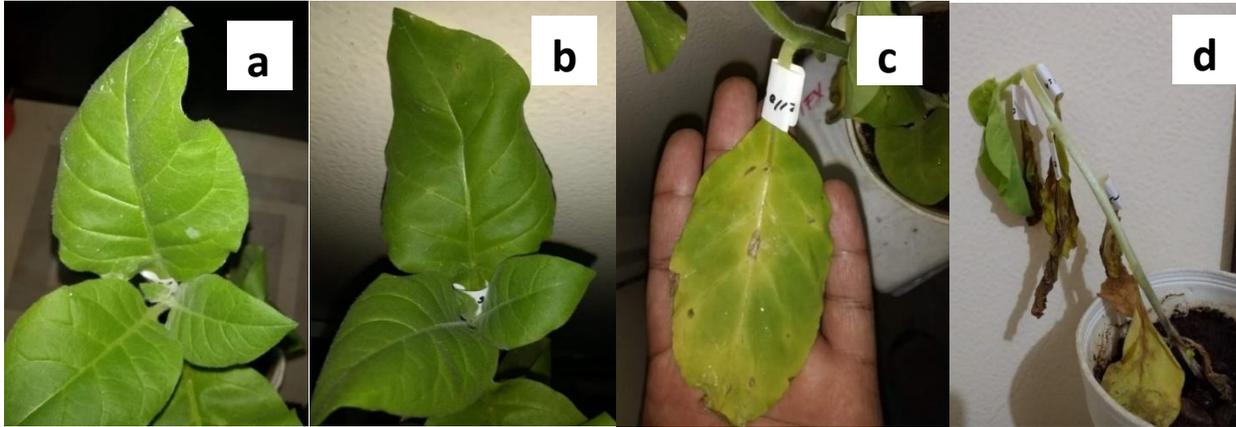


Figura 13. Síntomas observados días después de inoculación (ddi) con bacterias aisladas de plantas de aguacate con moteado clorótico de hoja a. 6 ddi. b. 19 ddi. c. 27 ddi. d. 34 ddi.

Los aislados presentaron una patogenicidad diferente en el hospedante inoculado, causaron síntomas visibles a los 19 días y la muerte de las plantas a los 34 a 40 días después de la inoculación. Se encontró diferencia entre la expresión de los síntomas siendo más fuertes en los aislados de bacteria blanca y amarilla en contraste con el aislado de bacteria naranja. Los resultados muestran que todos los aislamientos fueron capaces de causar síntomas, pero los aislados blanco y amarillo fueron más patogénicos en la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), por lo que fue evidente que hay variación de patogenicidad entre los aislamientos encontrados en plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico en las hojas.

Prueba de patogenicidad *in vivo* en plantas de aguacate.

La prueba de patogenicidad realizada en plantas de aguacate mostró que los aislados de bacterias presentaron moteado clorótico, necrosis con halo clorótico y necrosis en márgenes de las hojas (Figura 14). Estos síntomas también fueron inducidos en planta de tabaco, aunque en plantas de aguacate fue en un tiempo relativamente mayor que en el tabaco.

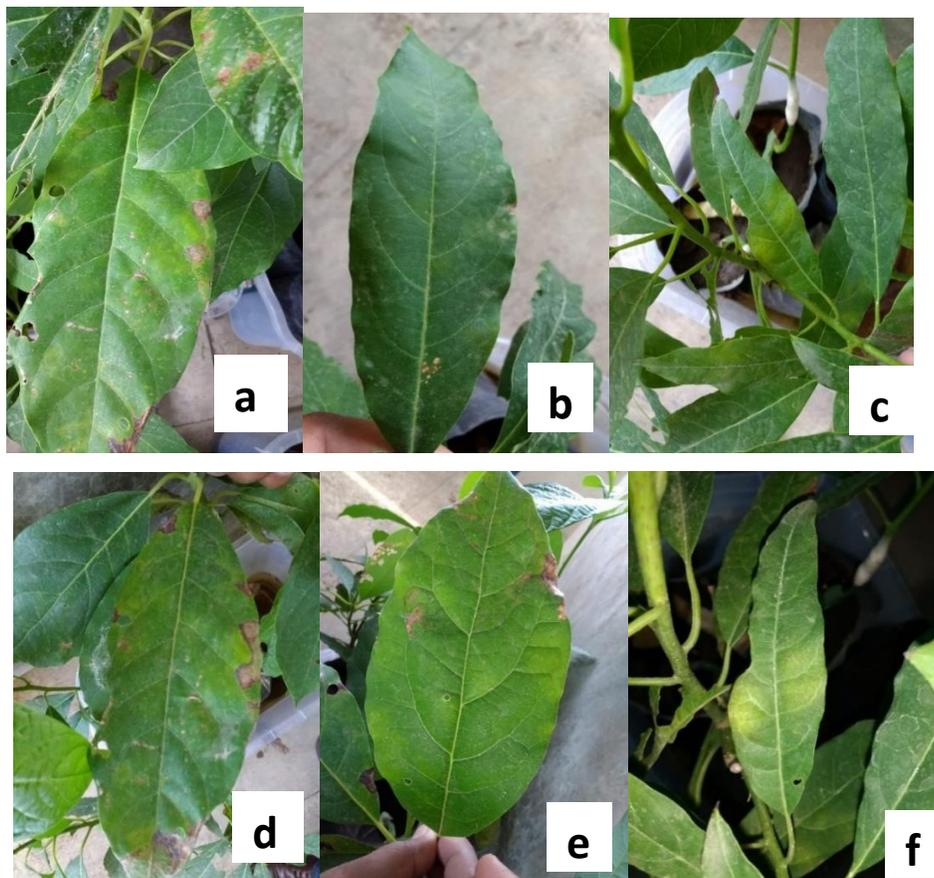


Figura 14. Síntomas observados días después de inoculación (ddi) con bacterias aisladas de plantas de aguacate con moteado clorótico de hoja a y b. 55 ddi. b. c y d. 76 ddi. e y f. 80 ddi.

Los aislados presentaron una patogenicidad diferente en el hospedante inoculado. El aislado que causó síntomas visibles a 55 días después de la inoculación (ddi) fue la bacteria blanca (Figura 14a, b), obtenida de plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico en las hojas. En tabaco los síntomas se presentaron a los 19 ddi. Rodríguez-Mejía (2012) comenta que la demostración de la patogenicidad de una cepa bacteriana es un procedimiento complicado que requiere mucho tiempo para que aparezcan los síntomas típicos de la enfermedad en la planta homóloga.

El tabaco ha sido utilizado para detección de bacterias como *Ralstonia fascians* y en bacterias que prefieren los haces del xilema como *Clavibacter michiganensis* (Rodríguez-Mejía, 2012).

Los síntomas con el paso del tiempo fueron presentando una mayor expresión, desde los 76 ddi (Figura 14c, d) hasta 80 ddi con síntomas de áreas cloróticas de la hoja del aguacate, aunque no del todo parecido al moteado que es el tema en estudio (Figura 14e, f). Fue evidente que hay variación de patogenicidad entre los aislamientos encontrados en plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico en las hojas, encontrando que el aislado de bacteria blanca fue la que presentó mayor patogenicidad en plantas de aguacate 'Don Cris'.

CONCLUSIONES

Se presentó *Clavibacter* spp en plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hojas.

Todas las bacterias aisladas de síntomas de moteado clorótico de plantas de aguacate dieron positivo a la prueba en planta de tabaco.

La bacteria blanca fue la que presentó mayor patogenicidad *in vivo* en plantas de aguacate. Aunque los síntomas en general fueron diferentes a los típicos del moteado de la hoja.

LITERATURA CITADA

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology* (fifth edition; 922 p.). New York: Academic Press.

Barnes, L.W. (1994). The role of plant clinics in disease diagnosis and education. A North American Perspective. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 601-609.

Borboa Flores, J., Rueda Puente, E. O., Acedo Félix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo Juárez, O., & García Ortega, A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 319-326.

Carreón Cruz, P. (2018). *Producción e intercambio comercial del aguacate mexicano* (I). El Economista. Recuperado de :
<https://www.economista.com.mx/opinion/Produccion-e-intercambio-comercial-del-aguacate-mexicano-I-20180207-0137.html>

Fehr, W.R., Cavines, C.E., Burmood, D.T. & J.S. Pennington. (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11, 929-931.

Hernández, O. (2010). Detención y caracterización del agente causal del tizón foliar en teca (*Tectona grandis* L. F.) en Huimanguillo, Tabasco (63 p.). Tesis de Ingeniero Forestal. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.

Hernández-Valdés, E. F., Aguilar-Campoverde, S., Aguilar-Taylor, V. & Pérez-Sánchez, R. E. (2012). Concentración nutrimental en hojas de aguacate 'Hass' con síntoma de moteado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 3(3), 621-627.

Li, X., Tambong, J., Yuan, K. X., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A., & De Boer, S. H. (2018). Reclassification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology*, 68(1), 234–240.

Robles Carrión, A., Gómez Criollo, R., Macas Rojas, F., Sánchez Rodríguez, A., & Torres-Gutiérrez, R. (2014). Estudio de la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp., asociados a la marchitez vascular del babaco en Loja- Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 3(1), 61-72.

Rodríguez-Mejía, M. D. L. (2012). *Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas* (146 p.). Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.

Sandoval, B. C. (2004). *Manual Técnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación*. (53 p.). Talca: FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe y Universidad de Talca.

SENASICA. (2017). *México primer productor mundial de aguacate*. Recuperado de :

<https://www.gob.mx/senasica/articulos/mexico-primer-productor-mundial-de-aguacate?idiom=es>

Téliz, D., & Mora, A. (2007). El aguacate y su manejo integrado (2da edición). Distrito Federal:

Editorial Mundi-Prensa

CAPÍTULO III

TERMOTERAPIA PARA EL MANEJO DEL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJA DE AGUACATE

RESUMEN

El moteado clorótico de la hoja de aguacate es de difícil solución debido a que su agente causal se encuentra en el xilema y no es posible aplicar un producto que pueda alcanzar esta zona, por tal razón se necesitan nuevas técnicas para tratar el problema. El objetivo del presente estudio fue: determinar la eficacia de la termoterapia para la erradicación del moteado clorótico de hoja de aguacate. Plantas de aguacate afectadas con el moteado clorótico de hoja fueron sometidas a termoterapia en un invernadero de cristal. También se determinó la eficacia de la termoterapia utilizando una cámara de ambiente controlado para la erradicación del moteado clorótico de hoja de aguacate. Temperatura baja (-2 °C) fue evaluada en varetas sintomáticas para el manejo de esta enfermedad. La termoterapia aplicada en el invernadero de cristal disminuyó en 98 % la incidencia de la enfermedad. Las plantas en cámara de ambiente controlado, disminuyeron los síntomas en 70 % en hojas viejas y desarrollaron hojas nuevas sin presencia de moteado clorótico a partir de 8 a 10 semanas después de efectuada la termoterapia. La temperatura baja (-2 °C), no eliminó el síntoma, pero atenuó la severidad de estos en las plantas tratadas. La termoterapia en seco es un método eficaz para eliminar el moteado clorótico de hoja de aguacate.

Palabras clave: tratamiento de temperatura, eliminación de síntomas.

THERMOTHERAPY FOR THE CONTROL OF THE AVOCADO LEAF CHLOROTIC MOTTLE

ABSTRACT

The avocado leaf chlorotic mottle is difficult to solve because its causative agent is in the xylem and it is not possible to apply a product that can reach this area, for this reason new techniques are needed to treat the problem. The objective of the present study was to determine the effectiveness of thermotherapy for the eradication of avocado leaf chlorotic mottle. Avocado plants affected with leaf chlorotic mottle were subjected to thermotherapy in a glasshouse. The effectiveness of the thermotherapy was also determined using a chamber of controlled environment for the eradication of the chlorotic mottle of avocado leaf. Low temperature (-2°C) was evaluated in symptomatic budwoods for the management of this disease. The thermotherapy applied in the glasshouse decreased the incidence of the disease by 98%. The plants in controlled environment chamber, reduced the symptoms in 70% in old leaves and developed new leaves without the presence of chlorotic mottle from 8 to 10 weeks after the thermotherapy. The low temperature (-2°C), did not eliminate the symptom, but attenuated the severity of these in the treated plants. Dry thermotherapy is an effective method to eliminate the chlorotic mottle of avocado leaf.

Keywords: Thermotherapy, elimination of symptoms.

INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.), es nativo del continente americano, específicamente de México y Centro América, se distribuye naturalmente hasta Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú. Los primeros pobladores de América del área central de México probablemente domesticaron el aguacate por su exquisito sabor (Téliz *et al.*, 2000).

Uno de los aspectos fundamentales en toda industria hortícola es la propagación. En el caso del aguacate, esta puede llevarse a cabo fácilmente por medio de semillas, pero por la alta variabilidad, los cultivares deben ser propagados vegetativamente. El método de propagación asexual o vegetativo por excelencia es el injerto, aunque también se emplea el estacado para la raza antillana (Díaz, 1979), el acodo para la propagación clonal de portainjertos y el cultivo de tejidos (Bautista Solís *et al.*, 2002). El injerto es la operación mediante la cual se une íntimamente o se inserta una parte de una planta en otra, de manera que queden soldadas y se desarrollen juntas formando una única planta (Hartmann, 2002). La injertación puede transmitir enfermedades si no se tiene los cuidados y técnicas correctas para eliminar los patógenos que pueda traer consigo. La termoterapia ha dado resultados positivos en eliminar patógenos al someter las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos que destruyan o disminuyan la velocidad de reproducción de los patógenos sin matar la planta.

Este método ha sido eficaz en erradicar a *Candidatus liberibacter* en cítricos (Fan *et al.*, 2016) y *Phytophthora cinnamomi* de semillas de aguacate (Zentmyer *et al.*, 1958; Durbin *et al.*, 1957), entre otros patógenos. Dada la eficacia de la termoterapia para eliminar patógenos se planteó el presente estudio de investigación con los siguientes objetivos: Determinar la eficacia de la termoterapia para la erradicación del moteado clorótico de hoja de aguacate, aplicar termoterapia en invernadero de cristal a plantas de aguacate afectadas con el moteado clorótico de hoja, determinar la eficacia de la termoterapia utilizando una cámara de ambiente controlado para la erradicación del moteado clorótico de hoja de aguacate, comprobar la eficacia de temperatura baja (-2 °C) aplicada a varetas para el manejo de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los invernaderos de cristal y convencional de la Academia de Fruticultura ubicados en el campo experimental Xaltepa del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México en los años 2016 y 2017. Estos se encuentran ubicados a una altitud de 2,252 metros, el clima es templado semiseco, de acuerdo con Köppen y Geiger el clima se clasifica como Cwb -Templado con invierno seco (verano suave). La temperatura promedio en Texcoco es 15.2 °C., con precipitaciones promedios de 686 mm.

Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (47 a 49 °C) en invernadero de cristal

Se colocaron plantas de aguacate del portainjerto 'Duke 7' con síntomas de moteado clorótico de la hoja en invernadero de cristal, de diciembre 2016 a agosto 2017. Se monitoreó la temperatura y humedad relativa con un Data Logger HOBO Modelo UX100-003 (Onset Co. MA., USA), ubicado a 50 cm del suelo el cual se programó para realizar lecturas cada 10 min. Las paredes y techo de cristal permitieron el paso de la luz durante todo el día, las ventanas laterales y cenitales se cerraron para mantener una temperatura elevada dentro del invernadero.

Se evaluó la incidencia de la enfermedad, se estimó la proporción entre el número de plantas enfermas y el número total de plantas, cuatro meses después de la exposición a altas temperaturas (47 a 49 °C) en invernadero de cristal. Se utilizó un diseño completamente al azar, con 48 plantas que corresponden a las unidades experimentales.

Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado

La termoterapia se realizó con una cámara de ambiente controlado (TC-32 Warren Sherer, Kysor Industrial Corp., Division Marshall, Michigan) del Departamento de Botánica del Colegio de Posgraduados (Figura 15a), a su vez se hizo uso de un Termohigrómetro Digital Marca AVALY(Taylor) Model. VA-EDT-1-55 para medición de temperatura y humedad relativa dentro de la cámara. Se utilizó un diseño aleatorio simple. Los tratamientos fueron tiempos de exposición de 1.5 hr (Tratamiento 1) y 3 hr (Tratamiento 2) a temperatura de 46 °C. Se consideró como unidad experimental una planta 'Mariano' con síntomas de moteado clorótico, se definieron 16 repeticiones por tratamiento, obteniendo un total de 32 unidades experimentales (Figura 15b). La termoterapia se realizó una vez por semana, en las siguientes fechas: 13, 20 y 27 de noviembre, 2018. Se evaluó la incidencia de la enfermedad, calculada como la proporción entre el número de plantas enfermas y el número total de plantas evaluadas, 8 a 10 semanas después de la exposición a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado.

Se cuantificó la severidad, medida como el número de hojas con síntomas, sobre el número total de hojas por planta (Campbell & Madden,1990). Los datos, se sometieron a análisis de varianza ANOVA y a la prueba de rango múltiple de Tukey.

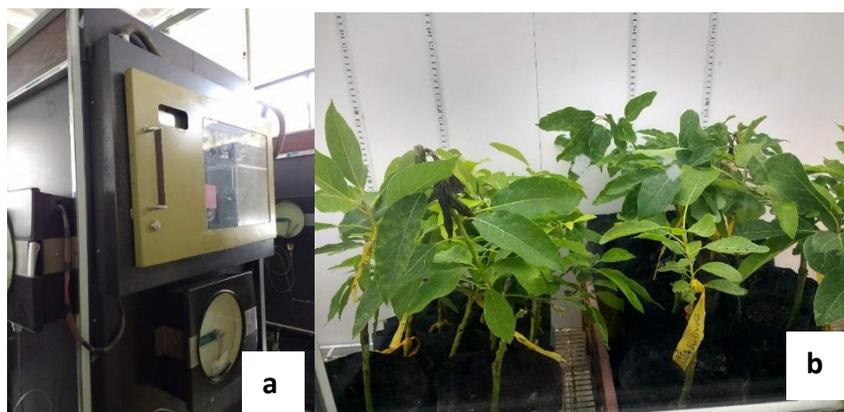


Figura 13. a. Cámara de ambiente controlado (TC-32 Warren Sherer, Kysor Industrial Corp., Division Marshall, Michigan, USA). b. Plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hoja dentro de la cámara.

Tratamiento a varetas con temperatura baja (-2 °C).

Se utilizaron varetas de 'Duke 7' provenientes de árboles con síntomas de moteado de la hoja ubicados en el Campo Experimental de Chapingo, Estado de México, el experimento se realizó en agosto del 2018. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos que consistieron en tiempos de exposición de 5, 10 y 15 minutos a -2 °C, tomando como unidad experimental una varetta injertada, se definieron 16 repeticiones por tratamiento.

Se utilizó injerto de hendidura sobre portainjertos 'Don Cris' con 0.7 cm de diámetro, cada vez que se utilizó la navaja se desinfectó con cloro al 8 %. Se evaluó la incidencia de síntomas de moteado, como presencia o ausencia de estos, después de la exposición a temperaturas bajas, dejando un período de dos meses después del injerto para permitir el desarrollo de los nuevos brotes y de esta manera evaluar el efecto del tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN III

Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (47 a 49 °C) en invernadero de cristal

Las mediciones de la temperatura máxima promedio mensual (Figura 16) dentro del invernadero de cristal durante el período de estudio arrojaron que en las horas de mayor radiación solar (12 a 3 pm) en los meses de enero a mayo, las temperaturas estuvieron por arriba de los 45 °C, alcanzando una máxima temperatura promedio en el mes de febrero a marzo con 49 °C. Esto ayudó a la eliminación de los síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate ya que diversos autores recomiendan temperaturas de 45 °C por un período de 3 hr (Grondeau *et al.*, 1992; Keck *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 2016,) para eliminar patógenos de plantas y de varetas.

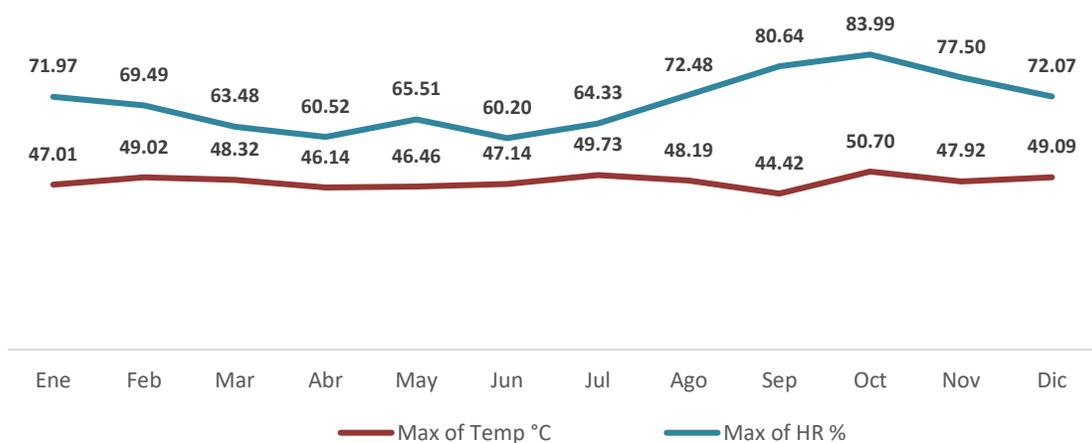


Figura 14. Temperatura máxima promedio y humedad relativa máxima promedio en el año 2017 en el invernadero de cristal, donde se expusieron a altas temperaturas plantas con síntomas de moteado clorótico.

Las temperaturas máximas observadas oscilaron de 49 °C en febrero, 48.3 °C en marzo, a máximos de 50 °C en julio y octubre, estos datos sirven de referencia de los meses en que se alcanzan mayores temperaturas en el invernadero de cristal con lo cual se puede utilizar la técnica de termoterapia. Debe evaluarse la temperatura y humedad relativa cada año para adecuar los tratamientos según las condiciones presentes.

Los síntomas característicos del moteado clorótico se observaron en todas las plantas injertadas antes de la aplicación del tratamiento de termoterapia (Figura 17).



Figura 15. Síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate antes del tratamiento de termoterapia.

El tratamiento de termoterapia aplicado en el invernadero de cristal resultó en 98 % de plantas sin síntomas de moteado clorótico de hoja (Figura 18), resultados similares se obtuvieron en el segundo grupo de plantas tratadas (Figura 19) después del período primavera-verano de 2017.



Figura 16. Plantas sin síntomas de moteado clorótico (98 %) después de la aplicación de termoterapia en invernadero de cristal.



Figura 17. Segundo grupo de plantas tratadas con termoterapia en invernadero de cristal, mostrando una disminución de 98 % de síntomas de moteado clorótico.

Según Mannini y Gribaudo (1999), cuando no se ha logrado seleccionar material vegetal sano, se puede proceder a su regeneración o saneamiento, esto se puede conseguir aplicando diferentes técnicas de termoterapia, cultivo de tejidos o combinaciones de ambas.

En la presente investigación, la termoterapia se realizó utilizando un invernadero de cristal con temperaturas de 48 a 50 °C y cámara bioclimática (46 °C) con lo que se eliminaron los síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate. La termoterapia es un método eficaz para eliminar diferentes patógenos, esta se ha utilizado ampliamente para eliminar virus en vid, así lo reportan Doazan *et al.* (1979), Galzy (1964), Goheen (1973) y en cultivos leñosos como manzano y pera, Campbell (1970).

Los patógenos asociados a enfermedades vasculares generalmente se establecen como endófitos en células y tejidos vasculares, por lo que se dificulta su control con algún producto químico (Hossain *et al.*, 2013), es necesario utilizar técnicas como la termoterapia para reducir la población del patógeno y por ende los síntomas presentes. Cook & Yarham, (2006), indicaron que el control de las enfermedades depende en gran parte de las prácticas, que reduzcan la incidencia o severidad y esto es lo que se logró con el uso de termoterapia en plantas de aguacate ‘Duke 7’ con síntomas de moteado clorótico de hoja.

Exposición de plantas con síntomas de moteado a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado

Al realizar el análisis de varianza, se encontró diferencias entre tratamientos por lo que los tiempos de exposición afectan de manera significativa a la eliminación de síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate ‘Duke 7’ (Cuadro 10).

Se encontró diferencias ($P = 0.42$) entre los tratamientos de termoterapia de una hora y media y tres horas. La exposición de las plantas con síntomas de moteado a una temperatura de tres horas produjo mejores resultados en cuanto al testigo con moteado, con un promedio de 72 % de disminución de síntomas a comparación del tratamiento de hora y media con promedio de 30 % de disminución de síntomas de moteado de hojas.

Cuadro 10. Análisis de varianza del efecto de tiempos de exposición de plantas de aguacate, con síntomas de moteado a altas temperaturas (46 °C) en cámara de ambiente controlado. Los datos se trabajaron en proporciones para su mejor análisis.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F ₀	Valor P	F tabla
Severidad (%)	1.412	1	1.412	233.167	1.09058E-15	4.171
Error	0.182	30	0.006			
Total	1.594	31				

El tratamiento de termoterapia en cámara de ambiente controlado a 46 °C durante tres horas, resultó ser más efectivo para la eliminación de los síntomas de moteado, presentando una disminución de 70 % en hojas viejas (Figura 20) y el desarrollo de nuevos brotes sin presencia de síntomas de moteado clorótico a partir de 8 a 10 semanas después de efectuada la termoterapia.

En cuanto a plantas tratadas durante hora y media la reducción de síntomas fue de 30 %, siendo menor en comparación con el tratamiento de tres horas, indicando que se necesita más tiempo de exposición a altas temperaturas (46 °C) para obtener resultados eficaces de eliminación del factor que causa el moteado y reducción de síntomas externos. A su vez, el 80 % de los brotes nuevos no presentaron síntomas de moteado clorótico.



Figura 18. Plantas con brotes nuevos sin síntomas de moteado clorótico de la hoja en aguacate 8 semanas después de última termoterapia en cámara de ambiente controlado.

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron similares a los reportados por Fan *et al.* (2016), donde concluyen que el uso de termoterapia (45 o 48 °C) en un ambiente controlado puede reducir los síntomas de la enfermedad y disminuir hasta 90 % la población del patógeno presente 8 semanas después de la termoterapia.

Uno de los pioneros en la utilización de termoterapia aplicada a árboles frutales de hueso (Nyland, 1962) obtuvo buenos resultados en el saneamiento de cerezo y ciruelo; actualmente existen más patógenos y mutaciones de estos, por lo que la aplicación de la termoterapia vuelve a tomar importancia contra los nuevos patovares o razas descritas. Goheen *et al.* (1965) reportaron el uso de termoterapia para eliminar virus de plantas de vid, así como en manzano (Welsh & Nylan, 1965).

La termoterapia con agua caliente es utilizada para eliminar patógenos de semillas en aguacate (Zentmyer *et al.*, 1958; Durbin *et al.*, 1957), donde la inmersión de semilla de aguacate en agua a 48.8 °C por 30 minutos resultó en la eliminación de *Phytophthora cinnamomi* siendo este un método eficaz y de bajo costo para eliminar este hongo de cualquier parte infectada.

Se ha utilizado ambiente húmedo con altas temperaturas (45 °C) e inmersión en agua caliente a 50 °C para eliminar la bacteria *Erwinia amylovora* de material propagativo de manzana y pera, siendo efectivo para la eliminación total de la bacteria sin ningún daño a las varetas (Keck *et al.*, 1993). La termoterapia es una eficiente técnica para eliminar bacterias, virus y otros patógenos que son difíciles de controlar ya que se encuentran en zonas de difícil acceso como son los elementos de vaso de xilema, que es donde probablemente se aloja el agente causante de los síntomas del moteado de la hoja de aguacate.

Tratamiento a varetas con temperatura baja (-2 °C)

Se presentó un 72 % de injertos vivos tratados con bajas temperaturas (-2 °C), mostrando una incidencia del 100 % de los síntomas del moteado clorótico de la hoja, lo cual indica que el tratamiento no tuvo efecto en la disminución de la incidencia de la enfermedad. Aunque no se eliminó la incidencia de la enfermedad, visualmente las plantas tratadas con temperatura baja presentaron una atenuación de los síntomas (Figura 21b) en comparación con el testigo sin tratamiento (Figura 21a).

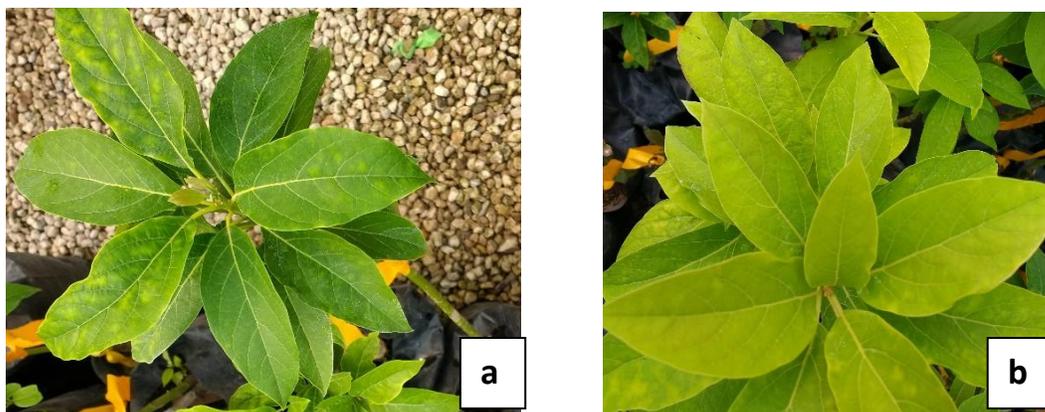


Figura 19. a. Plantas testigo de aguacate 'Duke 7' sin tratamiento, con presencia de síntomas moteado clorótico de hoja bien diferenciados. b. Planta sometida a temperatura baja con síntomas atenuados.

La atenuación de los síntomas puede responder a la disminución de las poblaciones del o de los patógenos presentes en la planta como una respuesta al estrés de las bajas temperaturas. Gounot, (1991) indicó que los microorganismos responden al estrés por frío de varias maneras. Por lo general, los microorganismos expuestos a un cambio de temperatura cercano o inferior a la temperatura de crecimiento mínima alteran la síntesis de proteínas, las membranas celulares y una variedad de otras estructuras celulares en un intento de adaptarse a las nuevas condiciones ambientales.

VanBogelen & Neidhardt, (1990), indicaron que casi todas las células responden a un aumento de la temperatura al inducir un conjunto de proteínas, llamadas proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés). Debido a que una gran cantidad de otras condiciones de estrés inducen a las HSP (o al menos las más abundantes), esta respuesta a menudo se denomina respuesta de estrés universal. Tanto para frío como para calor las células activan los genes llamados “Heat Shock Response” y “Cold Shock Response”, de esta forma se van adaptando a cambios de temperatura como en el caso de esta investigación donde no se eliminó al patógeno, pero si se disminuyó su tasa de crecimiento y por ende los síntomas producidos en la planta enferma.

La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento y por lo tanto al tiempo de generación de cada microorganismo, presentando una temperatura mínima la cual, por debajo de ella no hay crecimiento.

Esta es la forma de controlar los patógenos presentes, aunque en este estudio si sobrevivió el patógeno, su tasa de crecimiento se redujo y por ende su severidad. Para lograr llegar al umbral por debajo de la temperatura mínima que requieren los patógenos para reproducirse y sobrevivir es necesario continuar los estudios en la enfermedad del moteado clorótico de hoja de aguacate para así tener el dato específico de tiempo de exposición y temperatura óptima para lograr la eliminación de la enfermedad con una mínima o nula mortalidad de las plantas injertadas.

En el caso de las células bacterianas, cuando estas encuentran una adversidad en su ambiente, estas responden. Un paso inicial es registrar qué genes responden y luego adaptan su actividad de acuerdo al tipo de respuesta de la célula ante la adversidad, este envuelve retos tanto cualitativos como cuantitativos; identificando los factores de respuesta y midiendo al mismo tiempo su respuesta. El siguiente paso es descubrir los elementos regulatorios y sus funciones (Neidhardt, 2002). Con todo este proceso las células bacterianas logran sobrevivir en otros ambientes no favorables y a tratamientos como el aplicado en esta investigación por lo que el frío no fue lo suficiente para eliminarla completamente.

CONCLUSIÓN

La termoterapia en seco es un método eficaz para eliminar el moteado clorótico de hoja de aguacate.

LITERATURA CITADA

Bautista Solís, P, Campos-Rojas, E., Aguilar Melchor, J.J., & Muñoz Pérez, R.B. (2002).

Propagación del aguacatero (48 p.). Coatepec Harinas: Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C., Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Campbell, A. I. (1970). *Factors affecting growth during heat treatment*. Table Ronde: “La thermothérapie des espèces ligneuses”. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux. pp. 40- 45.

Campbell, C. & Madden, L. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology* (532 p.). New York: John Wiley & Sons.

Cook, R.J., & Yarham, D.J. (2006). *Epidemiology in sustainable systems*. In Cooke, B. M., Jones, D.G., & Kaye, B. (Eds.). *The epidemiology of plant diseases* (pp 309-334). Dordrecht: Springer.

Díaz, A. J. (1979). *El cultivo del aguacate*. Distrito Federal: FIRA, Banco de México.

Doazan, J. P., Hévin, M., & Ottenwaelter, M. M. (1979). *Remarques sur la thermothérapie de plants de Vigne cultivés en pots*. *Le Progrés Agricole et Viticole*, 96(7), 146-147.

- Durbin, D.R., Frolich, E.F. & Zentmyer, G.A. (1957). Eradication of *Phytophthora cinnamomi* in avocado seed by hot water treatment. *California Avocado Society Yearbook*, 41, 141-142.
- Fan G., Xia, Y, Lin, X., HU, H., Wang, X., Ruan, Ch., Lu, L., & Liu, B. (2016). Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1), 111-119.
- Galzy, R. (1964). Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. *Annales des Epiphyties*, 15, 145-256.
- Goheen, A. C., & Luhn, C. F. (1973). *Heat inactivation of viruses in grapevines*. V Convegno Internazionale sui Virus e le virosi della Vite (ICVG), Salice Terme, pp. 287-289.
- Goheen, A.C., Luhn, C.F., & Hewitt, W. (1965). Inactivation of grapevine viruses in vid. *Proceedings of the International Conference on Virus and Vector on Perennial Host with Special Reference to Vitis* (pp. 255-256). Davis: University of California.
- Gounot, A-M. (1991). Bacterial life at low temperatures: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Bacteriology*, 71,386–397.

- Grondeau, C., Samson, R., & Sands, D.C. (1994). A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, specially seeds from bacetria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 57-525.
- Hartmann, T.H., Kester, D.E., Davies, F.T., & Geneve, R.L. (2002). *Plant propagation. principles and practices* (ed. 7). New York: Prentice Hall.
- Hossain, M.M., Hossain, N.; Sultana, F., Islam, S.M.N., Islam, M.S., & Bhuiyan, M.K.A. (2013). Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris with microbial antagonist, botanical extract and fungicide. *African Journal of Biotechnology*, 12(29), 4699-4706.
- Ibáñez Torres, A. (2004). *Obtención de material vegetal libre de virus en uva de mesa de la región de Murcia y posterior micropropagación*. Serie Técnica y de Estudios 28 (86 p). Murcia: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.
- Keck, M., Chartier, R, Lecomte, P., & Paulin, J.P. (1993). Use of heat treatment to free propagation plant material from contaminations of *Erwinia amilovora*. *Acta Horticulture*, 338, 311-316.
- Mannini, F., & Gribaudo, I. (1999). Risanamento da virus per migliorareil materiale di moltiplicazione viticolo. *L'Informatore Agrario*, 131(99), 69-72.

Neidhart, F.C. (2002). Microbial Reaction to environment: bacterial stress responses revisited in the genomic-proteomic era. In Hodgson, D. A. & Thomas, C. M. (eds.). Signals, switches, regulons, and cascades: Control of bacterial gene expression (pp. 1-18). Society for General Microbiology Symposium, Cambridge: Society for General Microbiology and Cambridge University Press.

Nyland, G. (1962). *Thermotherapy of virus infected fruit trees*. Proceedings of the 5th European Symposium Fruit Tree Virus Diseases (pp. 156-160). Bologna.

Téliz, O.D., Mora, A.G., & Morales, G.L. (2000). Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. In Téliz, D. (coord.) *El aguacate y su manejo integrado*. Distrito Federal: Ediciones Mundi-Prensa.

VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(15), 5589-5593.

Welsh, M. F., & Nyland, G. (1965). Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. *Canadian Journal of Plant Science*, 45(5), 443-454.

Zentmyer, G.A., Thorn, W.A., Paulus, A.O, & Burns, R.M. (1958). Hot-water treatment of avocado seed. *California Avocado Society Yearbook*, 42, 108-110.

DISCUSIÓN GENERAL

En el primer capítulo se determinó la ausencia de *Xylella fastidiosa* mediante PCR teniendo resultados negativos con cuatro pares de iniciadores diferentes, que diversos autores como Firrao & Bazzi (1994), Minsavage *et al.* (1994), Lin y Walker (1997), Francis *et al.* (2006), han desarrollado para la detección de la bacteria *Xylella fastidiosa* en diferentes cultivos (vid, cítricos, almendro, adelfo, etc.), el olivo en Europa (Loconsole *et al.*, 2014), cultivo de papa con síntomas de punta morada en México (Gutiérrez-Ibañez *et al.*, 2009). Por lo tanto, se descarta la presencia de *Xylella fastidiosa* en las muestras con síntomas de moteado clorótico de hoja del aguacate. Resultados negativos en la detección de *X. fastidiosa* se obtuvieron al enviar muestras al Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Postgraduados con lo que se avalan los resultados obtenidos en la presente investigación. A su vez se pudo comprobar que el patógeno que causa el moteado clorótico de la hoja de aguacate se transmite por medio de injerto.

De las pruebas de transmisión de planta con síntomas a injerto sano, se pretendía ver la posible susceptibilidad de tres variedades con contraste en dimensiones de elementos de vaso con la idea de que al tener elementos de vaso más estrechos como es el caso de 'Colín V-33', la posible bacteria no podría moverse libremente. 'Colín V-33' resultó menos afectado con el moteado clorótico de aguacate, mientras que 'Hass' fue muy afectado, esto tal vez sea explicado por el hecho de que tenga los elementos de vaso muy anchos comparado con otros genotipos (Reyes-Santamaría *et al.*, 2002).

Para el aislamiento, identificación y determinación de patogenicidad de microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hoja de aguacate se obtuvieron aislamientos y cultivos puros. Con ellos se realizó la identificación fenotípica mediante un esquema tradicional la cual se basa en las características observables de las bacterias, como su morfología y desarrollo. Se aisló en medio de cultivo PDA y Agar nutritivo cuatro bacterias de diferente coloración (blanca, rosa, amarilla y naranja). Dadas sus características se encontró la bacteria *Clavibacter* spp, con colonias pequeñas de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo al naranja incluso, rosas o rojas concordando con Rodríguez-Mejía (2012). De esta bacteria tres subespecies (subsp. michiganensis, sepedonicus e insidiosus) son cuarentenadas o patógenos regulados de cultivos agrícolas importantes en muchos países (Li *et al.*, 2018).

Mediante pruebas de patogenicidad *in vivo* en tabaco se encontró que las bacterias blanca y amarilla eran más patogénicas con síntomas a partir de 19 días hasta causar la muerte 34 días después de la inoculación. La prueba de patogenicidad *in vivo* en plantas de aguacate resultó en mayor patogenicidad de bacteria de colonia color blanco con síntomas a partir de 55 días con máxima expresión de síntomas a 80 días después de la inoculación, sin embargo, no fueron síntomas típicos de moteado clorótico de hojas de aguacate.

En el tercer capítulo se estudió la eficacia de la termoterapia para la erradicación del moteado clorótico de hoja de aguacate realizándose de dos formas, una en invernadero de cristal con temperaturas por arriba de 48 °C, cerrando las ventanas para mantener el máximo de temperatura dentro del invernadero y la otra utilizando una cámara de ambiente controlado, a 46 °C.

En el invernadero de cristal se lograron temperaturas por arriba de 45 °C en las horas de máxima radiación solar (12 a 3 pm) en los meses de enero a mayo, teniendo una máxima temperatura promedio en los meses de febrero y marzo con 49 °C. Esto ayudó a la eliminación de los síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate ya que diversos autores recomiendan temperaturas de 45 °C por un período de 3 hr (Grondeau *et al.*, 1992, Keck *et al.*, 1993, Fan *et al.*, 2016,) para eliminar patógenos de plantas y de varetas.

El tratamiento de termoterapia aplicado en el invernadero de cristal resultó en 98 % de plantas sin síntomas de moteado clorótico de hoja, de manera similar ocurrió en el segundo grupo de plantas con síntomas de moteado tratadas con termoterapia en el invernadero de cristal.

Uno de los pioneros en la utilización de termoterapia aplicada a árboles frutales de hueso (Nyland, 1962) obtuvo buenos resultados en el saneamiento de cerezo y ciruelo; actualmente existen más patógenos y mutaciones de estos, por lo que la aplicación de la termoterapia vuelve a tomar importancia contra los nuevos patovares o razas descritas. Goheen *et al.* (1965) también reportan el uso de termoterapia para eliminar virus de plantas de vid.

Al realizar el análisis de varianza, se encontró que existen diferencias entre tratamientos por lo que los tiempos de exposición afectan de manera significativa a la eliminación de síntomas de moteado clorótico de hoja de aguacate. Se encontró diferencias ($P = 0.42$) entre los tratamientos de termoterapia de una hora y media y tres horas. La exposición de las plantas con síntomas de moteado a una temperatura de tres horas produjo mejores resultados en cuanto al testigo con moteado, con un promedio de 72 % de disminución de síntomas a comparación del tratamiento de hora y media con promedio de 30 % de disminución de síntomas de moteado de hojas.

Las plantas tratadas en cámara de ambiente controlado a 46 °C durante tres horas, resultaron más efectivas para eliminar los síntomas, presentando una disminución de 70 % en hojas viejas y el desarrollo de nuevos brotes sin presencia de síntomas de moteado clorótico a partir de 8 a 10 semanas después de efectuada la termoterapia.

En plantas tratadas durante hora y media la reducción de síntomas fue menor, con un 30 %, en comparación con el tratamiento de tres horas, indicando que se necesita más tiempo de exposición a altas temperaturas para obtener resultados eficaces de eliminación de factor que causa el moteado y reducción de síntomas externos. El 80 % de los nuevos brotes no presentaron síntomas de moteado clorótico.

Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Fan *et al.* (2016), donde concluyen que el uso de termoterapia (45 o 48 °C) en un ambiente controlado puede reducir los síntomas de la enfermedad y disminuir hasta un 90 % la población del patógeno presente 8 semanas después de la termoterapia.

Se determinó la eficacia de temperatura baja (-2 °C) aplicadas a varetas para el manejo del moteado clorótico de hoja de aguacate. En este estudio se presentó un 72 % de injertos vivos tratados con bajas temperaturas (-2 °C), mostrando una incidencia del 100 % de los síntomas del moteado clorótico de la hoja, lo cual indica que el tratamiento no tuvo efecto en la disminución de la incidencia de la enfermedad. Aunque no se eliminó la incidencia de la enfermedad, visualmente las plantas tratadas con temperatura baja presentaron una atenuación de los síntomas en comparación con el testigo sin tratamiento

LITERATURA CITADA

Fan G., Xia, Y, Lin, X., HU, H., Wang, X., Ruan, Ch., Lu, L., & Liu, B. (2016). Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (Citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1), 111-119.

Firrao, G., & Bazzi, C. (1994). Specific identification of *Xylella fastidiosa* using the polymerase chain reaction. *Phytopathologia Mediterranea*, 33, 90-92.

Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H. & Civerolo, E. L. (2006). Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 203-213.

Goheen, A.C., Luhn, C.F., & Hewitt, W. (1965). Inactivation of grapevine viruses in vid. Proceedings of the International Conference on Virus and Vector on Perennial Host with Special Reference to *Vitis* (pp. 255-256). Davis: University of California.

Grondeau, C., Samson, R., & Sands, D.C. (1994). A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, specially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 57-525.

Gutiérrez-Ibáñez, A. T., Laguna-Cerda, A., Rojas-Martínez, R. I., González-Garza, R., Salgado-Siclan, M. L., Aguilar-Ortigoza, C. & González-Esquivel, C. (2009). Asociación molecular de *Xylella fastidiosa* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con síntomas de punta morada, en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 275-279.

Keck, M., Chartier, R., Lecomte, P., & Paulin, J.P. (1993). Use of heat treatment to free propagation plant material from contaminations of *Erwinia amilovora*. *Acta Horticulture*, 338, 311-316.

Li, X., Tambong, J., Yuan, K. X., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A., & De Boer, S. H. (2018). Reclassification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology*.

Lin, H. & Walker, M. A. (1997). Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *HortScience*, 32, 1264-1266.

Loconcole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasher, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M. R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Sabino, V. & Saponari, M. (2014). Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 7-14.

- Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C. & Stall, R. E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84, 446-461.
- Nyland, G. (1962). *Thermotherapy of virus infected fruit trees*. Proceedings of the 5th European Symposium Fruit Tree Virus Diseases (pp. 156-160). Bologna.
- Reyes-Santamaría, I., Terrazas, T., Barrientos-Priego, A.F., & Trejo, C. (2002). Xylem conductivity and vulnerability in cultivars and races of avocado. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 97-105.
- Rodríguez-Mejía, M. D. L. (2012). *Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas* (146 p.). Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.

CONCLUSIONES GENERALES

Se descarta la presencia de *Xylella fastidiosa* en plantas con síntomas de moteado clorótico de hoja del aguacate. A su vez se pudo comprobar que el patógeno que causa el moteado clorótico de la hoja de aguacate se transmite por medio de injerto.

‘Colín V-33’ resultó menos afectado con el moteado clorótico de aguacate, mientras que ‘Hass’ fue más afectado.

Se encontró *Clavibacter* spp en plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico de hojas. La mayor patogenicidad *in vivo* fue del aislado de la bacteria blanca en plantas de aguacate, sin embargo, no mostraron los síntomas típicos del moteado clorótico de hoja.

La termoterapia en seco es un método eficaz para eliminar los síntomas del moteado clorótico de hoja de aguacate.