



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

ETIOLOGÍA DEL MOTEADO CLORÓTICO
DE HOJAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.)

TESIS DE GRADO

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ELIZABETH GAYTÁN CAMPOS

BAJO LA SUPERVISIÓN DE:

DR. ALEJANDRO FACUNDO BARRIENTOS PRIEGO

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, MAYO DE 2022



APROBADA



ETIOLOGÍA DEL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJAS DE AGUACATE

(*Persea americana* Mill.)

La presente investigación fue realizada por la Ing. Elizabeth Gaytán Campos, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego

ASESOR:



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR:



Dr. Juan Martínez Solís

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ANEXOS	xv
DEDICATORIAS	xvi
AGRADECIMIENTOS	xvii
DATOS BIOGRÁFICOS	xviii
RESUMEN GENERAL	xix
GENERAL ABSTRACT	xx
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	3
ESTRUCTURA DE LA TESIS	4
LITERATURA CITADA	4
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CRECIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJAS DE AGUACATE	6
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Observación de los microorganismos	10
Aislamiento y crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo e infusiones	12
Postulados de Koch	20
Prueba de nematodos en zanahoria	23
Determinación de la presencia o ausencia de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> , <i>Ca.</i> <i>Liberibacter americanus</i> y <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i>	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Observación de microorganismos	24

Aislamiento y crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo e infusiones	27
Postulados de Koch.....	33
Prueba de nemátodos en zanahoria.....	40
Determinación de la presencia o ausencia de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> , <i>Ca. Liberibacter americanus</i> y <i>Ca. Liberibacter solanacearum</i>	42
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44
CAPÍTULO II. INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PROGRESO DEL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJAS DE AGUACATE	47
RESUMEN.....	47
CHAPTER II. INCIDENCE, SEVERITY AND PROGRESS OF THE CHLOROTIC MOTTLE OF AVOCADO LEAVES.....	48
ABSTRACT.....	48
INTRODUCCIÓN	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
Observación de organismos en hojas con diferente severidad	51
Escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico de hojas de aguacate	52
Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) del moteado clorótico de hojas de aguacate	54
Análisis estadístico	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
Observación de organismos en hojas con diferente severidad	56
Escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico de hojas de aguacate	59
Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) del moteado clorótico de hojas de aguacate	61
Análisis estadístico	64
CONCLUSIONES	83
LITERATURA CITADA	84

DISCUSIÓN GENERAL.....	86
CONCLUSIONES GENERALES	93
ANEXOS.....	94

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Disposición de los medios de cultivo sembrados para el crecimiento de protozoarios.	15
Cuadro 2. Disposición de las preparaciones de infusiones con cortes longitudinales y transversales de hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico para crecimiento de protozoarios.	17
Cuadro 3. Disposición de las preparaciones de infusiones con macerados para el crecimiento de protozoarios.	19
Cuadro 4. Disposición de las preparaciones de infusiones de chícharo y arroz con cortes longitudinales y transversales para el crecimiento de protozoarios.	20
Cuadro 5. Interacciones entre árboles aguacate y estratos estudiadas en el análisis de varianza univariado.	56
Cuadro 6. Límite inferior (L.i), Límite superior (L.s) y puntos medio de clase (P.M.C) de las clases generadas en la escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico de hojas de aguacate.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disposición invertida de los tallos y hojas con peciolo expuesto para la extracción de savia de hoja de aguacate.	10
Figura 2. Corte longitudinal del peciolo de la hoja de aguacate.	11
Figura 3. Corte longitudinal del peciolo de la hoja de aguacate.	16
Figura 4. Corte transversal del peciolo de la hoja de aguacate.	16
Figura 5. Disposición de los tratamientos aplicados para las pruebas de patogenicidad en aguacate. A. Arroz; C. Chícharo; M. Macerado; T. Testigo. .	21
Figura 6. Disposición de tratamientos de infusión de arroz y macerado de tallos y hojas aplicados para las pruebas de patogenicidad en aguacate. A. Arroz; M. Macerado; Ts. Testigo; T. Inyección en el corte del tallo; PH. Inyecciones en peciolos y hojas.	22
Figura 7. Parte de la estructura de un nematodo observado en una muestra de savia de tallos y hojas de aguacate sin síntomas de moteado clorótico.	24
Figura 8. Microorganismos alargados y ovalados observados en muestras de savia de tallos y hojas con síntomas de moteado clorótico.	25
Figura 9. Microorganismos presentes en cortes longitudinales de peciolos y vena central de hojas con síntomas de moteado clorótico en aguacate.	25
Figura 10. Tinción con verde rápido y verde de metileno de los cortes longitudinales de peciolos de hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico.	26
Figura 11. Bacteria saprófita presente a los dos días de revisión en medio de cultivo agar sangre sembrado con la suspensión y colocado en incubadora. ..	27
Figura 12. Bacteria saprófita presente a los dos días de revisión en medio de cultivo agar sangre sembrado con el macerado y colocado en incubadora.	27
Figura 13. <i>Fusarium</i> presente a los dos días de revisión en medio de cultivo agar avena con segmentos de hoja y colocado en temperatura ambiente.	28

Figura 14. <i>Aspergillus</i> presente a los seis días de revisión en medio de cultivo agar sangre con segmentos de hoja y colocado en incubadora.	28
Figura 15. <i>Fusicladium</i> presente a los seis días de revisión en medio de cultivo agar sangre con segmentos de hoja y colocado en incubadora.	28
Figura 16. Microorganismos presentes en la suspensión que contenía cortes longitudinales de peciolo de hoja de aguacate.	29
Figura 17. Microorganismos presentes en infusión de maíz con suspensión de cortes transversales de peciolo de hoja de aguacate.	30
Figura 18. Microorganismos presentes en infusión de nixtamal con suspensión de cortes transversales de peciolo de hoja de aguacate.	30
Figura 19. Microorganismos presentes en infusión de chícharo con suspensión de cortes longitudinales de peciolo de hojas de aguacate.	30
Figura 20. Microorganismos presentes en infusión de chícharo con macerado...	31
Figura 21. Microorganismos presentes en infusión de arroz con macerado....	31
Figura 22. Microorganismos presentes en la preparación de macerado.	32
Figura 23. Microorganismos presentes en la infusión de arroz el primer y sexto día.	32
Figura 24. Microorganismos presentes en la infusión de chícharo el primer y sexto día.	32
Figura 25. Síntomas de clorosis intervenal con patrón desuniforme, manchas pequeñas y circulares en hojas de aguacate inoculadas con protozoarios.	33
Figura 26. Síntomas de necrosis en hojas nuevas de aguacate inoculadas con protozoarios.	34
Figura 27. Testigo inoculado con agua destilada sin presencia de síntomas. ..	34
Figura 28. Síntomas de necrosis, clorosis de forma irregular y clorosis intervenal en hojas maduras de plantas aguacate inoculadas con protozoarios.	35
Figura 29. Hojas y brotes nuevos secos y con clorosis en plantas aguacate inoculadas con protozoarios.	36

Figura 30. Planta inoculada con protozoarios completamente seca y uno de sus brotes nuevos con necrosis.	36
Figura 31. Testigo inoculado con agua destilada directamente en el tallo sin síntomas de clorosis y con los brotes y hojas nuevas normales.....	37
Figura 32. Testigo inoculado con agua destilada mediante inyecciones en peciolo y hojas, sin síntomas de clorosis y con los brotes y hojas nuevas normales.	37
Figura 33. Microorganismos aislados de tejido de peciolo, hojas y tallos de plantas inoculadas con el tratamiento de infusión de arroz.	38
Figura 34. Microorganismos aislados de tejido de peciolo, hojas y tallos de plantas inoculadas con el tratamiento de macerado.	38
Figura 35. Vasos del xilema del testigo inoculado con agua destilada directamente en el tallo sin presencia de organismos.	39
Figura 36. Vasos del xilema del testigo inoculado con agua destilada mediante inyecciones en peciolo y hojas sin presencia de organismos.	39
Figura 37. Rodajas de zanahoria en temperatura ambiente e incubadora 24 horas después de ser inoculadas con macerado de peciolo y hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico, sin presencia de callos ni masas de nematodos.....	40
Figura 38. Rodajas de zanahoria en temperatura ambiente e incubadora 48 horas después de ser inoculadas con macerado de peciolo y hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico, sin presencia de callos ni masas de nematodos.....	41
Figura 39. Rodajas de zanahoria en temperatura ambiente e incubadora 72 horas después de ser inoculadas con macerado de peciolo y hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico, sin presencia de callos ni masas de nematodos.....	41

Figura 40. Hojas de aguacate ‘Duke 7’ colectadas con diferente grado de severidad de moteado clorótico. A: bajo; B: intermedio; C: avanzado.	51
Figura 41. Corte longitudinal del peciolo de la hoja.	52
Figura 42. División de árbol de aguacate en tres estratos para el muestreo. ...	52
Figura 43. Organismos observados en los vasos del xilema de los cortes de hojas de aguacate con grado bajo de severidad, se aprecian espacios entre sí y algunos vasos de xilema contiguos vacíos.....	57
Figura 44. Organismos observados en los vasos del xilema de los cortes de hojas de aguacate con grado medio de severidad, se aprecia poco espacio entre los protozoarios y pocos vasos del xilema vacíos.	58
Figura 45. Organismos observados en los vasos del xilema de los cortes de hojas de aguacate con grado avanzado de severidad, se aprecia gran población de protozoarios adosados en todos los vasos del xilema del área observada.	58
Figura 46. Escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico en hojas de aguacate.	60
Figura 47. Precisión y exactitud de la escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico en hojas de aguacate.	61
Figura 48. Cristales romboidales presentes en peciolos y hojas de árboles con síntomas de moteado clorótico.	63
Figura 49. Análisis de varianza univariado de estratos y variedad (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas...64	64
Figura 50. Gráfico de interacción de estratos y variedad (árboles) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas de aguacate número 3....64	64
Figura 51. Distribución de datos del efecto de los estratos sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de moteado clorótico de hoja de aguacate.....	65

Figura 52. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de los estratos sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas de aguacate número 3.	65
Figura 53. Distribución de datos del efecto de las variedades (árboles) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad moteado clorótico en hoja de aguacate.	66
Figura 54. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las variedades (árboles) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de moteado clorótico en hoja de aguacate.	66
Figura 55. Análisis de varianza univariado de estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes hojas.	67
Figura 56. Gráfico de interacción de variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.	67
Figura 57. Distribución de datos del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.....	68
Figura 58. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.	68
Figura 59. Análisis de varianza univariado de estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.	69
Figura 60. Gráfico de interacción de estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.	69
Figura 61. Distribución de datos del efecto de los estratos sobre la cantidad de cristales formados en hojas de aguacate.....	70
Figura 62. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de los estratos sobre la cantidad de cristales formados en hojas de aguacate.....	71

Figura 63. Distribución de datos del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.	71
Figura 64. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.	72
Figura 65. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.	73
Figura 66. Distribución de datos del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.	74
Figura 67. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.	74
Figura 68. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles en aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.	75
Figura 69. Distribución de datos del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.	76
Figura 70. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.	76
Figura 71. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de cristales formados en hojas.	77

Figura 72. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de cristales formados en hojas.	78
Figura 73. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de cristales formados en hojas.	78
Figura 74. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en hojas de aguacate número 1.....	79
Figura 75. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en hojas de aguacate número 2.....	80
Figura 76. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en hojas de aguacate número 3.....	80
Figura 77. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en el estrato inferior de hojas de aguacate.	81
Figura 78. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en el estrato medio de hojas de aguacate.	82

Figura 79. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en el estrato superior de hojas de aguacate. 82

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Evaluaciones realizadas a los 3 árboles bajo estudio para conocer el Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad.....	94
Anexo 1. Continuación.....	95
Anexo 2. Número de píxeles totales (PT), número de píxeles ocupados por los protozoos (PO), datos de PO expresado en porcentaje y número de cristales presentes en el área observada de cortes longitudinales de peciolo y hojas con síntomas de moteado clorótico del árbol 1.	96
Anexo 3. Número de píxeles totales (PT), número de píxeles ocupados por los protozoos (PO), datos de PO expresado en porcentaje y número de cristales presentes en el área observada de cortes longitudinales de peciolo y hojas con síntomas de moteado clorótico del árbol 2.	96
Anexo 4. Número de píxeles totales (PT), número de píxeles ocupados por los protozoos (PO), datos de PO expresado en porcentaje y número de cristales presentes en el área observada de cortes longitudinales de peciolo y hojas con síntomas de moteado clorótico del árbol 3.	97

DEDICATORIAS

A Dios por ser mi fortaleza y guía, por brindarme salud y sabiduría para concluir una etapa más en mi vida profesional.

A mis padres J. Guadalupe Gaytán Ruelas y Beatriz Campos de la Cruz, por impulsarme a seguir con mi preparación, por sus consejos, cariño, paciencia y apoyo incondicional. Les agradezco sus desvelos y cafés a medianoche, los amo, en donde quiera que me encuentre, gracias por tratar de comprenderme.

A mi hermano Israel Gaytán Campos por ser mi ejemplo a seguir desde pequeños, por su amistad, complicidad y traspasos compartidos, le amo doctor, sé que cumplirás todas tus metas.

Al amor de mi vida Everardo Rodríguez González por ser inspiración pura y no dejarme tirar la toalla, gracias por tus sacrificios y por ser la mejor casita para mis futuros, estoy muy orgullosa de quién eres y en dónde estás, le amo ingeniero.

A mis mejores amigos, especialmente a Nubia Vanessa Picazo Cuervo, Aryana Gricell Robles López, Marilyn Monsiváis Balandrán, Laura Leticia Maciel Rosas, Edith Zitlaly Rodríguez González, Julia Carolina Albino González, Oriandy Guadalupe Díaz Cenicerós y Eduardo Barrientos Romero por no soltar mi mano aún tras los kilómetros y seguir firmes al pie del cañón.

A todos aquellos que confiaron en mí y velan por mi bienestar.

AGRADECIMIENTOS

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

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 Maestro en Ciencias.

A los miembros de mi comité asesor, los doctores Alejandro Facundo Barrientos Priego Santos Gerardo Leyva Mir y Juan Martínez Solís por su guía, dedicación y constancia para el desarrollo de esta investigación, también agradecer su paciencia y consejos a lo largo del posgrado.

A Heladio Santacruz Ulibarri, por sus valiosas aportaciones a la presente investigación.

A los trabajadores del Campo Agrícola Experimental y del laboratorio del Departamento de Parasitología Agrícola, por su apoyo y tiempo invertido para la realización de las diferentes pruebas.

A mis compañeros de maestría y doctorado del Instituto de Horticultura, especialmente a Caro, Lupita, Efrén, Gaby, Christian, Felipe, Diego, Alma y Bere, por su ayuda y valiosa amistad en todo el posgrado.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos Personales

Nombre: Elizabeth Gaytán Campos

Fecha de nacimiento: 18 de Octubre de 1996

Lugar de nacimiento: San Luis Huexotla, Texcoco de Mora, Estado de México, México

CURP: GACE961018MMCYML04

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola

Cédula profesional: 11683362



Desarrollo Académico

Inició sus estudios en la Universidad Autónoma Chapingo, donde cursó la Preparatoria Agrícola de 2011 a 2014. Después ingresa al Departamento de Parasitología Agrícola egresando en el año 2018, para posteriormente titularse por medio de la modalidad de mérito académico. Realizó su servicio social en Fundación Chapingo y su estancia preprofesional en GISENAlabs, en el año 2018 trabajó como asistente del área de titulación en el Centro de Educación Continua de la UACH. Se ha desarrollado en el ámbito agrícola, en el área de calidad e inocuidad en la agroindustria, así como en lenguas extranjeras. En enero del año 2020, ingresa al Posgrado de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo el grado en junio de 2022.

ETIOLOGÍA DEL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJAS DE AGUACATE

(*Persea americana* Mill.)

RESUMEN GENERAL

México es el principal proveedor de aguacate a nivel mundial, sin embargo, existen obstáculos para su comercialización como el aspecto fitosanitario. Actualmente se ha reportado al moteado clorótico de las hojas como una limitante en su producción, del cual no se tiene certeza del verdadero agente causal, por tal motivo el presente estudio se dividió en dos capítulos, en donde el primero tuvo como objetivos identificar a los microorganismos asociados al síntoma a través de análisis PCR y microscopía, además de llevar a cabo los postulados de Koch; en el segundo se planteó el análisis de la enfermedad con herramientas estadísticas como el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), la elaboración de una escala logarítmica diagramática, así como el estudio de la cantidad de organismos presentes y cristales formados por las plantas. Los resultados reflejaron la presencia de protozoos asociados al síntoma, no fue posible realizar su tinción con los colorantes verde rápido y verde de metileno, sin embargo, fue posible su aislamiento y crecimiento en infusiones de chícharo y arroz. Se obtuvo el cumplimiento de los postulados de Koch, se descartó la asociación con alguna especie de nematodos y se obtuvieron resultados negativos para las variantes *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* y *Ca. liberibacter solanacearum*. Por otro lado, se obtuvo que una mayor severidad se alcanza cuando existe gran cantidad de protozoarios en los vasos del xilema; la escala elaborada constituida por seis clases resultó opción viable para la evaluación de daños, con precisión $R^2=0.82$, exactitud de 1.07, índice de reproducibilidad de 1.0 y un error del 8 %. Se definió que la planta forma cristales como mecanismo de defensa antes de verse severamente afectada, además de que el progreso de la enfermedad depende de la cantidad de organismos presentes teniendo una relación directa positiva.

Palabras clave: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad, Clorosis, Cristales, Escala, Postulados de Koch, Protozoarios, Severidad

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elizabeth Gaytán Campos.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego.

ETIOLOGY OF CHLOROTIC MOTTLE OF AVOCADO LEAVES

(*Persea americana* Mill.)

GENERAL ABSTRACT

Mexico is the main supplier of avocado worldwide, however, there are obstacles to its commercialization such as the phytosanitary aspect. Currently, the chlorotic mottle of avocado leaves has been reported as a limitation in its production, of which the true causal agent is not certain, for this reason the present study was divided into two chapters, where the first had the objective of identifying the microorganisms associated with the symptom through PCR analysis and microscopy, in addition to carrying out Koch's postulates; in the second, the analysis of the disease was proposed with statistical tools such as the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC), the development of a diagrammatic logarithmic scale, as well as the study of the number of organisms present and crystals formed by the plants. The results reflected the presence of protozoa associated with the symptom, it was not possible to stain them with fast green and methylene green dyes, however, their isolation and growth in pea and rice infusions was possible. Compliance with Koch's postulates was obtained, the association with some species of nematodes was ruled out and negative results were obtained for the variants *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* and *Ca. liberibacter solanacearum*. On the other hand, it was obtained that greater severity is reached when there is a large number of protozoa in the xylem vessels; the elaborated scale made up of six classes was a viable option for damage assessment, with precision $R^2=0.82$, accuracy of 1.07, reproducibility index of 1.0 and an error of 8%. It was defined that the plant forms crystals as a defense mechanism before being severely affected, in addition to the fact that the progress of the disease depends on the number of organisms present, having a direct positive relationship.

Keywords: Area under the disease progress curve, Chlorosis, Crystals, Scale, Koch's Postulates, Protozoa, Severity

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elizabeth Gaytán Campos.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate es una especie frutal arbórea, originaria del continente americano, encontrando hallazgos desde México, pasando por toda Centro América y hasta Colombia, Ecuador y Perú, perteneciente al género *Persea* y a la familia botánica Lauraceae (Mejía, 2011). Es un árbol tipo perenne cuyo establecimiento se realiza en regiones libres de heladas y de vientos calurosos y secos, además de contar con altitudes entre 800 y 2,500 m y con 1,200 mm de precipitación anuales bien distribuidos; la siembra se hace por trasplante, en suelos con textura ligera, profundos, bien drenados y con pH neutro o ligeramente ácido (SAGARPA, 2017).

Se estima una producción global de 8 millones de toneladas, donde México destaca como uno de los principales países productores con 2.39 millones t, seguido por Colombia con 876,754 t y República Dominicana con 676,373 t (FAO, 2020). La producción nacional de aguacate ha mostrado una tendencia creciente en cuanto a superficie cultivada y volumen de producción, en 2020 se reportó una superficie de 241,136.11 hectáreas plantadas, encontrando al estado de Michoacán en primer lugar con una producción de 1.8 millones t, seguido por Jalisco con 248,192.73 t y Estado de México con 118,268.01 t (SIAP, 2020).

México provee el 45.95 % de las exportaciones mundiales de este fruto, siendo el principal suministro de este fruto en el mercado internacional (Martínez, 2018). La demanda de este fruto se ha incrementado en 26 países que incluyen integrantes del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), hoy Tratado México Estados Unidos Canadá (TMEC), del Acuerdo Estratégico Trans-Pacífico de Asociación Económica (TPP) y del Tratado de Libre Comercio del Triángulo Norte (TLCTN). Además, el frutal mexicano también llega a países que son miembros de la Unión. Europea, a China y a naciones con los que México no tiene tratados de libre comercio (Cruz et al., 2020).

Aunado a ello, el cultivo de este frutal es fuente generadora de empleos y divisas (Velázquez-Torres et al., 2020), por lo que resulta justificable el interés en su

incremento, sin embargo, existen numerosas limitantes para su establecimiento, producción y comercialización como lo es el aspecto fitosanitario. En el cultivo de aguacate, las enfermedades afectan la producción un 40 % y son consideradas de gran impacto debido a que elevan los costos de producción, requiriéndose de seis a siete aplicaciones de pesticidas para su control, acompañadas por prácticas culturales y de manejo (López et al., 2017).

Dentro de las principales enfermedades que afectan a esta plantación, se encuentran la pudrición de la raíz, marchitamiento, roña, mancha angular del fruto, pudrición del fruto, antracnosis del fruto y muerte descendente de ramas y brotes (ICA, 2012). Actualmente se ha manifestado un síntoma denominado moteado clorótico de las hojas, que se manifiesta como una clorosis intervenal en hojas jóvenes (Barroso et al., 1985), y hojas terminales muy pequeñas con márgenes necróticos y entrenudos cortos en casos avanzados (Malo, 1976).

Este síntoma se ha encontrado ampliamente distribuido en las zonas de producción más importantes de México, donde pocos trabajos lo asocian con la bacteria *Xylella fastidiosa* (Zapata-Montes et al. 2021), con el viroide de la mancha de sol y a una deficiencia nutrimental (Hernández-Valdés et al., 2012); de igual manera, por la similitud de sintomatología y su distribución puede tratarse de una variante del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter*), no obstante, se desconocen los factores involucrados en su aparición, por lo tanto esto genera sospechas sobre un posible agente patogénico al comprobarse que (Zapata-Montes et al. 2021).

Este fenómeno merece atención, ya que en México la producción de planta de aguacate se basa principalmente en el uso de portainjertos originados por semilla e injertación de estos, donde la fuente de vareta en la mayoría de los casos no lleva un control de origen y fitosanitario, por lo que existe mayor riesgo de tratarse de un microorganismo fitopatógeno puede ser la expansión del inóculo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar la etiología del moteado clorótico de hojas de aguacate.

Objetivos específicos

Identificar, aislar, incrementar y determinar la patogenicidad de microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hojas de aguacate a través de microscopía, medios de cultivo e infusiones y pruebas de patogenicidad, así como verificar el cumplimiento de los postulados de Koch.

Determinar mediante PCR, la presencia o ausencia de *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter solanacearum* en plantas de aguacate con síntomas de moteado de hojas.

Elaborar y validar una escala logarítmica diagramática de severidad para evaluar la incidencia y área najo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de árboles de aguacate, así como la cantidad de organismos presentes y cristales de oxalato de calcio formados por la planta, por medio de microscopía y análisis estadísticos.

HIPÓTESIS

Existe la presencia de microorganismos fitopatógenos que causan el moteado clorótico de hojas en plantas de aguacate.

Los microorganismos fitopatógenos asociados son patogénicos.

Los síntomas de moteado clorótico de hojas de aguacate no son producidos por las variantes *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* y *Ca. liberibacter solanacearum*.

Existen diferencias entre árboles en el ABCPE, así como en la cantidad de organismos presentes y cristales de oxalato de calcio formados por la planta.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Este documento está dividido en dos capítulos, el primero para la identificación, crecimiento y aislamiento de los organismos causales y el segundo para la evaluación del progreso de la enfermedad, número de organismos y la formación de cristales, ambos con formato de artículo científico, de manera que procedente de ello se presenta una discusión y conclusiones generales.

LITERATURA CITADA

- Barroso, A., Díaz, A., García, V. & Altares, M. (1985). Deficiencias de Zn y Mn en los cultivos de aguacate de Tenerife, Islas Canarias. *Fruits*, 40(1):39-47.
- Cruz L., D. F., Caamal C., I., Pat F., V. G., Gómez, A. & Espinoza T., L. E. (2020). Posicionamiento internacional del aguacate (*Persea americana*) producido en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 47: 561-570.
- FAO. (2020). *FAOSTAT*. Organización para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de: <http://faostat.fao.org>.
- Hernández-Valdés, E. F., Aguilar-Campoverde, S., Aguiara-Taylor, V., & Pérez-Sánchez, R. E. (2012). Concentración nutrimental en hojas de aguacate 'Hass' con síntoma de moteado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 621-627.
- ICA. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (Persea americana Mill), medidas para la temporada invernal*. Produmedios. Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/getattachment/4b5b9b6f-ecfc-46e1-b9ca-b35cc1cefee2/->
- López E., M. E., Noriega C., D. H, Damián N., A., González M., R., Pereyda, H. J., Domínguez M., V. M., Martínez A., U., Cruzaley S., R., Cruz L., B. & Salas A., E. (2017). *Guía para el manejo integrado del aguacate en altas densidades en el estado de Guerrero*. Comité Sistema Producto Aguacate de Guerrero, A.C.
- Malo, S. E. (1976). Mineral nutrition of avocados. *Proc. of the First Inter. Tropical fruit short course: The avocado* (pp. 42-46). Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Martínez, M. (2018). *México principal productor de aguacate*. El Economista. Recuperado de: <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Mexico-principal-productor-de-aguacate-20180131-0111.html>

- Mejía V., E. (2011). *Aguacate Persea americana Miller*. Bayer CropScience una división de Bayer S.A. Carlos Arboleda. <https://www.kuye.com.co/wp-content/uploads/2020/07/Cartilla-AGUACATE.pdf>
- SAGARPA. (2017). *Aguacate mexicano*. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030?state=published>
- SIAP. (2020). *Cierre de la producción agrícola por cultivo*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. <http://www.siap.gob.mx>.
- Velázquez-Torres, A. L., Martínez-Castañeda, F. E., & Martínez-Campos, Á. R. (2020). El carácter agroexportador de frutas y hortalizas: el caso del aguacate mexicano ante la apertura comercial y TLCAN. In Martínez-Castañeda, F. E. & Herrera-Tapia, F. (Eds.), *Aprendizajes y trayectorias del sector agroalimentario mexicano durante el TLCAN* (pp. 77-94). IICA
- Zapata-Montes, N. J., Campos-Rojas, E., Ayala-Arreola, J., Acuayte-Valdés, E., Barrientos-Priego, A. F. 2021. *Xylella fastidiosa* no es causante del moteado clorótico de la hoja en aguacate. In: Barrientos-Priego, A. F. (Ed.), *Memorias del VI congreso latinoamericano del aguacate* (pp. 279-280; 9 - 12 de noviembre 2021, La Antigua, Guatemala). Asociación Guatemalteca de Exportadores AGEXPORT.

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO, CRECIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL MOTEADO CLORÓTICO DE HOJAS DE AGUACATE

RESUMEN

Se estima una producción global de 8 millones de toneladas de aguacate, donde México destaca como uno de los principales países productores con 2.39 millones t y 45.95 % de las exportaciones mundiales. En este contexto, el aspecto fitosanitario es considerado como una enorme restricción a la exportación y actualmente se ha manifestado un síntoma denominado moteado clorótico de las hojas, el cual ha sido asociado a deficiencias de zinc, a la bacteria *Xylella fastidiosa* y al viroide de la mancha de sol del aguacate, además de su posible relación con alguna variante de la bacteria *Candidatus Liberibacter* o alguna especie de protozoos, sin tener certeza del verdadero agente causal. Por tal motivo el presente estudio tuvo como objetivos identificar a los microorganismos asociados al síntoma a través de microscopía, medios de cultivo e infusiones y pruebas de patogenicidad, además de determinar mediante PCR, la presencia o ausencia de alguna variante *Ca. Liberibacter*. Los resultados reflejaron la presencia de protozoos asociados al síntoma de moteado clorótico de hojas en plantas de aguacate, coincidiendo en forma, movimiento y comportamiento con lo descrito en la literatura, no fue posible realizar la tinción de sus estructuras con los colorantes verde rápido y verde de metileno, sin embargo, fue posible su aislamiento y crecimiento en infusiones de chícharo y arroz. Se obtuvo el cumplimiento de los postulados de Koch, se descartó la asociación entre alguna especie de nematodos y el síntoma y se obtuvieron resultados negativos para las variantes *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* y *Ca. liberibacter solanacearum*.

Palabras clave: *Ca. Liberibacter*, Clorosis, Infusiones, Postulados de Koch, Protozoarios.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elizabeth Gaytán Campos.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego.

CHAPTER I. IDENTIFICATION, ISOLATION, GROWTH AND PATHOGENICITY OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE CHLOROTIC MOTTLE OF AVOCADO LEAVES

ABSTRACT

A global production of 8 million tons of avocado is estimated, where Mexico stands out as one of the main producing countries with 2.39 million tons and 45.95% of world exports. In this context, the phytosanitary aspect is considered a huge restriction on exports and a symptom called chlorotic mottle of avocado leaves has currently manifested itself, which has been associated with zinc deficiencies, the bacterium *Xylella fastidiosa* and the avocado sunblotch viroid, in addition to its possible relationship with some variant of the bacterium *Candidatus Liberibacter* or some species of protozoa, without being certain of the true causal agent. For this reason, the present study aimed to identify the microorganisms associated with the symptom through microscopy, culture media and infusions, and pathogenicity tests, in addition to determining by PCR, the presence or absence of any *Ca. Liberibacter* variant. The results showed the presence of protozoa associated with the symptom of chlorotic mottle of avocado leaves, coinciding in form, movement and behavior with what is described in the literature, it was not possible to stain their structures with fast green and methylene green, however, its isolation and growth in pea and rice infusions was possible. Compliance with Koch's postulates was obtained, the association between some species of nematodes and the symptom was ruled out, and negative results were obtained for the variants *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* and *Ca. liberibacter solanacearum*.

Keywords: *Ca. Liberibacter*, Chlorosis, Infusions, Koch's Postulates, Protozoa.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elizabeth Gaytán Campos.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego.

INTRODUCCIÓN

El aguacate es considerado una de las frutas tropicales más importantes a nivel mundial, se estima una producción global de 8 millones de toneladas, donde México destaca como uno de los principales países productores con 2.39 millones de toneladas (FAO, 2020) y posee una participación del 45.95 % de las exportaciones mundiales (Martínez, 2018). El aspecto fitosanitario es considerado como una enorme restricción a la exportación de este frutal, su atención fortalece las relaciones con los países importadores y mantiene una posición firme y sustentada en evidencia técnica y científica (SAGARPA, 2017).

En el cultivo de aguacate, se encuentran reportadas 19 enfermedades causadas por hongos, dos de tipo bacteriano, una por algas y otra por un viroide (López et al., 2017). En los últimos años se han observado moteados cloróticos, quemaduras marginales, deformación de hojas, defoliación, acortamiento de entrenudos y muerte regresiva de ramas en árboles de aguacate (Montero-Astúa, 2008). Recientemente en México el moteado clorótico de las hojas está tomando relevancia, encontrándose ampliamente distribuido en huertos nacionales, principalmente en el Estado de México, Morelos y Michoacán (Hernández et al., 2012). Los síntomas han sido descritos como deficiencias de zinc que se presentan en hojas jóvenes con una clorosis intervenal (Barroso et al., 1985) y en hojas terminales muy pequeñas con márgenes necróticos y entrenudos cortos en casos avanzados (Malo, 1976), además a menudo se puede encontrar una deformación de la fruta y si la deficiencia se prolonga, las ramas pueden morir (Zentmyer, 1953), no obstante existen varios componentes que hacen cuestionar que estos síntomas se deban a dicha deficiencia nutricional (Hernández et al., 2012).

Por otro lado, se ha señalado otros posibles agentes causales entre los que se encuentra la bacteria *Xylella fastidiosa* (Zapata-Montes et al., 2021) y el viroide de la mancha de sol del aguacate (Montero-Astúa et al., 2008; Pérez et al., 2015; Saucedo et al., 2019). Asimismo, se ha indicado un moteado en hojas de cítricos producidos por la bacteria *Candidatus Liberibacter* (Etxeberria et al., 2007), por

lo que por su distribución y asociación de cultivo con el aguacate es posible que exista alguna variante causante del moteado clorótico de hojas de aguacate.

Se tiene también la sospecha de que se trate de una especie de protozoos (Santacruz Ulibarri, Heladio. 2019, comunicación personal), lo cual es posible debido a que en cultivos de interés económico como cocotero, café, mango, tomate, yuca y palma aceitera se han detectado que algunos protozoos flagelados como causantes de diversas enfermedades (Sánchez-Moreno et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1998; Paz, 2000), No obstante, al no tener certeza de su origen no se puede establecer un manejo y control adecuado, ya que dentro de un manejo integrado de enfermedades, el correcto diagnóstico del agente causal del problema es clave (Sandoval, 2004).

Uno de los principales problemas que se puede estar favoreciendo es el esparcimiento del inóculo, debido a que se ha demostrado que el moteado clorótico de hojas de aguacate se transmite por injerto (Zapata, 2019), y en nuestro país la producción de planta de aguacate se basa principalmente en el uso de portainjertos originados por semilla e injertación, donde no se tiene cuidado con la fuente de vareta sobre todo en el aspecto fitosanitario. Por este motivo el presente estudio tuvo como objetivos: identificar, aislar, incrementar y determinar la patogenicidad de microorganismos fitopatógenos asociados al moteado clorótico de hojas de aguacate a través de microscopía, medios de cultivo e infusiones y pruebas de patogenicidad; determinar mediante PCR, la presencia o ausencia de *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter solanacearum* en plantas de aguacate con síntomas de moteado de hojas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de campo del Departamento de Fitotecnia ubicado en el campo experimental Xaltepa, y en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México en los años 2020-2022.

Observación de los microorganismos

Toma de muestras

Con ayuda de tijeras y bolsas de plástico limpias, se colectaron hojas y tallos provenientes de dos árboles de aguacate 'Duke 7', que se mantienen en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, de los cuales solo uno presentaba síntomas de moteado clorótico de hojas y otro no mostraba manifestación alguna. Las muestras se clasificaron y etiquetaron de acuerdo con el árbol proveniente.

Desinfección de muestras

Las muestras se lavaron con agua corriente, luego se limpiaron con toallas y alcohol etílico al 70 %, posteriormente se realizaron tres lavados en cajas Petri; el primero con una solución desinfectante a base de 16.6 mL de cloro y 100 mL de agua destilada por 30 s, los últimos dos fueron únicamente con agua destilada, cada uno por 30 s y finalmente se dejaron secar sobre sanitas.

Extracción de savia

Se tomaron de tres a cinco tallos y hojas colectadas de cada árbol, con y sin síntomas de moteado clorótico, de las cuales se obtuvieron muestras de savia con ayuda de una cámara de presión tipo Scholander. Las muestras se colocaron de manera invertida, quedando parte del peciolo expuesto (Figura 1). Posterior a accionar la bomba, se reguló la presión, hasta que con ayuda de una lupa se pudiera ver la expulsión de savia, la cual fue recolectada con una micropipeta y puntas de 10 μ L y luego fue vaciada en tubos Eppendorf de 0.2 mL.

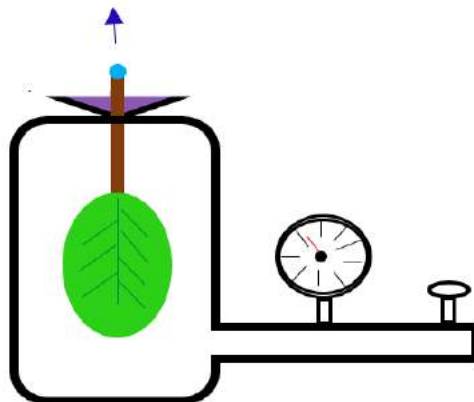


Figura 1. Disposición invertida de los tallos y hojas con peciolo expuesto para la extracción de savia de hoja de aguacate.

Preparación de montajes para observación bajo microscopio

Con ayuda de una aguja de disección y una navaja previamente desinfectada (Figura 2), bajo una cámara de flujo laminar (Prendo® CFL-100) y lámparas de alcohol, se hicieron cortes longitudinales en el peciolo y vena central de las hojas colectadas de cada árbol, con y sin síntomas de moteado clorótico, los cuales posteriormente fueron transferidos a un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada estéril. Una vez acomodados, se colocó un cubreobjetos procurando no generar burbujas, para proceder a analizarlos directamente bajo microscopio (Olympus ® BX53) con el objetivo de 40 x; después se documentó lo obtenido, empleando un adaptador de celular para microscopio y la cámara del dispositivo Xiaomi ® Redmi Note 9 Pro con una resolución de 64 MP.

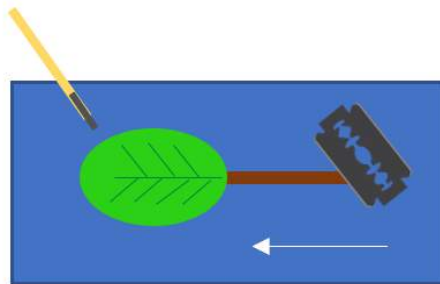


Figura 2. Corte longitudinal del peciolo de la hoja de aguacate.

Por otro lado, con el uso de la micropipeta se transfirieron 20 μ L de la savia colectada a portaobjetos que después fueron cubiertos con un cubreobjetos con el cuidado de no generar burbujas, para proceder a observarlos directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x y documentar lo obtenido.

Tinción de cortes

Se emplearon dos colorantes previamente pesados en una balanza analítica, 0.2 gramos de verde rápido (Meyer ®) y 1 g de verde de metileno (Hycel ®), los cuales se disolvieron por separado en 100 mL de agua destilada estéril.

Una vez listos los colorantes, para cada uno se realizaron cortes longitudinales en el peciolo y vena central de hojas que presentaban síntomas de moteado clorótico, siguiendo el procedimiento previamente mostrado, se transfirieron a un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada estéril y se esperaron de 10-15 minutos para que el agua se evaporara; enseguida, se añadió una gota del colorante y transcurrieron de 20-30 min para luego hacer un lavado del corte con agua destilada, después se puso un cubreobjetos y se procedió a observados directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x y documentar lo encontrado.

Aislamiento y crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo e infusiones

Toma de muestras

Con ayuda de tijeras y bolsas de plástico limpias, se colectaron hojas y tallos de dos árboles de aguacate 'Duke 7', un Injerto de 'Libres 8' y un portainjerto 'Tochimilco 7', para obtener una muestra compuesta de cada árbol, los cuales se mantienen en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo y presentaban síntomas de moteado clorótico de hojas.

Desinfección de muestras

Se hicieron pequeños cortes de las muestras empleando tijeras, pinzas y agujas estériles, para posteriormente desinfectarlos. Primero se lavaron con agua del grifo, luego se limpiaron con sanitas y alcohol etílico al 70 %, posteriormente se realizaron tres lavados en cajas Petri; el primero con una solución desinfectante a base de 16.6 mL de cloro y 100 mL de agua destilada por 30 segundos, los últimos dos fueron únicamente con agua destilada, cada uno por 30 s y finalmente se dejaron secar sobre sanitas.

Crecimiento en medios de cultivo

Preparación de medio de cultivo agar sangre

En un matraz Erlenmeyer de 1 L se disolvieron 20 g de base para agar sangre (DIFCO ®) en 500 mL de agua destilada, se selló con algodón estéril para proceder a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C, es decir, hasta que el calor fuera soportable en el dorso de la mano. Posteriormente con una pipeta estéril se agregaron 15 mL de sangre borrego, la cual fue obtenida previamente directamente del animal, utilizando agujas vacutainer y tubos BD Vacutainer con EDTA K2 que impiden la coagulación de la sangre, se agitó en forma suave por rotación con el fin de obtener una buena mezcla y evitar la formación de burbujas, hasta que se obtuvo un color rojo cereza homogéneo. Para prevenir la contaminación del medio, bajo condiciones asépticas se repartió el contenido en cajas Petri y tubos de ensayo estériles, se dejaron solidificar, se etiquetaron y se controló su esterilidad en incubadora a 24.5 °C, por 24 h.

Preparación de medio de cultivo agar nutritivo sangre

Se disolvieron 11.5 g de agar nutritivo (BD Bioxon ®) en un matraz de 1 L que contenía 500 mL de agua destilada, se selló con algodón estéril para proceder a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C, es decir, hasta que el calor fuera soportable en el dorso de la mano. Posteriormente con una pipeta estéril se agregaron 15 mL de sangre borrego, la cual fue obtenida previamente directamente del animal, utilizando agujas vacutainer y tubos BD Vacutainer con EDTA K2 que impiden la coagulación de la sangre, se agitó en forma suave por rotación con el fin de obtener una buena mezcla y evitar la formación de burbujas, para prevenir la contaminación del medio, bajo condiciones asépticas se repartió el contenido en cajas Petri y tubos de ensayo estériles, se dejaron solidificar, se etiquetaron y se controló su esterilidad en incubadora a 24.5 °C, por 24 h.

Preparación de medio de cultivo agar avena

En un vaso de precipitado con 250 mL de agua destilada se remojaron 30 g de avena durante 24 h y después se hirvió durante 30 min. Posteriormente se filtró a través de una manta de cielo, y para clarificar la solución colada, se centrifugó

durante 20 minutos a 3000 r.p.m., luego se decantó y se juntó el líquido sobrenadante. En un matraz de 1 L con 300 mL de agua destilada, se disolvieron 6 g de agar y 1 g de levadura, luego se añadió la infusión de avena centrifugada, se mezcló bien y posteriormente se aforó con agua destilada a 500 mL, se selló con algodón estéril para proceder a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C, es decir, hasta que el calor fuera soportable en el dorso de la mano. Para prevenir la contaminación del medio, bajo condiciones asépticas se repartió el contenido en cajas Petri y tubos de ensayo estériles, se dejaron solidificar, se etiquetaron y se controló su esterilidad en incubadora a 24.5 °C, por 24 h.

Siembra en los medios de cultivo

Todas las siembras se realizaron en un cuarto estéril y utilizando mecheros para evitar la contaminación. Primero, en dos cajas petri con medio de cultivo agar sangre, dos con medio de cultivo agar sangre nutritivo y dos con medio de cultivo agar avena, se coloraron muestras de vena central y peciolo con pinzas esterilizadas y flameadas en los mecheros, las cajas se etiquetaron y una caja de cada medio se colocó a temperatura ambiente a 20 °C y las otras en incubadora a 24.5 °C.

Después, en un tubo de ensayo se elaboró una suspensión con agua destilada estéril y muestras de vena central y peciolo de hojas con moteado clorótico, la cual se agitó y se dejó reposar por 15 min. De igual manera, con bolsas estériles y un mazo de mortero se hizo un macerado con las muestras y agua destilada estéril. Posteriormente ambas preparaciones se sembraron por medio de estrías en dos cajas petri con medio de cultivo agar sangre, dos con medio de cultivo agar sangre nutritivo y dos con medio de cultivo agar avena, respectivamente, esto utilizando un asa bacteriana flameada en los mecheros, las cajas se etiquetaron y una caja de cada medio se colocó a temperatura ambiente a 20 °C y las otras en incubadora a 24.5 °C.

La suspensión y macerados empleados anteriormente se utilizaron para sembrar los tubos de ensayo, con una pipeta estéril se transfirió 1 mL a dos tubos de

ensayo con medio de cultivo agar sangre, dos con medio de cultivo agar sangre nutritivo y dos con medio de cultivo agar avena, respectivamente, se etiquetaron y un tubo de cada medio se colocó a temperatura ambiente a 20 °C y los otros en incubadora a 24.5 °C.

En total se obtuvieron 36 medios de cultivo, de los cuales 18 estuvieron en temperatura ambiente y 18 en incubadora (Cuadro 1). Todos los medios fueron revisados a los dos y seis días, y se documentó lo observado.

Cuadro 1. Disposición de los medios de cultivo sembrados para el crecimiento de protozoarios.

	Medio de cultivo en incubadora	Medio de cultivo en temperatura ambiente
Cajas Petri	Agar sangre, estrías, suspension	Agar sangre, estrías, suspensión
	Agar nutritivo sangre, estrías, suspensión	Agar nutritivo sangre, estrías, suspensión
	Agar avena, estrías, suspension	Agar avena, estrías, suspensión
	Agar sangre, estrías, macerado	Agar sangre, estrías, macerado
	Agar nutritivo sangre, estrías, macerado	Agar nutritivo sangre, estrías, macerado
	Agar avena, estrías, macerado	Agar avena, estrías, macerado
	Agar sangre, segmentos, suspension	Agar sangre, segmentos, suspensión
	Agar nutritivo sangre, segmentos, suspensión	Agar nutritivo sangre, segmentos, suspensión
	Agar avena, segmentos, suspension	Agar avena, segmentos, suspensión
	Agar sangre, segmentos, macerado	Agar sangre, segmentos, macerado
	Agar nutritivo sangre, segmentos, macerado	Agar nutritivo sangre, segmentos, macerado
	Agar avena, segmentos, macerado	Agar avena, segmentos, macerado
Tubos de ensayo	Agar sangre, suspension	Agar sangre, suspensión
	Agar nutritivo sangre, suspension	Agar nutritivo sangre, suspensión
	Agar avena, suspension	Agar avena, suspensión
	Agar sangre, macerado	Agar sangre, macerado
	Agar nutritivo sangre, macerado	Agar nutritivo sangre, macerado
	Agar avena, macerado	Agar avena, macerado

Crecimiento en infusiones

Preparación de infusiones

Las infusiones fueron a base de arroz, chícharo, trigo, maíz y nixtamal, y se elaboraron utilizando una cámara de flujo laminar y lámparas de alcohol, para prevenir su contaminación. Para cada tipo de grano en un matraz de 50 mL se agregaron 30 mL de agua destilada estéril con seis a diez semillas, respectivamente, se pusieron a hervir por cinco minutos, se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C, es decir, hasta que el calor fuera soportable en el dorso de la mano, luego se sellaron con algodón, se etiquetaron y se dejaron reposar por 24 h; transcurrido el tiempo el sobrenadante de cada infusión se transfirió a tubos Eppendorf de 0.2 mL.

Preparación de las suspensiones con cortes longitudinales y transversales

Bajo condiciones asépticas se realizaron cortes longitudinales (Figura 3) y transversales (Figura 4) de los peciolo de las hojas utilizando una aguja de disección y una navaja previamente desinfectada, esto con la idea de exponer y aislar al xilema. Cada tipo de corte fue transferido a tubos Eppendorf de 0.2 mL que contenían agua destilada estéril, se etiquetaron y se dejaron reposar por ocho y quince días, obteniendo un total de cuatro tubos con suspensiones, se etiquetaron y una vez cumplidos los lapsos de tiempo, y con la micropipeta se trasladó el sobrenadante de cada tubo a tubos diferentes.

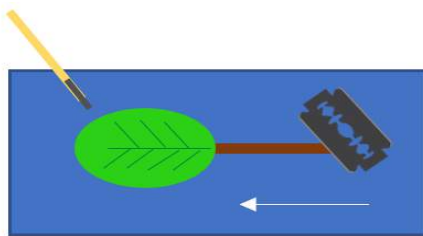


Figura 3. Corte longitudinal del peciolo de la hoja de aguacate.

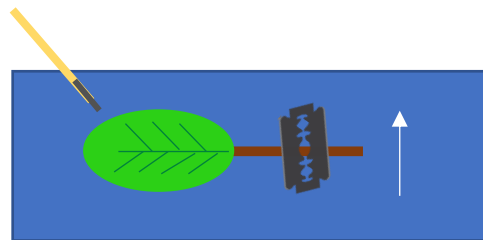


Figura 4. Corte transversal del peciolo de la hoja de aguacate.

Observación de las suspensiones con cortes longitudinales y transversales

Transcurridos los 8 y 15 días de cada suspensión, se realizó una preparación para analizarlas directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x, para ello con la micropipeta se colocó una gota de suspensión en un portaobjetos, se selló con un cubreobjetos y se procedió a examinar y documentar lo observado.

Transferencia de las suspensiones a las infusiones

En tubos Eppendorf de 0.2 mL se colocaron 40 μ L de suspensión y 160 μ L de infusión previamente descritos, teniendo así cinco tubos por cada tipo de corte e infusión, obteniendo así un total de diez tubos con suspensión de reposo de 8 días y diez tubos con suspensión de reposo de 15 días, el orden se indica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Disposición de las preparaciones de infusiones con cortes longitudinales y transversales de hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico para crecimiento de protozoarios.

Preparaciones de 8 días	Preparaciones de 15 días
Infusión de arroz, corte transversal	Infusión de arroz, corte transversal
Infusión de chícharo, corte transversal	Infusión de chícharo, corte transversal
Infusión de trigo, corte transversal	Infusión de trigo, corte transversal
Infusión de maíz, corte transversal	Infusión de maíz, corte transversal
Infusión de nixtamal, corte transversal	Infusión de nixtamal, corte transversal
Infusión de arroz, corte longitudinal	Infusión de arroz, corte longitudinal
Infusión de chícharo, corte longitudinal	Infusión de chícharo, corte longitudinal
Infusión de trigo, corte longitudinal	Infusión de trigo, corte longitudinal
Infusión de maíz, corte longitudinal	Infusión de maíz, corte longitudinal
Infusión de nixtamal, corte longitudinal	Infusión de nixtamal, corte longitudinal

Observación de las infusiones con suspensiones

Transcurridas 24 h, de cada tubo se realizó una preparación para analizarlas directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x, para ello con la micropipeta se colocó una gota en un portaobjetos, se selló con un cubreobjetos y se procedió a analizar y documentar lo obtenido.

Repetición de la preparación de infusiones

Se decidió repetir el crecimiento en infusiones, esta vez realizando preparaciones con un macerado y añadiendo una infusión de avena, por lo que las infusiones elaboradas fueron a base de arroz, chícharo, trigo, maíz, nixtamal y avena.

Preparación del macerado

Las muestras de hojas y tallos previamente colectados se dispusieron en bolsas de plástico estériles que contenían agua destilada y se maceraron ocupando un mazo de mortero, todo bajo condiciones asépticas. En tubos de ensayo de plástico estériles y con tapa rosca de 15 ml se realizaron dos preparaciones, una con el macerado puro y otra con el macerado filtrado mediante manta de cielo, ambas se dejaron reposar por 30 min.

Observación del macerado

Se realizaron preparaciones por siete días de las suspensiones filtradas y no filtradas del macerado, utilizando la micropipeta se colocaron 10 μ L en un portaobjetos y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos con el cuidado de no generar burbujas para luego observarlos directamente bajo microscopio.

Transferencia del macerado a las infusiones

Se hicieron preparaciones para revisarlas a los 8 y 12 días, en tubos Eppendorf de 0.2 mL se colocaron 40 μ L de preparación y 160 μ L de infusión previamente descritos, obteniendo seis tubos por cada tipo de macerado e infusión, alcanzando un total de 24 tubos para análisis como se indica en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Disposición de las preparaciones de infusiones con macerados para el crecimiento de protozoarios.

Preparaciones de 8 días	Preparaciones de 12 días
Infusión de avena, macerado sin filtrar	Infusión de avena, macerado sin filtrar
Infusión de arroz, macerado sin filtrar	Infusión de arroz, macerado sin filtrar
Infusión de chícharo, macerado sin filtrar	Infusión de chícharo, macerado sin filtrar
Infusión de trigo, macerado sin filtrar	Infusión de trigo, macerado sin filtrar
Infusión de maíz, macerado sin filtrar	Infusión de maíz, macerado sin filtrar
Infusión de nixtamal, macerado sin filtrar	Infusión de nixtamal, macerado sin filtrar
Infusión de avena, macerado filtrado	Infusión de avena, macerado filtrado
Infusión de arroz, macerado filtrado	Infusión de arroz, macerado filtrado
Infusión de chícharo, macerado filtrado	Infusión de chícharo, macerado filtrado
Infusión de trigo, macerado filtrado	Infusión de trigo, macerado filtrado
Infusión de maíz, macerado filtrado	Infusión de maíz, macerado filtrado
Infusión de nixtamal, macerado filtrado	Infusión de nixtamal, macerado filtrado

Observación de las infusiones con macerado

Transcurridos los 8 y 12 días de cada preparación, se realizó un montaje para observarlas directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x, para ello con la micropipeta se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos, se selló con un cubreobjetos y se procedió a examinar, y documentar lo encontrado.

Incremento de microorganismos en infusiones de arroz y chícharo

Se decidió probar nuevamente el crecimiento de los organismos en las infusiones de chícharo y arroz, por lo que una vez preparadas las infusiones con estos granos, se realizó el macerado de las muestras y en tubos Eppendorf de 0.2 mL se colocaron 40 μ L de preparación y 160 μ L de infusión previamente descritos, teniendo así dos tubos por cada tipo de macerado e infusión, obteniendo un total de cuatro tubos para su análisis, el orden se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Disposición de las preparaciones de infusiones de chícharo y arroz con cortes longitudinales y transversales para el crecimiento de protozoarios.

Preparación
Chícharo, macerado sin filtrar
Chícharo, macerado filtrado
Arroz, macerado sin filtrar
Arroz, macerado filtrado

Postulados de Koch

Aislamiento y crecimiento de los microorganismos

A partir de plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico se realizaron observaciones mediante cortes y bajo el microscopio electrónico, parte de los tejidos afectados para conocer si se trataba de la incidencia de protozoarios. Posteriormente bajo condiciones asépticas se hizo un macerado de tallo y hojas en bolsas estériles y con un mazo de mortero, posteriormente se prepararon infusiones de chícharo y arroz, y en tubos de ensayo de 15 mL estériles y con tapa rosca se colocaron 7 mL de la infusión y 5 mL del macerado, finalmente se dejaron transcurrir seis días para el crecimiento de los organismos.

Transcurridos los seis días de las infusiones se realizó nuevamente el macerado de tallos y hojas, el cual fue transferido directamente a tubos de ensayo estériles.

Pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate

Se utilizaron plantas de aguacate criollo mexicano de seis meses de edad, se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos, organismos en infusión de arroz, organismos en infusión de chícharo y organismos en macerado, obtenidos previamente, con diez repeticiones y un testigo negativo con tratamiento de agua destilada estéril, con una distribución que se muestra en la Figura 5. Las plantas se dispusieron en una cama cubierta de plástico dentro de un invernadero, previamente desinfectada con sales cuaternarias Anibac®, se regaron cada tercer día y se fertilizaron semanalmente

con 1 g de Raizal ®, 1 mL de Superstarter (AGCEM CROP NUTRITION) y 2 g de Aminocel 500 ®.

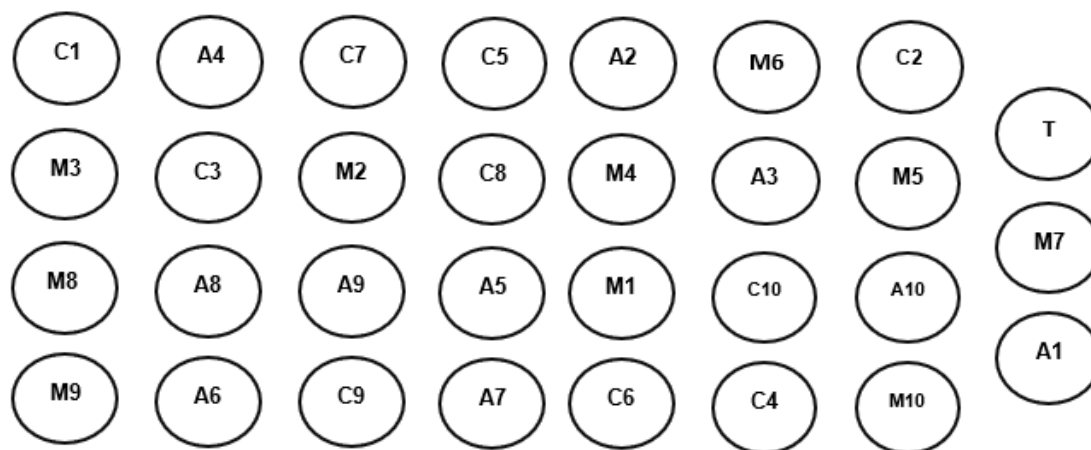


Figura 5. Disposición de los tratamientos aplicados para las pruebas de patogenicidad en aguacate. A. Arroz; C. Chícharo; M. Macerado; T. Testigo.

Inoculación de plantas de aguacate

La inoculación se hizo realizando un corte con una navaja previamente desinfectada a 5 cm de altura a partir de la base del tallo, luego con ayuda de una jeringa se tomó 1 mL de tratamiento y se introdujo en la incisión, por último, se selló con Parafilm. También se hicieron inoculaciones directamente en el peciolo, venas y hojas, mediante inyecciones que contenían a los tratamientos.

Las plantas se revisaron dos veces por semana durante 28 días para revisar manifestaciones de síntomas de clorosis o amarillamiento; todo lo observado fue documentado y registrado.

Repetición de pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate

Se decidió repetir la prueba de patogenicidad en plantas de aguacate de la raza Antillana de seis meses de edad con el tratamiento que presentó mayor cantidad de plantas con sintomatología, lo cual se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar donde se incluyeron el tratamiento de organismos en infusión de arroz y organismos en macerado, cada uno con diez repeticiones y

dos testigos negativos con tratamiento de agua destilada estéril. El aislamiento de microorganismos fue siguiendo la metodología descrita anteriormente, sin embargo, para la inoculación de las plantas se realizaron cambios.

Para conocer el modo más efectivo que los organismos dañan a las plantas, se hicieron dos tipos de inoculaciones; el primero consistió en realizar un corte con una navaja previamente desinfectada a 5 cm de altura a partir de la base del tallo, luego con ayuda de una jeringa se tomó 1 mL de tratamiento y se introdujo en la incisión, por último se selló con Parafilm, para el segundo se hicieron inoculaciones directamente en el peciolo, venas y hojas, mediante inyecciones que contenían a los tratamientos. Cada tipo de inoculación fue realizado en cinco de las diez plantas, con una distribución que se muestra en la Figura 6.

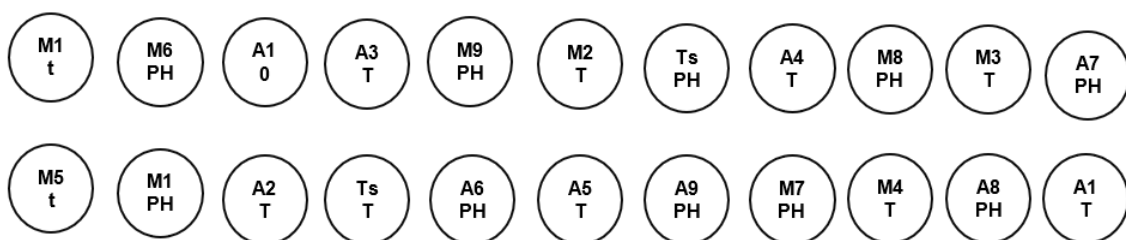


Figura 6. Disposición de tratamientos de infusión de arroz y macerado de tallos y hojas aplicados para las pruebas de patogenicidad en aguacate. A. Arroz; M. Macerado; Ts. Testigo; T. Inyección en el corte del tallo; PH. Inyecciones en peciolo y hojas.

Se observaron manifestaciones de síntomas de clorosis o amarillamiento; todo lo observado fue documentado y registrado.

Reaislamiento y observación de microorganismos

Transcurridos los días de revisión, se seleccionaron los dos testigos y tres plantas al azar por tratamiento que reflejaron sintomatología, posteriormente fueron llevadas al laboratorio para que en condiciones asépticas se pudieran realizar un macerado y cortes longitudinales en el peciolo y vena central de las hojas afectadas, esto con el fin de analizarlos directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x, después se documentó lo obtenido.

Prueba de nematodos en zanahoria

Se seleccionaron zanahorias limpias que no estuvieran agrietadas ni muy gruesas, las cuales pasaron por tres lavados, el primero con agua de la llave, el segundo con una solución desinfectante a base de 16.6 mL de cloro y 100 mL de agua, y el tercero con agua destilada estéril. Posteriormente, bajo condiciones asépticas y en la cámara de flujo laminar, empleando una navaja previamente desinfectada, se cortaron dos discos de zanahoria de 0.8 cm de grosor, luego se esterilizaron las rodajas obtenidas, flameándolas con pinzas en el mechero para posteriormente rociarles alcohol etílico al 70 %. Cada disco de zanahoria se dispuso sobre una cámara húmeda en cajas Petri, luego se inocularon con 100 µL de macerado de tallos y hojas que presentaban moteado clorótico, el cual se dispuso sobre la superficie de cada rodaja empleando una micropipeta, las cajas se sellaron con Parafilm y se etiquetaron. Una de las rodajas se colocó en incubadora a 24.5 °C y la otra en temperatura ambiente a 20 °C, ambas cajas se revisaron periódicamente por tres días.

Determinación de la presencia o ausencia de *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter solanacearum*

Se mandaron a analizar a un laboratorio de fitosanidad certificado (GISENALabs) 50 hojas de una muestra compuesta de dos árboles de aguacate 'Duke 7', uno de injerto de 'Libres 8' y portainjerto 'Tochimilco 7' con síntomas de moteado clorótico para determinar la asociación de las variantes *asiaticus*, *americanus* y *solanacearum* de *Ca. Liberibacter* con la enfermedad bajo estudio. El tipo de análisis fue detección de bacterias y fitoplasmas fitopatógenos por PCR y sus variantes en productos y subproductos vegetales, siguiendo el método interno MPT/GIS/F03 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Q PCR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación de microorganismos

Extracción de savia

Las muestras de savia de tallos y hojas sin síntomas no presentaron presencia ni movimiento de microorganismos, sin embargo, en una de las muestras se percibió parte de la estructura de un nematodo (Figura 7), esto puede ser posible debido a que se han reportado alteraciones por la disposición de este tipo de organismos en floema y xilema, tejidos conductores encargados del transporte de savia bruta y elaborada (Bonilla., 2013; Gómez, 2015).



Figura 7. Parte de la estructura de un nematodo observado en una muestra de savia de tallos y hojas de aguacate sin síntomas de moteado clorótico.

Las observaciones de savia de tallos y hojas con síntomas presentaron pequeñas formas alargadas y ovaladas con gran movimiento, no obstante, en poca cantidad (Figura 8), por lo que se especula que se trate de un tipo de protozoos, lo que resulta probable ya que protozoos flagelados de plantas se han encontrado como causantes de diversas enfermedades en el floema y xilema de cultivos de interés económico, además, en Colombia una especie fue reportada en savia de cocoteros con síntomas de marchites sorpresiva y en Brasil con síntomas de amarillamiento de las hojas más viejas (Paz, 2000).

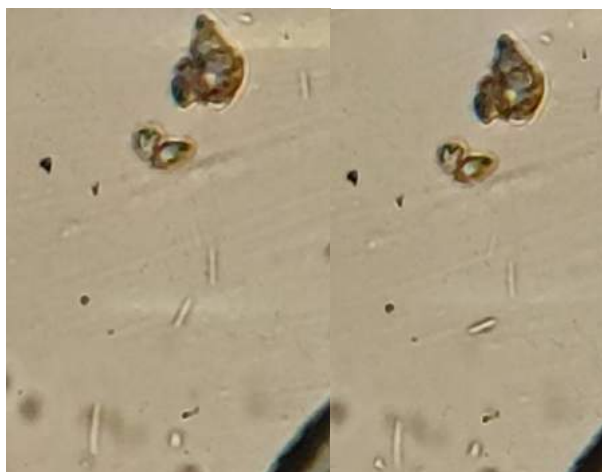


Figura 8. Microorganismos alargados y ovalados observados en muestras de savia de tallos y hojas con síntomas de moteado clorótico.

Preparación de montajes para observación bajo microscopio

Se comprobó la presencia de microorganismos en los vasos de xilema, donde se distinguieron cuerpos hialinos de forma alargada y circular, en gran cantidad y con bastante movimiento (Figura 9), descripción que coincide con características indicadas en la literatura, referidos con forma esférica, ovalada, alargada, esférica u otra, formando colonias con pocos o numerosos individuos y además se menciona que cuando se estudian en vivo bajo un microscopio óptico se puede ver que son extremadamente activos; su locomoción puede darse por flagelos, pseudópodos, cilios o movimientos de la propia célula. En cortes histológicos de inflorescencias de cocotero con Hartrot también se han observado de esta manera a tripanosomátidos, una especie de protozoarios encontrados en el floema (Dollet & Lopez, 1978; Dollet, 1984; Álvarez, 2006).



Figura 9. Microorganismos presentes en cortes longitudinales de peciolo y vena central de hojas con síntomas de moteado clorótico en aguacate.

En este contexto, en un estudio de *Euphorbia lasiocarpa* en Ecuador se encontró una infección por protozoos flagelados en los tubos laticíferos, vasos del xilema y espacios intercelulares del parénquima, y se cree que estos flagelados pueden ser responsables de inducir síntomas como amarillamiento en plantas, al igual que algunas bacterias limitadas por el xilema y similares a las rickettsias (Dollet et al., 1983).

Tinción de cortes

Las tinciones de los cortes con los colorantes verde rápido y verde de metileno no fueron satisfactorias, pues únicamente se tiñeron las paredes de los vasos del xilema y no la estructura de los protozoarios, además se redujo el movimiento de los mismos (Figura 10). La mayoría de los estudios sobre protozoos son en humanos, animales, ríos, cascadas y aguas residuales, para los cuales se cuentan con guías para su identificación, que incluyen técnicas especiales para la preservación y/o tinción (Luna-Pabello, 2006), sin embargo, se tiene poca información para protozoarios parásitos de plantas, por lo que es conveniente seguir experimentando y adaptando procedimientos que permitan la tinción de sus estructuras.

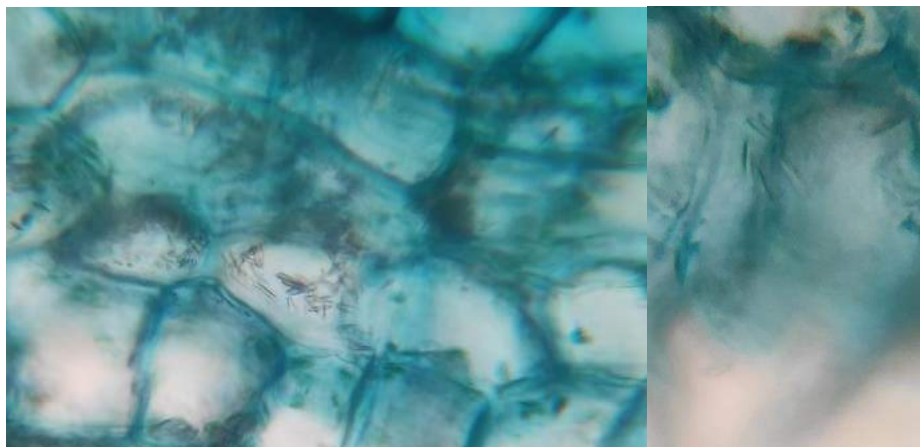


Figura 10. Tinción con verde rápido y verde de metileno de los cortes longitudinales de peciolo de hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico.

Aislamiento y crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo e infusiones

Crecimiento en medios de cultivo

A los dos días de revisión los medios en incubadora que fueron sembrados con la suspensión y el macerado en agar sangre tuvieron una bacteria saprófita (Figuras 11 y 12) y el medio de cultivo de agar avena con segmentos de hoja que se encontraba en temperatura ambiente presentó al hongo *Fusarium* (Figura 13); a los seis días de revisión se encontraron a los hongos *Aspergillus* (Figura 14) y *Fusicladium* (Figura 15) en el medio de cultivo agar sangre en incubadora. No obstante, no fue posible el crecimiento de los protozoarios bajo sospecha en ninguno de los medios de cultivo, lo cual confirma la dificultad de su cultivo *in vitro*. Se han realizado numerosos intentos para su cultivo, sin buen éxito, obteniendo resultados desalentadores puesto que solo se ha logrado mantenerlos vivos en un medio de cultivo primario, generalmente con escasa reproducción (Ruiz, 1961; Dollet, 1984).



Figura 11. Bacteria saprófita presente a los dos días de revisión en medio de cultivo agar sangre sembrado con la suspensión y colocado en incubadora.

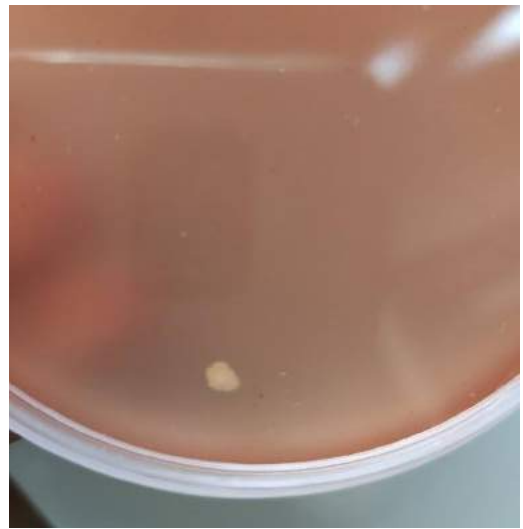


Figura 12. Bacteria saprófita presente a los dos días de revisión en medio de cultivo agar sangre sembrado con el macerado y colocado en incubadora.



Figura 13. *Fusarium* presente a los dos días de revisión en medio de cultivo agar avena con segmentos de hoja y colocado en temperatura ambiente.

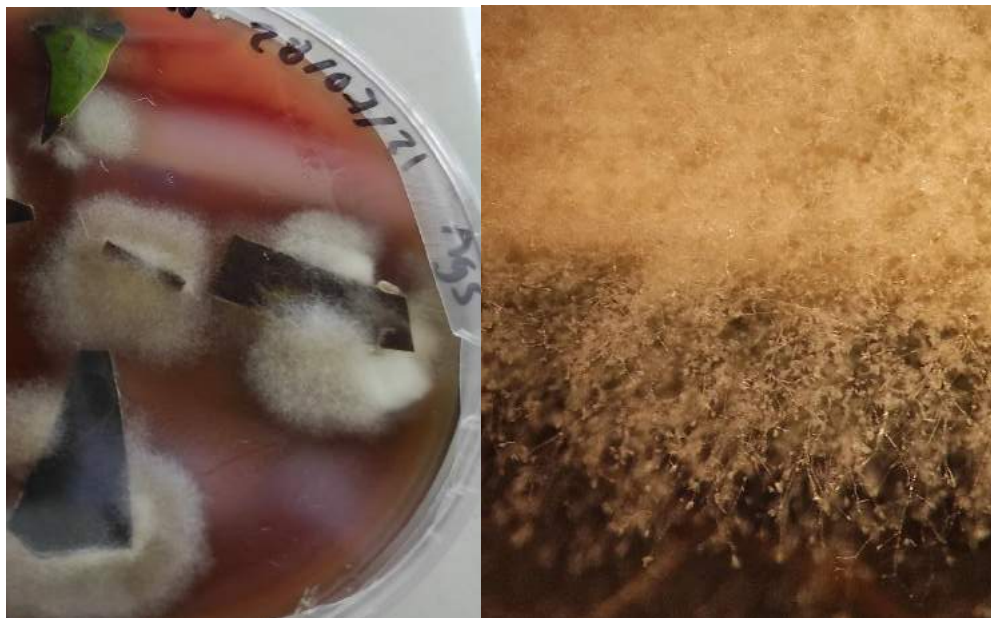


Figura 14. *Aspergillus* presente a los seis días de revisión en medio de cultivo agar sangre con segmentos de hoja y colocado en incubadora.

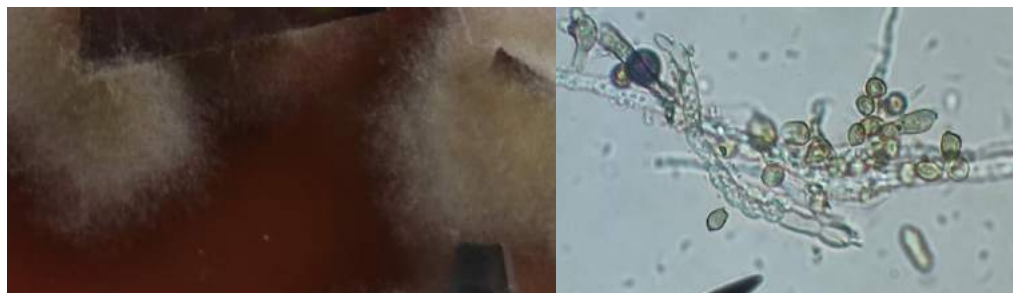


Figura 15. *Fusicladium* presente a los seis días de revisión en medio de cultivo agar sangre con segmentos de hoja y colocado en incubadora.

Crecimiento en infusiones

Observación de las suspensiones con cortes longitudinales y transversales

Solamente en la suspensión con cortes longitudinales se observaron pequeños crecimientos de protozoarios, aislados, de baja población y con movimiento muy tenue, sin embargo, no fue posible distinguirlos con claridad (Figura 16).



Figura 16. Microorganismos presentes en la suspensión que contenía cortes longitudinales de peciolo de hoja de aguacate.

Observación de las infusiones con suspensiones.

Las infusiones de grano de maíz (Figura 17) y nixtamal (Figura 18) con suspensión proveniente de cortes transversales y la infusión de chícharo (Figura 19) con suspensión proveniente de cortes longitudinales, fueron las únicas que presentaron algún crecimiento de protozoarios, sin embargo, eran demasiado aislados y pequeños, encontrándose juntos dos a tres microorganismos y un movimiento casi imperceptible.



Figura 17. Microorganismos presentes en infusión de maíz con suspensión de cortes transversales de peciolo de hoja de aguacate.



Figura 18. Microorganismos presentes en infusión de nixtamal con suspensión de cortes transversales de peciolo de hoja de aguacate.



Figura 19. Microorganismos presentes en infusión de chícharo con suspensión de cortes longitudinales de peciolo de hojas de aguacate.

Se han podido obtener cultivos mono específicos de protozoarios ciliados de vida libre a partir de muestras de agua de lagos mediante el uso de infusiones de granos de trigo o de arroz, paja, alfalfa, musgo, etc. como estrategia de alimentación sencilla en condiciones de laboratorio y se ha encontrado el éxito de la alimentación con una infusión de hojuelas de avena para promover la proliferación microbiana (Marín et al., 2017), por lo que se decidió repetir los crecimientos agregando dicha infusión y además realizando un macerado de peciolo y hojas en lugar de la suspensión de cortes longitudinales y transversales.

Observación de las infusiones con macerado

Transcurridos 8 días después de la transferencia, los crecimientos en la infusión de avena no fueron exitosos, únicamente las muestras filtradas y no filtradas en chícharo (Figura 20) y arroz (Figura 21), fueron las que tuvieron presencia de los protozoarios, y a diferencia de las infusiones con suspensiones, estos crecimientos fueron encontrados en mayor cantidad, continuidad y con amplio movimiento, sin embargo, al hacer la revisión a los 12 días ya no se encontró ninguna población ni movimiento, esto puede deberse a una muerte por disminución de nutrientes y nuevamente a la dificultad de mantenerlos vivos y aumentar su reproducción. Aunado a ello, se ha descrito variación en el movimiento de estos microorganismos, mostrando en la mayoría de los casos un movimiento lento pero que puede llegar a ser algunas veces bastante activo (Ruiz, 1961).



Figura 20. Microorganismos presentes en infusión de chícharo con macerado.



Figura 21. Microorganismos presentes en infusión de arroz con macerado.

Observación del macerado

Se encontró gran cantidad de protozoarios en las muestras de macerado durante los siete días de observación, todos los crecimientos con amplia actividad, pero un tanto aislados (Figura 22).



Figura 22. Microorganismos presentes en la preparación de macerado.

Incremento de microorganismos en infusiones de arroz y chícharo

El crecimiento en ambas infusiones fue exitoso, observando la población más grande y con gran actividad a los seis días (Figuras 23 y 24), después de eso se tuvo una disminución considerable y el principio de formación de hongos.



Figura 23. Microorganismos presentes en la infusión de arroz el primer y sexto día.



Figura 24. Microorganismos presentes en la infusión de chícharo el primer y sexto día.

Postulados de Koch

Pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate

Transcurrida una semana del establecimiento de las plantas inoculadas, se comenzaron a observar síntomas de clorosis intervenal en las hojas, presentando un patrón desuniforme, manchas pequeñas, circulares y otras más de forma irregular (Figura 25). Las hojas nuevas comenzaron a presentar necrosis y algunas finalmente se secaron completamente (Figura 26). Estos síntomas coinciden con un trabajo realizado por Franchini (1923) sobre el género *Phytomonas* en *Arunja angustifolia* reportado por Dollet (1984), en dónde mencionó que se presentaron hojas pálidas y amarillentas, caída de hojas y muerte rápida, además, descubrió flagelados en la planta enferma, mientras que otras plantas cercanas de aspecto saludable de la misma especie estaban libres de ellos. El testigo se mantuvo sin síntomas de moteado clorótico durante todas las evaluaciones (Figura 27).



Figura 25. Síntomas de clorosis intervenal con patrón desuniforme, manchas pequeñas y circulares en hojas de aguacate inoculadas con protozoarios.



Figura 26. Síntomas de necrosis en hojas nuevas de aguacate inoculadas con protozoarios.



Figura 27. Testigo inoculado con agua destilada sin presencia de síntomas.

La principal manifestación de síntomas se dio entre los siete y dieciocho días posteriores a la inoculación de las plantas de aguacate, existiendo diferencias en la patogenicidad producida entre tratamientos, siendo el de macerado el que provocó síntomas en un mayor número plantas, seguido del tratamiento de arroz y finalmente el de chícharo. De esta manera, la prueba de patogenicidad en plantas de aguacate fue exitosa, no obstante, no se puede asegurar que este aspecto patológico se deba sólo a la presencia de protozoos, debido a que en la naturaleza, las infecciones mixtas son frecuentes (Dollet, 1984).

Repetición de pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate

Transcurrida una semana y media del establecimiento de las plantas inoculadas, se comenzaron a presentar síntomas de clorosis de forma irregular en las hojas maduras, así como necrosis en las zonas de la hoja donde se realizó la inyección y también se observó clorosis intervenal (Figura 28). Las hojas y brotes nuevos se fueron secando a lo largo de las evaluaciones y también presentaron clorosis (Figura 29); una de las plantas se secó completamente y cuando tuvo brotes nuevos uno de ellos se secó de la punta (Figura 30). Los testigos se mantuvieron sin síntomas, durante todas las evaluaciones, sin clorosis en las hojas y con los brotes y hojas nuevas normales (Figura 31 y Figura 32).



Figura 28. Síntomas de necrosis, clorosis de forma irregular y clorosis intervenal en hojas maduras de plantas aguacate inoculadas con protozoarios.



Figura 29. Hojas y brotes nuevos secos y con clorosis en plantas aguacate inoculadas con protozoarios.

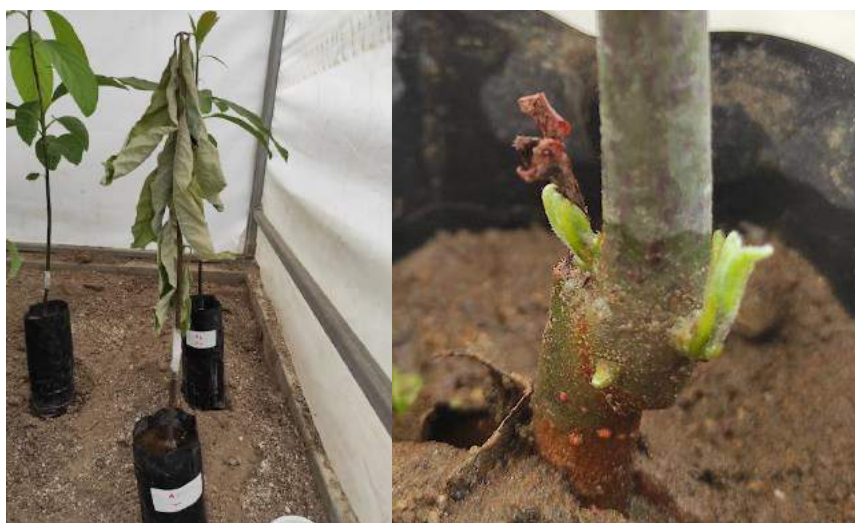


Figura 30. Planta inoculada con protozoarios completamente seca y uno de sus brotes nuevos con necrosis.



Figura 31. Testigo inoculado con agua destilada directamente en el tallo sin síntomas de clorosis y con los brotes y hojas nuevas normales.



Figura 32. Testigo inoculado con agua destilada mediante inyecciones en peciolo y hojas, sin síntomas de clorosis y con los brotes y hojas nuevas normales.

La principal manifestación de síntomas se dio entre los nueve y quince días posteriores a la inoculación de las plantas de aguacate, existiendo diferencias en la patogenicidad producida entre tratamientos, siendo el tratamiento de arroz inyectado al tallo, el que provocó síntomas en un mayor número de plantas, seguido del tratamiento de macerado inyectado al tallo. De tal forma que la prueba de patogenicidad es más eficaz cuando se inocula directamente en el tallo.

Reaislamiento y observación de microorganismos

Al realizar los cortes de las plantas seleccionadas pertenecientes al tratamiento de infusión de arroz, se observó la presencia de los microorganismos descritos anteriormente, algunos de forma alargada y otros circular; en algunos vasos de xilema se mostraron en gran cantidad y con bastante movimiento, en otros se presenciaron menos adosados y un poco aislados (Figura 33), lo mismo ocurrió para el tratamiento de macerado, no obstante, se apreció una población inferior y en un número menor de vasos de xilema (Figura 34).

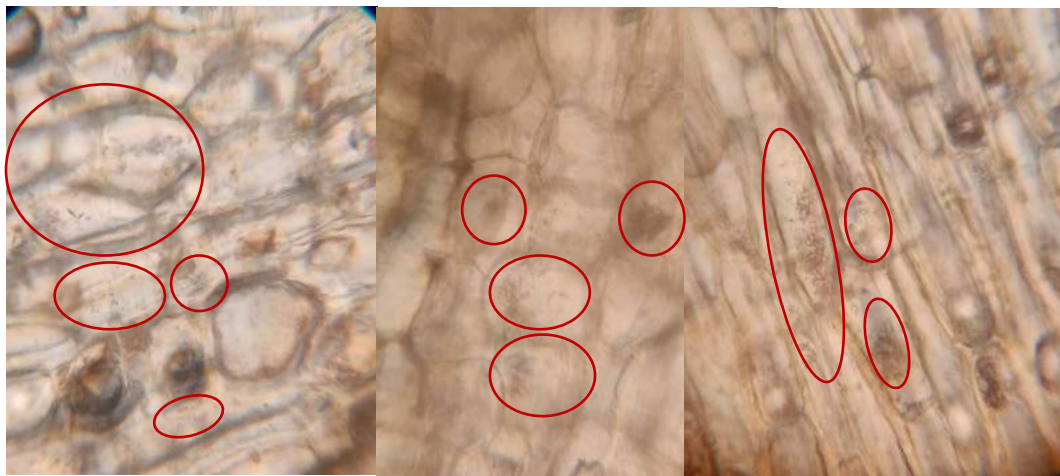


Figura 33. Microorganismos aislados de tejido de peciolo, hojas y tallos de plantas inoculadas con el tratamiento de infusión de arroz.



Figura 34. Microorganismos aislados de tejido de peciolo, hojas y tallos de plantas inoculadas con el tratamiento de macerado.

En los cortes realizados a los testigos inoculados con agua destilada los vasos de xilema lucieron sin poblaciones de protozoarios, sin embargo, se observó la presencia de algunos cristales y parte de la estructura del tejido conductor (Figuras 35 y 36).

En este contexto al observar al patógeno en plantas enfermas, al ser posible su aislamiento, obtención y crecimiento en infusiones, ser patogénico en plantas sanas y reaislado a partir del hospedador inoculado experimentalmente, se tiene el cumplimiento de los postulados de Koch, siendo un acierto importante de esta investigación, debido a que para algunas especies de protozoarios aún no se ha logrado el cumplimiento de estos postulados (Vickerman & Dollet 1992).

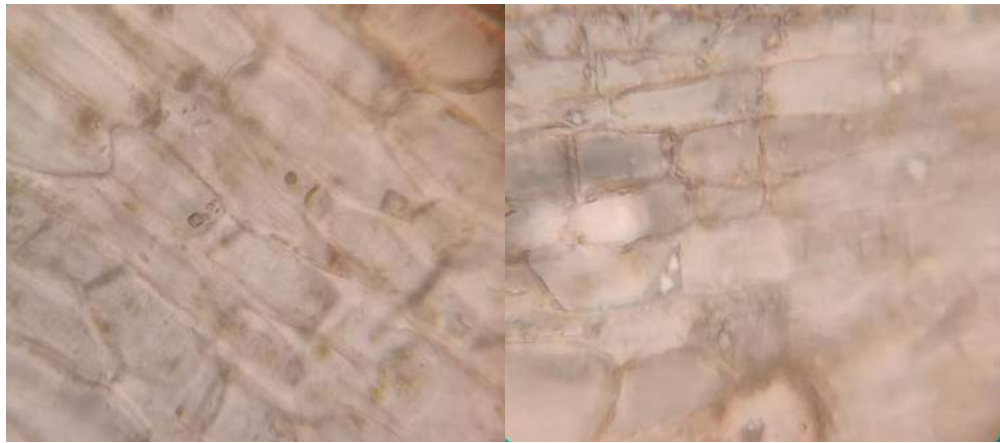


Figura 35. Vasos del xilema del testigo inoculado con agua destilada directamente en el tallo sin presencia de organismos.

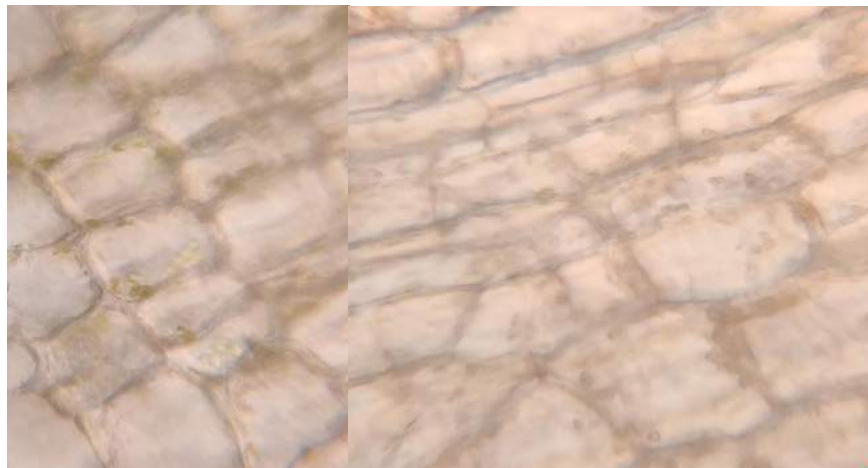


Figura 36. Vasos del xilema del testigo inoculado con agua destilada mediante inyecciones en peciolo y hojas sin presencia de organismos.

Prueba de nemátodos en zanahoria

La zanahoria ha resultado ser un medio adecuado para la multiplicación de nematodos, principalmente de especies migratorias, desde los pioneros en el uso de esta técnica se han ido realizando mejoras para obtener mayor longevidad del cultivo y un incremento de la tasa de multiplicación, sin embargo, durante los días de revisión las rodajas inoculadas no presentaron ninguna formación de callos o masas en la superficie (Figuras 37, 38 y 39), el área de la zanahoria fue suficiente tejido para su reproducción y alimentación, y al no tener crecimiento se indica que los nematodos presentes pueden ser de vida libre y no son los causantes del daño, ya que cuando se encuentran presentes se ha observado materia color blanco en la superficie de las zanahorias que refiere a un buen indicador del cultivo (Arevalo, 2017).

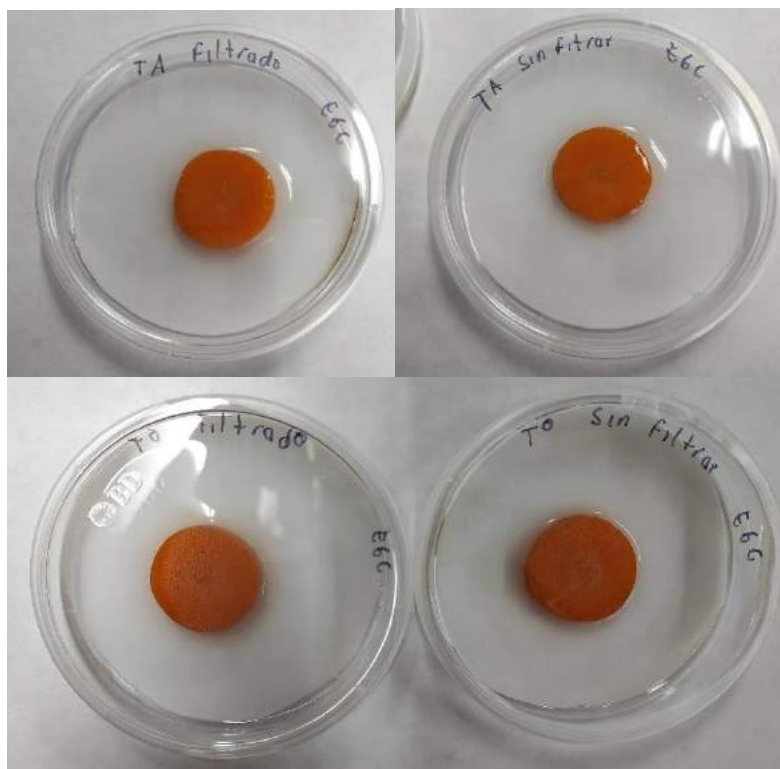


Figura 37. Rodajas de zanahoria en temperatura ambiente e incubadora 24 horas después de ser inoculadas con macerado de peciolo y hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico, sin presencia de callos ni masas de nematodos.

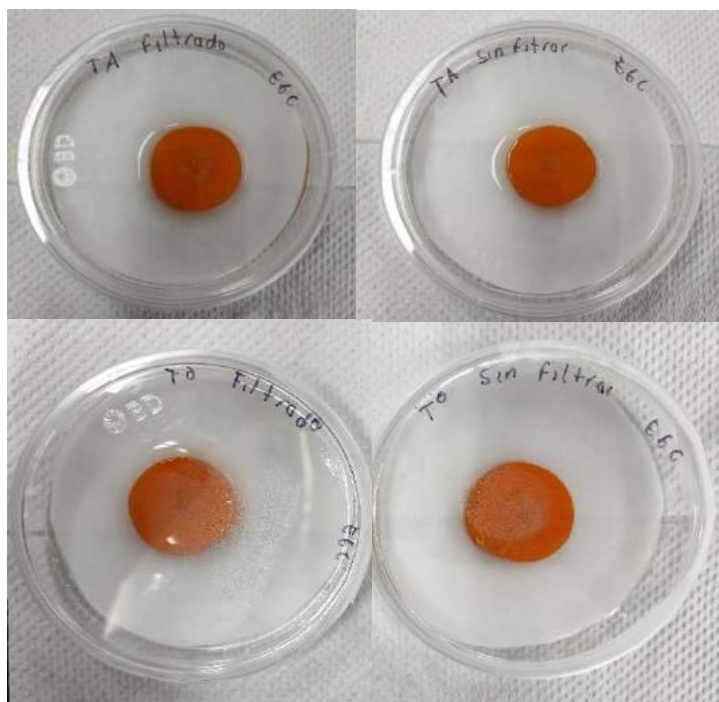


Figura 38. Rodajas de zanahoria en temperatura ambiente e incubadora 48 horas después de ser inoculadas con macerado de peciolo y hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico, sin presencia de callos ni masas de nematodos.



Figura 39. Rodajas de zanahoria en temperatura ambiente e incubadora 72 horas después de ser inoculadas con macerado de peciolo y hojas de aguacate con síntomas de moteado clorótico, sin presencia de callos ni masas de nematodos.

Determinación de la presencia o ausencia de *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter solanacearum*

En Guatemala se han presentado dificultades en el cultivo de aguacate desde el punto de vista fitosanitario, debido a la presencia de patógenos, vectores y plagas, encontrándose alertas fitosanitarias referentes a *Candidatus Liberibacter* comúnmente conocida como Huanglongbing o HLB, encontrándose como vector al psillido *Diaphorina citri*, para el cual se cuenta con poca investigación y desarrollo de diagnósticos más certeros mediante el método de PCR en tiempo real para su identificación, por lo que por su distribución y, por las asociaciones entre los cultivos de aguacate y cítricos, no se podía dejar de lado que en nuestro país se pudiera encontrar esta problemática o alarma, sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación fueron negativos, permitiendo descartar a las variantes *asiaticus*, *americanus* y *solanacearum* de *Ca. Liberibacter* como agentes causales del moteado clorótico de hojas de aguacate (Franco, 2014).

Dentro de la sintomatología del HLB se han observado principalmente manchas amarillentas con aspecto de moteado, similar al problema estudiado en esta investigación, dicha semejanza puede deberse a que esta expresión resulta de la obstrucción de los vasos cribosos del floema (Fogliata et al. 2014) y como se ha observado, los protozoarios se encuentran realizando este atasco en los vasos de xilema y probablemente limitando el transporte de nutrimentos o incluso consumiendo los mismos, que al igual que el floema es uno de los tejidos conductores esenciales para el desarrollo óptimo de las plantas.

CONCLUSIONES

Por su forma, movimiento y comportamiento, son protozoarios los microorganismos que causan el moteado clorótico de hojas en plantas de aguacate.

Es posible aislar protozoarios a través de un macerado de peciolo y hojas en agua destilada estéril, sin embargo, no es posible realizar su tinción con los colorantes verde rápido y verde de metileno.

No fue posible reproducir los microorganismos asociados a la enfermedad en medios de cultivo agar sangre, agar avena y agar nutritivo sangre, pero sí en infusiones de chícharo y arroz, alcanzando su máximo desarrollo a los seis días de su aislamiento y transferencia.

Es posible el cumplimiento de los protozoarios de Koch para los microorganismos asociados al moteado clorótico de hojas de aguacate.

No existe asociación entre alguna especie de nematodos y el moteado clorótico de hojas de aguacate y su sintomatología no es producida por las variantes *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* y *Ca. liberibacter solanacearum*.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, A. R. (2006). Los protozoos: características generales y su rol como agentes patógenos. *Ciencia Veterinaria*, 8(1), 62-71.
- Arevalo P., M. A. (2017). *Evaluación de la reproducción in vitro de Pratylenchus coffeae en zanahoria*. Tesis de doctorado, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Barroso, A., Díaz, A., García, V. & Altares, M. (1985). Deficiencias de Zn y Mn en los cultivos de aguacate de Tenerife, Islas Canarias. *Fruits*, 40(1):39-47.
- Bonilla, I. (2013). Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. In Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (Eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal* (2nd ed., pp. 103-122) Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Dollet, M., & Lopez, G. (1978). Etude sur l'association de protozoaires flagellés à la Marchitez sorpresiva du palmier à huile en Amérique du Sud. *Oléagineux*, 33(5), 209-217.
- Dollet, M. (1984). Plant diseases caused by flagellate protozoa (Phytomonas). *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 115-132.
- Dollet, M., Gargani, D., Cambrony, D., & Dzido, J. L. (1983). Observations of flagellate protozoa (*Phytomonas* sp.) in the xylem of *Euphorbia lasiocarpa* in Ecuador. *Canadian Journal of Botany*, 61(1), 237-240.
- Ettxeberria, E., Gonzalez, P., Dawson, W., & Spann, T. (2007). *An iodine-based starch test to assist in selecting leaves for HLB testing*. UF/IFAS, Florida.
- FAO. (2020). *FAOSTAT*. Organización para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de: <http://faostat.fao.org>.
- Fogliata, G. M., Acosta, M. E., Martínez, C. V., Rojas, A., Muñoz, M. L., & Ploper, L. D. (2014). HLB: el enfoque fitopatológico: situación del Noroeste Argentino. Estación Experimental Agro-Industrial Obispo Colombres. *Avance Agroindustrial*, 35(4), 17-19.
- Franco F., M. A. (2014). *Determinación de la situación de plagas insectiles de interés cuarentenario asociadas al cultivo de aguacate variedad Hass (Persea americana Miller) en muestras provenientes de Zaragoza, Chimaltenango trabajo realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, Villa Nueva, Guatemala, CA*. Tesis de doctorado, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Gómez H., Y. (2015). *Histología comparada de sitios de alimentación inducidos por nematodos de la familia Heteroderidae: Meloidodera astonei, Globodera mexicana, Globodera sp, Punctodera chalcoensis, Cactodera rosae y Meloidogyne sp*. Tesis de maestría en ciencias, Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Hernández-Valdés, E. F., Aguilar-Campoverde, S., Aguiara-Taylor, V., & Pérez-Sánchez, R. E. (2012). Concentración nutrimental en hojas de aguacate

- 'Hass' con síntoma de moteado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 621-627.
- López E., M. E., Noriega C., D. H., Damián N., A., González M., R., Pereyda, H. J., Domínguez M., V. M., Martínez A., U., Cruzaley S., R., Cruz L., B. & Salas A., E. (2017). *Guía para el manejo integrado del aguacate en altas densidades en el estado de Guerrero*. Comité Sistema Producto Aguacate de Guerrero, A.C.
- Luna-Pabello, V. M. (2006). *Atlas de ciliados y otros microorganismos frecuentes en sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales* (95 p.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Malo, S. E. (1976). Mineral nutrition of avocados. In *Proc. of the First Inter. Tropical fruit short course: The avocado* (pp. 42-46). Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Marín, J. C., Rincón, N., Díaz-Borrego, L., & Morales, E. (2017). Cultivo de protozoarios ciliados de vida libre a partir de muestras de agua del Lago de Maracaibo. *Impacto Científico*, 12(1), 157-170.
- Martínez, M. (2018). *México principal productor de aguacate*. El Economista. Recuperado de: <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Mexico-principal-productor-de-aguacate-20180131-0111.html>
- Montero-Astúa, M., Saborío-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(1), 175-175.
- Paz, I. (2000). Phytomonas: protozoos flagelados de plantas. *Fitosanidad*, 14(4), 107-113.
- Pérez, A. S, Ávila, Q. G., & Coto, A. O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36(2), 111-123.
- Ruiz, A. (1961). Contribución al estudio del género *Phytomonas* Donovan en Costa Rica III. *Phytomonas davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909. *Revista de Biología Tropical*, 9(2), 227-231.
- SAGARPA. (2017). *Aguacate mexicano*. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México, México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030?state=published>
- Sánchez-Moreno, M., Fernandez-Becerra, C., Mascaro, C., Rosales, M. J., Dollet, M., & Osuna, A. (1995). Isolation, *in vitro* culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Anona cherimolla*) in southeastern Spain. *Parasitology Research*, 81(7), 575-581.
- Sánchez-Moreno, M., Fernández-Becerra, C., Fernández-Ramos, C., Luque, F., Rodríguez-Cabezas, M. N., Dollet, M., & Osuna, A. (1998).

- Trypanosomatid protozoa in plants of southeastern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA, and metabolic behavior. *Parasitology Research*, 84(5), 354-361.
- Sandoval, B. C. (2004). *Manual técnico manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos* (pp. 31-53). FAO & Universidad de Talca.
- Saucedo C., J. R., Téliz O., D., Vallejo P., M. R., & Beltrán P., H. (2019). The Avocado sunblotch viroid: An invisible foe of avocado. *Viruses*, 11(6), 491.
- Vickerman, K. & Dollet, M. 1992. Report on the second Phytomonas workshop. *Oléagineux*, 47 (10), 593-600.
- Zapata, M. N. J. (2019). *Obtención de plantas de aguacate (Persea americana Mill.) libres de moteado de la hoja*. Tesis de doctorado, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
- Zapata-Montes, N. J., Campos-Rojas, E., Ayala-Arreola, J., Acuayte-Valdés, E., Barrientos-Priego, A. F. 2021. *Xylella fastidiosa* no es causante del moteado clorótico de la hoja en aguacate. In Barrientos-Priego, A. F. (Ed.), *Memorias del VI congreso latinoamericano del aguacate* (pp. 279-280; 9 - 12 de noviembre 2021, La Antigua, Guatemala). Asociación Guatemalteca de Exportadores AGEXPORT.
- Zentmyer, G. A. (1953). Diseases of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 39, 44-58.

CAPÍTULO II. INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PROGRESO DEL MOTEADO

CLORÓTICO DE HOJAS DE AGUACATE

RESUMEN

La comercialización del aguacate mexicano está condicionada al cumplimiento de normas en donde se encuentran los criterios para la selección del producto, sin embargo, en ocasiones no se cumple completamente debido a problemas fitosanitarios. Actualmente el moteado clorótico de las hojas está tomando relevancia, del cual se desconoce con certeza el origen y dificulta la realización de un plan de control eficiente, lo que requiere de tecnologías sustentadas en sistemas estadísticos y computarizados. En esta investigación se planteó implementar un análisis de la enfermedad empleando herramientas estadísticas como el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) para el análisis de tres árboles con síntomas, la elaboración de una escala logarítmica diagramática, así como el estudio de la cantidad de organismos presentes y cristales formados por las plantas. Los resultados muestran mayor severidad cuando existe gran cantidad de protozoarios en los vasos del xilema, la escala elaborada es una opción viable para la evaluación de daños constituida por seis clases, con precisión $R^2=0.82$ y una exactitud de 1.07, índice de reproducibilidad de 1.0 y un error del 8 %. Se definió que la planta forma cristales como mecanismo de defensa antes de verse severamente afectada y es mayor cuando hay menos organismos presentes, además de que el progreso de la enfermedad depende de la cantidad de organismos presentes teniendo una relación positiva, a mayor cantidad de organismos presentes, mayor progreso de la enfermedad.

Palabras clave: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad, Cristales, Escala, Protozoarios, Severidad.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elizabeth Gaytán Campos.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego.

CHAPTER II. INCIDENCE, SEVERITY AND PROGRESS OF THE CHLOROTIC MOTTLE OF AVOCADO LEAVES

ABSTRACT

The commercialization of the Mexican avocado is conditioned to the fulfillment of norms where the criteria for the selection of the product are found, however, sometimes it is not completely fulfilled due to phytosanitary problems. Currently, the chlorotic mottle of avocado leaves is becoming relevant, the origin of which is unknown with certainty and makes it difficult to conduct an efficient control plan, which requires technologies supported by statistical and computerized systems. In this research, it was proposed to implement an analysis of the disease using statistical tools such as the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) for the analysis of three trees with symptoms, the elaboration of a diagrammatic logarithmic scale, as well as the study of the number of organisms present and crystals formed by plants. The results showed greater severity when there is a large number of protozoa in the xylem vessels, the elaborated scale is a viable option for the evaluation of damages constituted by six classes, with precision $R^2=0.82$ and an accuracy of 1.07, reproducibility index of 1.0 and an error of 8%. It was defined that the plant forms crystals as a defense mechanism before being severely affected and is greater when there are fewer organisms present, in addition to the fact that the progress of the disease depends on the number of organisms present, having a positive relationship, to a greater number of organisms. present, further disease progression.

Keywords: Area under the disease progress curve, Crystals, Scale, Protozoa, Severity.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elizabeth Gaytán Campos.

Director de Tesis: Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la producción de aguacate ha incrementado de manera significativa como respuesta al aumento de la demanda mundial desde hace dos décadas (Arias et al., 2018). México concentra el 45.95 % de las exportaciones mundiales (Martínez, 2018), no obstante, la comercialización del aguacate mexicano está condicionada al cumplimiento de normas en donde se encuentran los criterios para la selección del producto, entre ellas, la NOM-066-FITO-2002 “Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate”. Dentro de estas normas se establece que el producto a comercializar debe provenir de plantas libres de cualquier enfermedad o plaga cuarentenaria que pueda representar un peligro para la producción, cabe señalar que cada país tiene reglas propias a las que debe sujetarse el exportador (CEDRSSA, 2017).

El aguacate mexicano cuenta con el sello de Calidad Suprema que garantiza los más altos estándares de calidad e inocuidad a nivel nacional e internacional (Rodríguez-Campos et al., 2017), sin embargo, en ocasiones no se cumple completamente debido a problemas fitosanitarios. En este contexto, actualmente el llamado moteado clorótico de las hojas está tomando relevancia, encontrándose ampliamente distribuido en huertos nacionales, principalmente en el Estado de México, Morelos y Michoacán, del cual se desconoce con certeza el origen y dificulta la realización de un plan de control eficiente. Por ello, para tener un adecuado manejo integrado fitosanitario se requiere de tecnologías sustentadas en sistemas estadísticos y computarizados, como los sistemas de simulación y predicción, análisis espaciales y temporales, estimación de pérdidas, entre otras (Bautista et al., 2009).

Dentro de las herramientas estadísticas que actualmente permite el análisis del comportamiento de las epidemias para la toma de decisiones es el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), la cual comúnmente adopta forma de S, teniendo una etapa inicial de incremento lento por el proceso de adaptación entre el patógeno y el hospedante, después un crecimiento exponencial y finalmente un comportamiento asintótico; de esta manera la

severidad de la enfermedad se monitorea a través del tiempo y los resultados pueden analizarse con modelos de regresión logística (Bautista et al., 2009).

Por otro lado, al ser un problema de reciente estudio, se tiene poca información acerca de la relación de la severidad de la enfermedad con las pérdidas en el cultivo de aguacate, por lo que se requieren de métodos estandarizados de cuantificación de la enfermedad que permitan realizar estudios epidemiológicos reproducibles, exactos y precisos; entendiendo como exactitud a la proximidad que tiene un valor estimado con el valor real, precisión como la variación o repetitividad asociadas con una estimación; y reproducibilidad a la ausencia de variación en las estimaciones cuando diversos evaluadores cuantifican la misma característica (Hernández & Sandoval, 2015).

Los métodos visuales pueden ser una opción de medición, los cuales por su simplicidad y costos son ampliamente utilizados, dentro de estos métodos, el uso de escalas logarítmicas basadas en el principio de Weber Fechner son los más adecuados, ya que permiten la asignación de clases con base en un sistema logarítmico y engloba una representación fotográfica para cada clase generada (Zavala & Alejo, 2012).

Por este motivo el presente estudio tuvo como objetivos realizar el análisis del ABCPE del moteado clorótico de hojas de aguacate, evaluar si existen diferencias entre árboles, así como el estudio de la cantidad de organismos presentes y cristales formados por las plantas. También se buscó elaborar y validar una escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico en hojas de aguacate que permita la evaluación de los daños de la enfermedad en campo, donde se analizó los valores de precisión, exactitud, y reproducibilidades resultantes de su utilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de campo del Departamento de Fitotecnia ubicado en el campo experimental Xaltepa de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México en los años 2020-2022.

Observación de organismos en hojas con diferente severidad

Toma de muestras

De un árbol 'Duke 7' que se mantiene en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, con síntomas de moteado clorótico de hojas, se colectaron tres hojas con diferente grado de severidad (bajo, intermedio y avanzado) (Figura 40), con ayuda de tijeras y bolsas de plástico limpias.

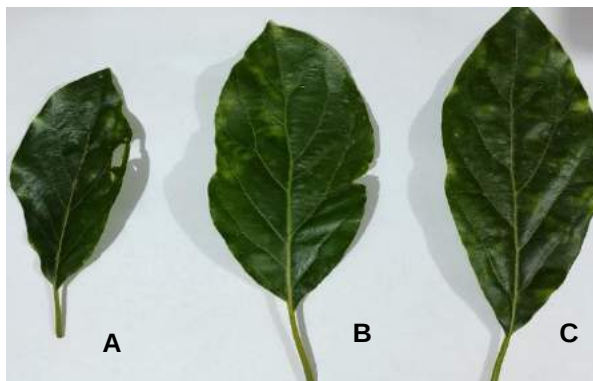


Figura 40. Hojas de aguacate 'Duke 7' colectadas con diferente grado de severidad de moteado clorótico. A: bajo; B: intermedio; C: avanzado.

Preparación y observación de cortes longitudinales

Como se muestra en la Figura 41, utilizando una aguja de disección y una navaja previamente desinfectada, bajo una cámara de flujo laminar (Prendo® CFL-100) y lámparas de alcohol, se hicieron cortes longitudinales en el peciolo y vena central de las hojas colectadas, los cuales posteriormente fueron transferidos a un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada estéril, se acomodaron y luego se colocó un cubreobjetos con el cuidado de no generar burbujas, para proceder a analizarlos directamente bajo microscopio (Olympus® BX53) con el objetivo de 40x, después se documentó lo obtenido, empleando un adaptador de celular para microscopio y la cámara del dispositivo Xiaomi® Redmi Note 9 Pro con una resolución de 64 MP.

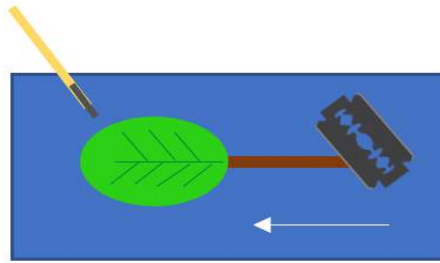


Figura 41. Corte longitudinal del peciolo de la hoja.

Escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico de hojas de aguacate

Toma de muestras

Se trabajó con dos árboles de aguacate ‘Duke 7’, un árbol injertado con ‘Libres 8’ y un portainjerto ‘Tochimilco 7’, que se mantienen en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, con síntomas de moteado clorótico de hojas, los cuales fueron divididos en tres estratos como se muestra en la Figura 42, esto con la intención de tener una buena representación del árbol. Con ayuda de tijeras y bolsas de plástico limpias, se realizó una muestra compuesta, colectando 62 hojas con diferente tamaño y diversidad en el grado de severidad del síntoma de moteado clorótico, se limpiaron con sanitas y alcohol y posteriormente fueron



Figura 42. División de árbol de aguacate en tres estratos para el muestreo.

Obtención de los porcentajes de severidad

Utilizando el programa GIMP ® 2.24.10 de uso libre, se determinaron los píxeles del área foliar total (AFT) y los píxeles del área con moteado clorótico (AMC) de cada imagen, se registraron todos los datos y posteriormente se calcularon los porcentajes de severidad dividiendo AMC/AFT y multiplicando por 100.

Elaboración de la escala logarítmica diagramática

Se generó una escala logarítmica de un modelo exponencial, con el programa 2 LOG_v.2.0., desarrollado por el Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (LANREF) del Colegio de Posgraduados (datos no publicados). Se consideraron seis clases, incluyendo la clase 0, y se elaboró considerando el porcentaje máximo de severidad que fue el límite para la distribución de clases, así el programa generó para cada clase un intervalo de severidad, límite inferior (L.i), límite superior (L.s), así como el punto medio de clase (P.M.C). Se asociaron imágenes a cada clase establecida, seleccionando las más representativas, es decir, aquellas cuyo daño se aproximó mejor a los P.M.C de cada una.

Validación de la escala logarítmica diagramática

La validación se realizó con el programa Validar-PER_v.1.4, desarrollado por el Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (LANREF) del Colegio de Posgraduados (no publicado), para lo cual se utilizaron las 62 fotografías de hojas previamente tomadas con diversos niveles de severidad de moteado clorótico, de cuales se desconocía el porcentaje de daño real. El programa se configuró con los P.M.C de la escala creada y se introdujo el dato de la clase con la cual se estimó el porcentaje de severidad observado, luego el programa realiza una regresión lineal simple comparando el porcentaje de daño estimado con el real, esto con el fin de conocer la precisión (R^2) y exactitud (b_1) de la escala. Por último, de manera independiente seis evaluadores realizaron la valoración de las 62 imágenes, con ayuda de la escala logarítmica diagramática impresa, clasificándolas en las clases y porcentajes de severidad que ellos consideraron, con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de la escala.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) del moteado clorótico de hojas de aguacate

Toma de muestras

Con ayuda de tijeras y bolsas de plástico limpias, se realizaron muestras compuestas de dos árboles de aguacate 'Duke 7', un árbol injertado 'Libres 8' y un portainjerto 'Tochimilco 7', que se mantienen en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, con síntomas de moteado clorótico de hojas, los cuales fueron divididos en tres estratos (inferior, medio y superior), esto con la intención de tener una buena representación del árbol. Durante cinco semanas, con intervalos de siete días, se colectaron cinco hojas por estrato, con diferente tamaño y diversidad en el grado de severidad del síntoma de moteado clorótico, obteniendo cada semana 15 hojas por árbol. Después se limpiaron con sanitas y alcohol, y posteriormente fueron fotografiadas.

Evaluación de la severidad

Las hojas colectadas semanalmente se clasificaron en las clases correspondientes utilizando la escala logarítmica diagramática previamente elaborada, de esta manera fue posible obtener la severidad (Sev) de las cinco evaluaciones realizadas.

Obtención del área bajo la curva del progreso de la enfermedad

El cálculo del progreso de la enfermedad se realizó mediante el método de integración del área bajo la curva, utilizando rectángulos como polígonos de aproximación, formados por el punto medio de clase alcanzado en las evaluaciones durante las cinco semanas de seguimiento, lo cual se expresa con la siguiente ecuación:

$$ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

Y_i = Severidad de la enfermedad evaluada en el tiempo i .

t_i = Evaluación de la enfermedad en el tiempo i .

$i = 1, 2, 3, \dots, n$; n = número de evaluaciones.

Efecto de la severidad en el número de organismos y cristales formados

En la evaluación de la primer semana también se contabilizaron los organismos y cristales presentes, para lo cual se realizaron cortes longitudinales en el peciolo y vena central de las hojas colectadas, utilizando una aguja de disección y una navaja previamente desinfectada, bajo una cámara de flujo laminar y lámparas de alcohol, los cuales posteriormente fueron transferidos a un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada estéril, se acomodaron y luego se colocó un cubreobjetos con el cuidado de no generar burbujas, para proceder a analizarlos directamente bajo microscopio con el objetivo de 40 x, después se documentó lo obtenido.

Las fotografías tomadas fueron analizadas empleando el programa GIMP ® 2.24.10 de uso libre, con el cual se determinó el número de cristales formados, los pixeles del área total foliar (PT) y los pixeles del área ocupada por organismos (PO), posteriormente para simplicidad en el manejo de los datos los PO se expresaron en porcentaje dividiendo PT/PO y multiplicando por 100.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa en línea SAS ® OnDemand for Academics de uso libre, para examinar los datos obtenidos.

Análisis de varianza

Se hizo un análisis de varianza univariado (ANOVA) con PROC GLM, para conocer los efectos de las variedades (árboles), estratos y sus interacciones (Cuadro 5), sobre el progreso de la enfermedad y el número de organismos y cristales presentes. Posteriormente para identificar las diferencias existentes se

realizaron comparaciones múltiples de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 5. Interacciones entre árboles aguacate y estratos estudiadas en el análisis de varianza univariado.

Interacciones	Interpretación
11	Árbol 1/ Estrato 1
12	Árbol 1/ Estrato 2
13	Árbol 1/ Estrato 3
21	Árbol 2/ Estrato 1
22	Árbol 2/ Estrato 2
23	Árbol 2/ Estrato 3
31	Árbol 3/ Estrato 1
32	Árbol 3/ Estrato 2
33	Árbol 3/ Estrato 3

Coeficiente de correlación de Pearson

Con PROC CORR, se obtuvieron los coeficientes de correlación simple de Pearson para medir la relación estadística entre el número de organismos presentes y cristales formados con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, así como la relación estadística entre el número de organismos presentes con el número de cristales formados; este análisis se realizó para cada árbol y estrato bajo estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación de organismos en hojas con diferente severidad

En los cortes de la hoja con grado bajo de severidad se observaron a los organismos con espacio entre sí e incluso vasos del xilema contiguos que se encontraban vacíos (Figura 43), a diferencia de la hoja con grado intermedio, en la cual además de observarse mayor población se redujo el espacio y aumentaron los vasos ocupados (Figura 44), por último la hoja con grado avanzando presentó la cantidad más grande de protozoarios, se mostraron

adosados y en todos los vasos del xilema del área observada (Figura 45), de esta manera, existe una relación positiva de la cantidad de microorganismos encontrados y el número de vasos del xilema afectados con el grado de severidad de la enfermedad.

Para el caso de hongos fitopatógenos Marshall & Rush (1980) mencionaron que la severidad de la enfermedad tiene una relación directa con la formación de estructuras de infección y al respecto señalaron que esta habilidad es estimulada por el hospedante, por lo que el comportamiento de los protozoarios se asemeja, a mayor cantidad de microorganismos presentes, mayor enfermedad.



Figura 43. Organismos observados en los vasos del xilema de los cortes de hojas de aguacate con grado bajo de severidad, se aprecian espacios entre sí y algunos vasos de xilema contiguos vacíos.

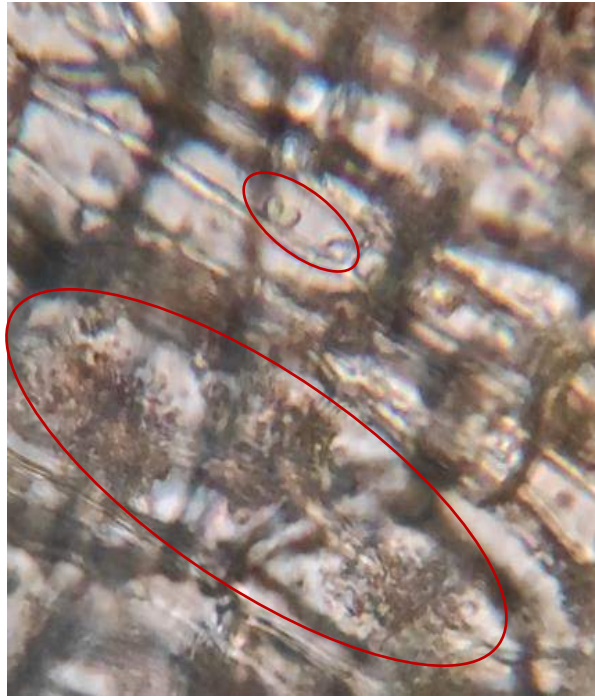


Figura 44. Organismos observados en los vasos del xilema de los cortes de hojas de aguacate con grado medio de severidad, se aprecia poco espacio entre los protozoarios y pocos vasos del xilema vacíos.

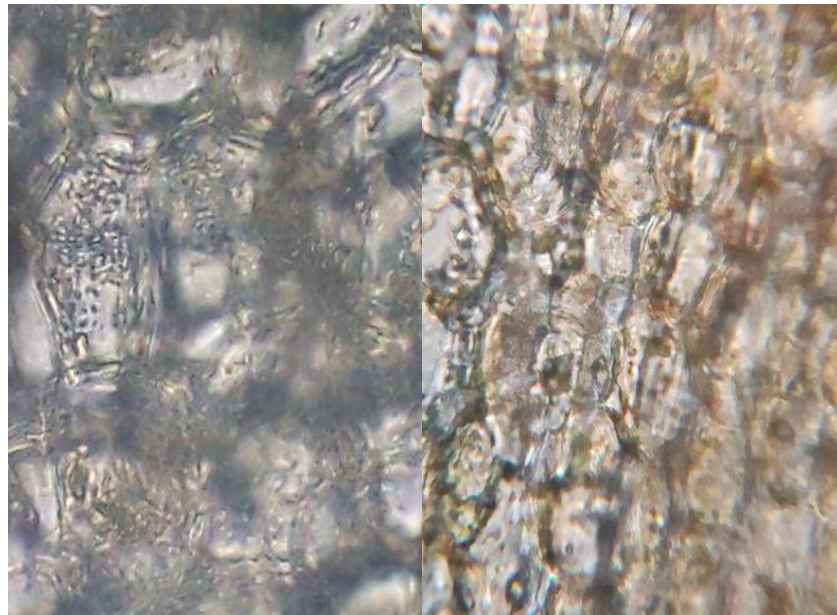


Figura 45. Organismos observados en los vasos del xilema de los cortes de hojas de aguacate con grado avanzado de severidad, se aprecia gran población de protozoarios adosados en todos los vasos del xilema del área observada.

Escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico de hojas de aguacate

Obtención de los porcentajes de severidad

El valor más alto de AMC obtenido de las 62 hojas analizadas fue de 1105524 px que corresponden a un 64.42 % de severidad, y el valor más bajo de 0 px y 0 % de severidad, es decir, una hoja sin síntomas.

Elaboración de la escala logarítmica diagramática

La escala logarítmica diagramática generada para cuantificar la severidad del moteado clorótico en hojas de aguacate constó de seis clases, donde la clase 0 correspondió a hojas sin daños y la 6 a hojas con el máximo porcentaje de daño o severidad estimada. Los intervalos de severidad y los P.M.C de cada clase se muestran en el Cuadro 6 y la escala logarítmica diagramática con las imágenes asociadas en la Figura 46.

Cuadro 6. Límite inferior (L.i), Límite superior (L.s) y puntos medio de clase (P.M.C) de las clases generadas en la escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico en hojas de aguacate.

Clase	L.i	P.M.C	L.s
0	0	0	0
1	0.1	2.5	4
2	4.1	6.3	10
3	10.1	15.9	25.1
4	25.2	39.8	63.1
5	63.2	65	

El número de clases fue el adecuado para la elaboración de la escala de severidad y la obtención de una buena representación, encontrando en trabajos realizados para antracnosis en lima ácida Tahití, roya en hojas de teca, complejo mancha de asfalto del maíz y antracnosis en papaya, el uso de seis a siete clases en las escalas diagramáticas hechas (Zavala & Alejo, 2012; Hernández & Sandoval, 2015; Cristiane-Delmadi et al., 2018; Hernández, 2019).

ESCALA DE SEVERIDAD DE MOTEADO CLORÓTICO EN HOJA DE AGUACATE

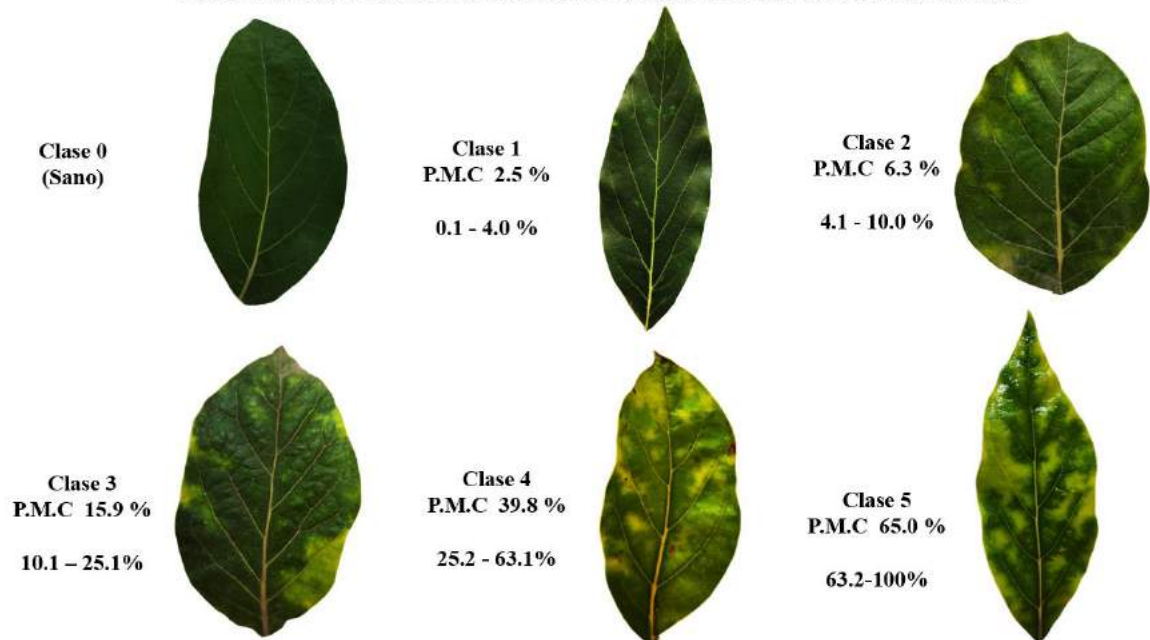


Figura 46. Escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico en hojas de aguacate.

Validación de la escala logarítmica diagramática

La escala elaborada tuvo una precisión $R^2=0.82$ considerada como media y una exactitud (b_1) de 1.07 evaluada como una exactitud perfecta (Figura 47); los evaluadores mostraron una tendencia a subestimar positivamente la severidad de la enfermedad, similar a la subestimación en la validación de la escala para el complejo mancha de asfalto del maíz y en la escala para antracnosis en papaya (Hernández & Sandoval, 2015; Cristiane-Delmadi et al., 2018).

Por otro lado, se obtuvo un índice de reproducibilidad de 1.0, un error del 8 % y se mostró una buena estimación de reproducibilidad debido a la similitud de sus evaluaciones. En este contexto, se ha encontrado que la exactitud es mayor para evaluadores con experiencia en la cuantificación de enfermedades, por lo que el hecho de que en la presente investigación los evaluadores no contaran con dicha experiencia fue un factor influyente, además de factores externos como el tamaño y color de la lesión, la intensidad de luz, la fatiga del evaluador al momento de la

evaluación o algunos otros que no pueden ser controlados y que afectan la precisión y exactitud de las evaluaciones visuales, no obstante, debido a la proximidad de los valores de severidad estimados a los valores de la intensidad real, la validación de la escala logarítmica diagramática para el moteado clorótico de hojas de aguacate obtuvo resultados favorables, siendo una opción viable para la evaluación de daños (Sherwood et al., 1983; Hernández & Sandoval, 2015; Cristiane-Delmadi et al., 2018).

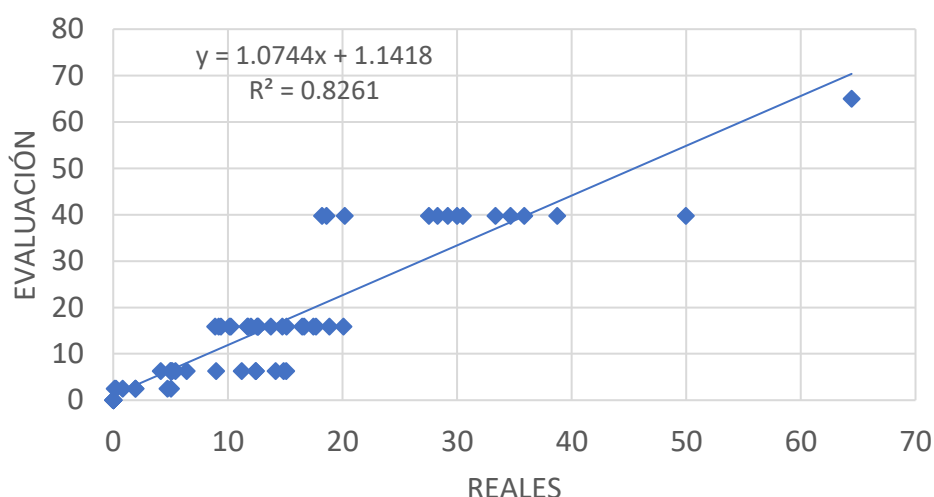


Figura 47. Precisión y exactitud de la escala logarítmica diagramática de severidad para el moteado clorótico en hojas de aguacate.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) del moteado clorótico de hojas de aguacate

Evaluación de la severidad

En el Anexo 1 se muestran los datos obtenidos durante las cinco evaluaciones realizadas, las clases en las que se agruparon las hojas colectadas de cada estrato y árbol, así como el porcentaje de severidad (Sev) que le corresponde a cada una. Se aprecia que las hojas del árbol 1 a lo largo de las evaluaciones se clasificaron principalmente en la clase 3 y en el estrato inferior en las últimas revisiones una de las hojas se clasificó en la clase 5. Las hojas del árbol 2 se evaluaron en su mayoría en las clases 3 y 4, manteniéndose estable a lo largo

de las evaluaciones, no obstante, en el estrato inferior y en el estrato medio se encontraron hojas correspondientes a la clase 5. Las hojas del árbol 3 se ubicaron mayormente en la clase 0, sin embargo, con el progreso del análisis se encontraron hojas pertenecientes a las clases 1 y 2 en el estrato inferior y en el estrato medio.

Con estos datos se puede observar el progreso de la severidad en los tres árboles a través del tiempo, principalmente en los estratos inferior y medio. Se ha descrito que la intensidad del parasitismo varía mucho, desde escasos protozoarios hasta un parasitismo masivo, además recordemos que, a mayor cantidad de microorganismos presentes, mayor enfermedad (Ruiz, 1961).

Obtención del área bajo la curva del progreso de la enfermedad

En el Anexo 1 también se muestran los valores del área bajo la curva del progreso (ABCPE) de la enfermedad obtenidos para las evaluaciones de los tres árboles por medio de los porcentajes de severidad obtenidos a lo largo de las evaluaciones.

El árbol 2 tuvo los valores más altos, seguido del árbol 1 y finalmente el árbol 3, todos principalmente en los estratos inferior y medio. Visualmente durante el tiempo de observación, en los tres ejemplares se presentó un incremento en la sintomatología, por lo que se confirma un progreso en la enfermedad, lo que puede ser un riesgo para las plantaciones de aguacate, debido al poco tiempo en el que se dio el incremento, esta rapidez en el progreso de la enfermedad también se ha reportado en plantas de yuca in vitro, al ser estudiados síntomas causados por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihoti*, en donde se observa una tendencia similar del ABCPE en 28 días, además de que dicha investigación permitió caracterizar el perfil patogénico de esta bacteria (Camargo et al., 2019).

Efecto de la severidad en el número de organismos y cristales formados

En los Anexos 2, 3 y 4 se presentan el número de píxeles totales (PT) y los píxeles ocupados por los protozoos (PO), los datos de PO expresado en porcentaje y el número de cristales presentes en el área observada. Los porcentajes y número

de cristales formados no son muy altos, sin embargo, se debe tomar en cuenta que estos datos solamente son de una porción muy pequeña del peciolo de la hoja, por lo que visto de esa forma podrían ser valores significativos.

El árbol 1 presentó la mayor cantidad de cristales en el estrato medio, siendo cinco el valor más alto (Anexo 2); el árbol 2 obtuvo seis cristales como número mayor y sucedió en el estrato inferior (Anexo 3) y finalmente el árbol 3 presentó como cifra más grande ocho cristales en el estrato inferior y en el estrato medio (Anexo 4). En total, el árbol con más cristales formados fue el ejemplar 3, con 25 cristales en el estrato medio.

Los cristales observados presentaron forma romboidal (Figura 48) y se hicieron presentes en tejido enfermo tanto con síntomas iniciales como en estados avanzados; se ha encontrado que las plantas forman cristales de diferente morfología y composición como mecanismo de resistencia y defensa de la planta a plagas y enfermedades. En tal sentido, en pitaya se determinó la presencia de cristales de oxalato de calcio asociados a la enfermedad abiótica conocida como “mancha blanca”, en donde con un análisis por microscopía electrónica de tejido afectado se observaron cristales con forma de rafidio y cubos compuestos de carbono, oxígeno y calcio, principalmente y por medio de difracción de rayos X se confirmó la presencia de oxalatos en tejido enfermo (Rovner, 1988; Ward et al., 1996; Retana-Sánchez et al., 2019).



Figura 48. Cristales romboidales presentes en peciolos y hojas de árboles con síntomas de moteado clorótico.

Análisis estadístico

Análisis de varianza estratos y variedades

Área bajo la curva. Se encontraron diferencias significativas para estratos y variedades, es decir, al menos un estrato y al menos una variedad tiene efecto diferente sobre el progreso de la enfermedad (Figura 49). El árbol 3 tuvo los datos menores, principalmente en el estrato superior y el árbol 2 los datos mayores datos principalmente el estrato inferior (Figura 50).

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: ABCPE					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Modelo	4	287891.9209	71972.9802	44.37	<.0001
Error	40	64878.8156	1621.9704		
Total corregido	44	352770.7364			

R-cuadrado	Var Coef.	Raíz MSE	Media de ABCPE
0.816088	31.96099	40.27369	126.0089

Origen	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
ESTRATO	2	17609.0804	8804.5402	5.43	0.0082
VARIEDAD	2	270282.8404	135141.4202	83.32	<.0001

Figura 49. Análisis de varianza univariado de estratos y variedad (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.

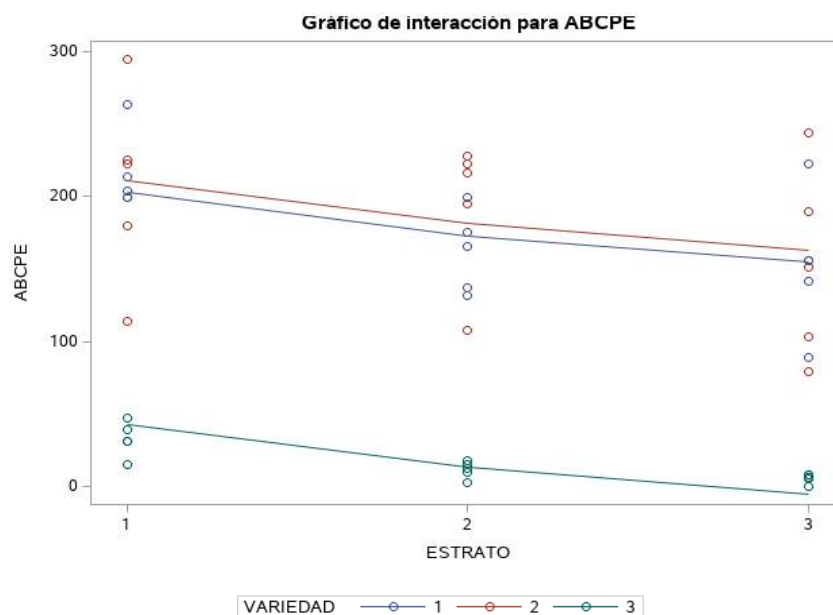


Figura 50. Gráfico de interacción de estratos y variedad (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.

Al hacer a comparación múltiple de medias para estratos se observó que el estrato inferior y el estrato medio son los que presentaron mayor variabilidad de datos (Figura 51), y estadísticamente dichos estratos tienen efectos iguales sobre el progreso de la enfermedad y presentaron los datos mayores de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Figura 52).

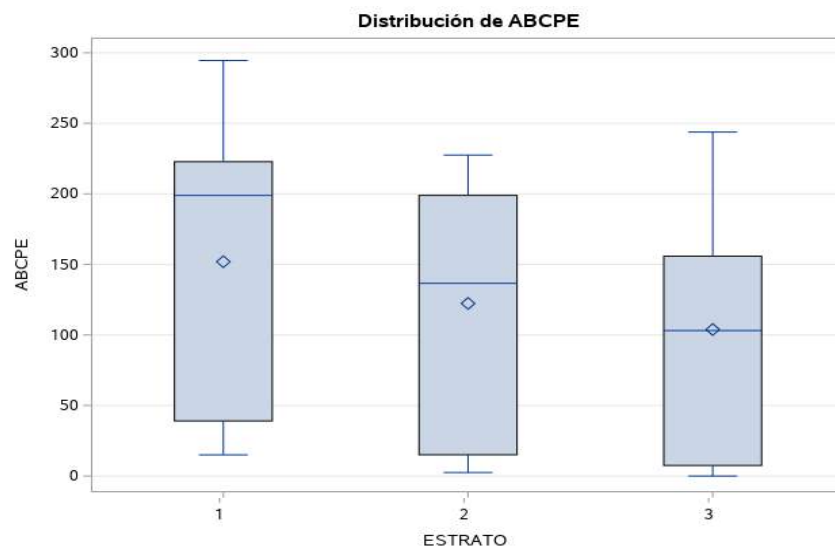


Figura 51. Distribución de datos del efecto de los estratos sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de moteado clorótico de hojas de aguacate.

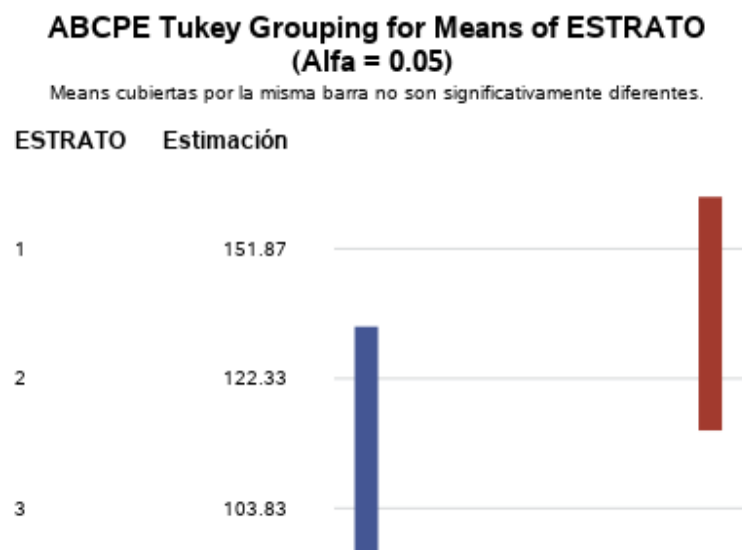


Figura 52. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de los estratos sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas de aguacate.

A su vez, los resultados obtenidos para las variedades arrojaron la mayor variabilidad de datos para el árbol 2 y la menor para el árbol 3 (Figura 53). Estadísticamente los árboles 2 y 1 tuvieron el mayor efecto sobre el progreso de la enfermedad (Figura 54).

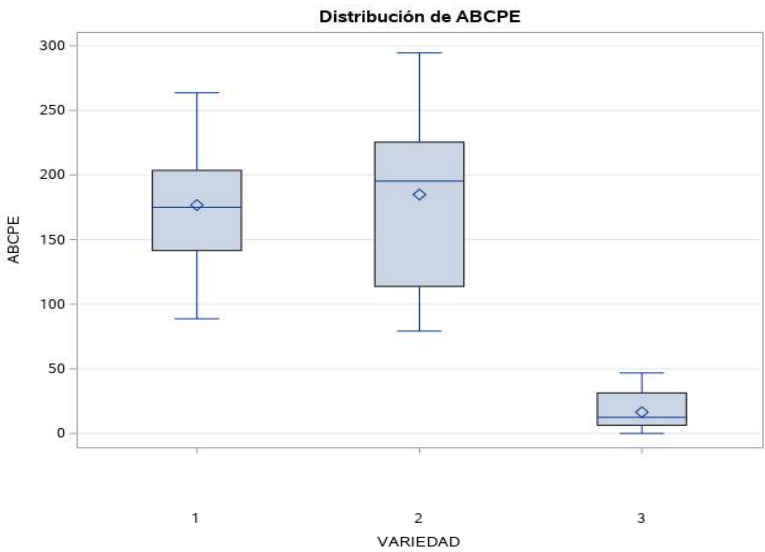


Figura 53. Distribución de datos del efecto de las variedades (árboles) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad moteado clorótico de hojas de aguacate.

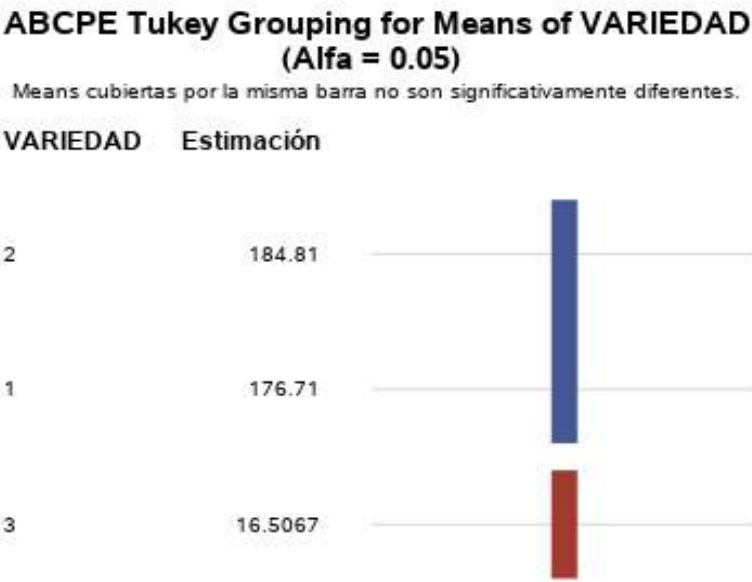


Figura 54. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p\leq0.05$) del efecto de las variedades (árboles) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de moteado clorótico en hojas de aguacate.

Número de organismos. Se encontraron diferencias significativas solo para los árboles, es decir, al menos una variedad tiene efecto diferente sobre el número de organismos presentes (Figura 55), el árbol 3 tuvo los datos menores y el árbol 1 los mayores (Figura 56).

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: ORGANISMOS					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Modelo	4	179.4211156	44.8552789	10.56	<.0001
Error	40	169.9314622	4.2482866		
Total corregido	44	349.3525778			

R-cuadrado	Var Coef.	Raíz MSE	Media de ORGANISMOS
0.513582	61.56732	2.061137	3.347778

Origen	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
ESTRATO	2	1.5404978	0.7702489	0.18	0.8349
VARIEDAD	2	177.8806178	88.9403089	20.94	<.0001

Figura 55. Análisis de varianza univariado de estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes hojas.



Figura 56. Gráfico de interacción de variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.

Al hacer la comparación múltiple de medias se observa que el árbol 1 fue el que presentó la mayor variabilidad de datos y el árbol 3 la menor (Figura 57). Estadísticamente el árbol 1 y el árbol 2 tienen efectos iguales sobre la cantidad de organismos presentes (Figura 58); con estos datos se puede definir que el árbol 3, que es el que presentó la menor cantidad de organismos, es el que también posee severidad baja, mientras que los árboles 1 y 2 al presentar mayor cantidad de organismos, tienen una severidad más alta, lo cual visualmente fue posible de apreciar a través de la sintomatología que presentó cada árbol.

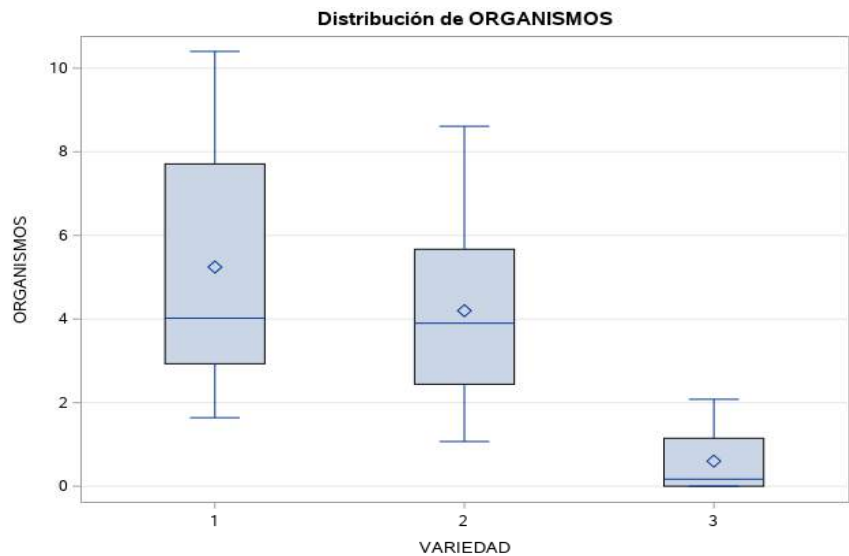


Figura 57. Distribución de datos del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.

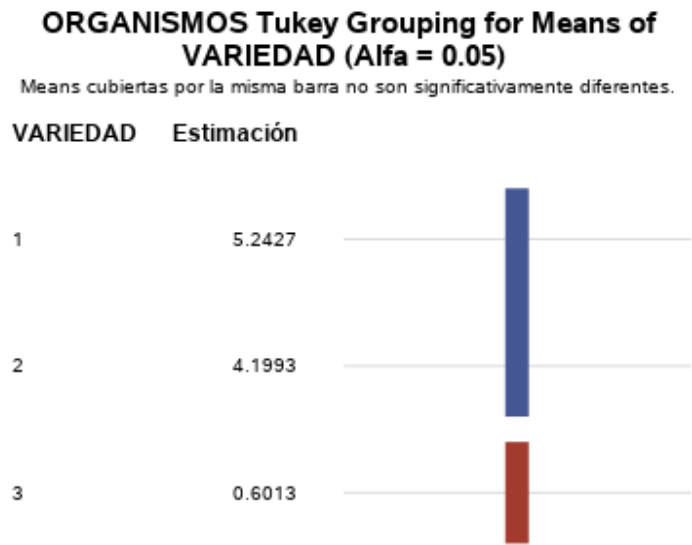


Figura 58. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.

Número de cristales formados. Se encontraron diferencias significativas para estratos y variedades, es decir, al menos un estrato y al menos una variedad tiene efecto diferente sobre el número de cristales formados (Figura 59). El árbol 3 presentó los datos mayores, principalmente en el estrato medio y el árbol 2 los menores, sobre todo en el estrato superior (Figura 60).

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: CRISTALES					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Modelo	4	75.4666667	18.8666667	5.11	0.0020
Error	40	147.7333333	3.6933333		
Total corregido	44	223.2000000			

R-cuadrado	Var Coef.	Raíz MSE	Media de CRISTALES
0.338112	106.7669	1.921805	1.800000

Origen	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
ESTRATO	2	43.33333333	21.66666667	5.87	0.0058
VARIEDAD	2	32.13333333	16.06666667	4.35	0.0195

Figura 59. Análisis de varianza univariado de estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.

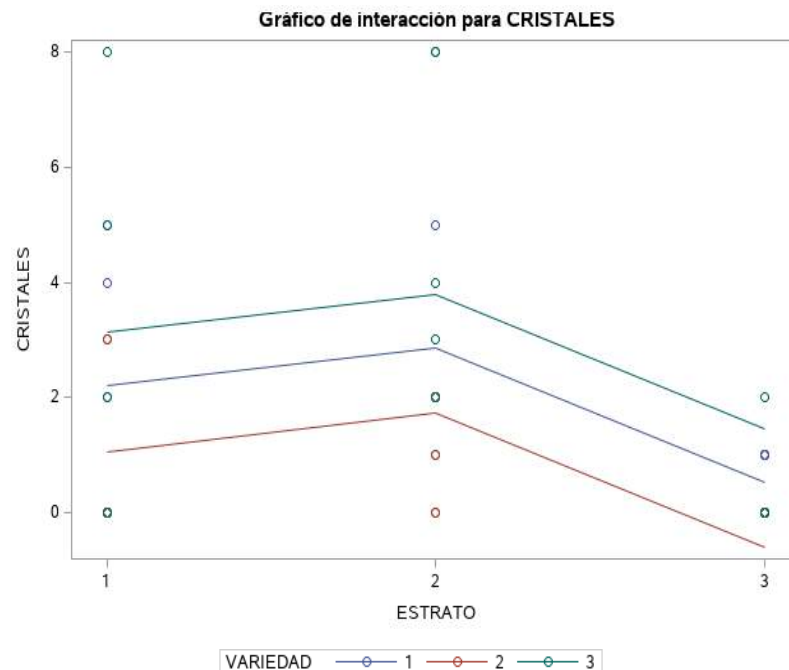


Figura 60. Gráfico de interacción de estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.

Al hacer la comparación múltiple de medias se observa que el estrato inferior presentó la mayor variabilidad de los datos y el estrato superior la menor (Figura 61). Estadísticamente el estrato inferior y el estrato medio tienen efectos iguales sobre la cantidad de cristales presentes, y a su vez el estrato superior y el estrato medio tienen efectos iguales sobre la cantidad de cristales presentes (Figura 62). Con respecto a variedades, la mayor variabilidad de datos la presentó el árbol 3 y la menor el árbol 1 (Figura 63), los árboles 3 y 1, tienen efectos iguales sobre la cantidad de cristales presentes, y a su vez los árboles 2 y 1 tienen efectos iguales sobre la cantidad de cristales presentes (Figura 64).

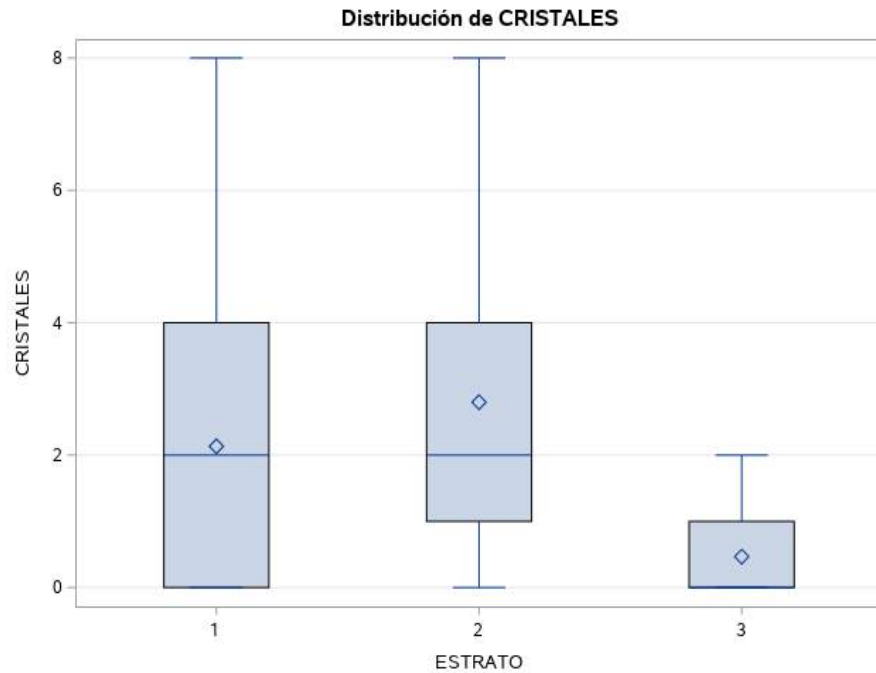


Figura 61. Distribución de datos del efecto de los estratos sobre la cantidad de cristales formados en hojas de aguacate.

CRISTALES Tukey Grouping for Means of ESTRATO (Alfa = 0.05)

Means cubiertas por la misma barra no son significativamente diferentes.

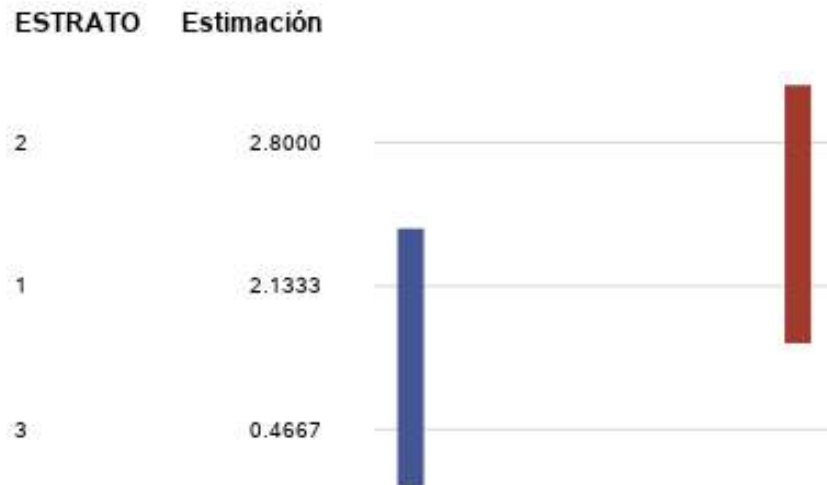


Figura 62. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de los estratos sobre la cantidad de cristales formados en hojas de aguacate.

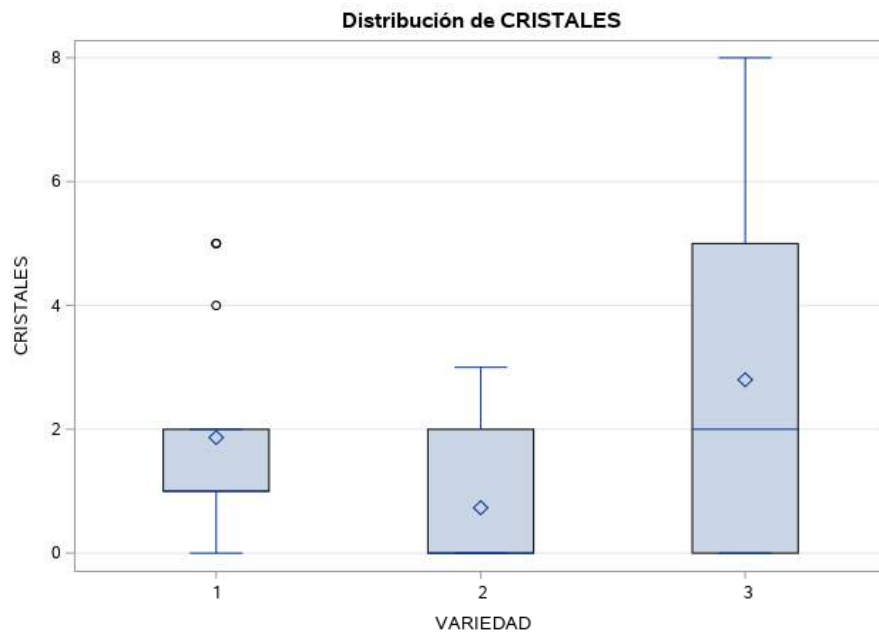


Figura 63. Distribución de datos del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.



Figura 64. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las variedades (árboles de aguacate) sobre la cantidad de cristales formados en hojas.

Con los datos mostrados, se puede observar que con respecto al progreso de la enfermedad para todos los árboles fue mayor en el estrato medio, esto puede deberse al movimiento de los protozoarios a lo largo de los tejidos conductores, que en cierto momento tienden a concentrarse en un punto. El árbol 1 fue el que presentó el mayor incremento y a su vez la mayor cantidad de organismos presentes, mientras que el árbol 3 tuvo el menor progreso de la enfermedad y la menor cantidad de organismos, lo que confirma la afirmación hecha anteriormente, a mayor cantidad de microorganismos presentes, mayor enfermedad (Ruiz, 1961).

En ese mismo sentido, el árbol 3 que presentó la menor severidad fue el que tuvo la mayor cantidad de cristales, por lo que es posible que cuando el árbol aún no presenta un número fuerte de organismos no forme una cantidad grande de cristales, los cuales empiezan a incrementarse cuando el árbol comienza a presentar un aumento en la presencia de protozoarios, además, cuando la cantidad de organismos rebasa su capacidad decide ya no continuar con la formación de estos cristales, lo que podría estar asociado con la muerte celular programada, dado que cuando una planta presenta una enfermedad en progreso las células que rodean el sitio donde se encuentra algún patógeno se suicidan

con la intención de detener su avance; esta muerte genera cambios morfológicos y estructurales y por lo tanto un alto en los procesos normales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, entre ellos, la producción de sustancias y mecanismos de defensa (Sanzón & Zavaleta, 2011).

Análisis de varianza de las interacciones de estratos y variedades

Área bajo la curva. Se encontraron diferencias significativas para las interacciones de árboles y estratos sobre el progreso de la enfermedad, es decir, al menos una interacción tiene efecto diferente sobre el progreso de la enfermedad (Figura 65).

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: ABCPE					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Modelo	8	291794.6284	36474.3286	21.53	<.0001
Error	36	60976.1080	1693.7808		
Total corregido	44	352770.7364			

R-cuadrado	Var Coef.	Raíz MSE	Media de ABCPE
0.827151	32.66085	41.15557	126.0089

Origen	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
INTERACCION	8	291794.6284	36474.3286	21.53	<.0001

Figura 65. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.

Al hacer la comparación múltiple de medias se observa que la mayor variabilidad de datos la presentó la interacción árbol 2/estrato superior y la menor el árbol 3/estrato superior (Figura 66). Estadísticamente todas las interacciones del árbol 3 con todos estratos tuvieron el mismo efecto sobre el progreso de la enfermedad (Figura 67), y visualmente este árbol fue el que presentó la menor sintomatología a lo largo de las evaluaciones.

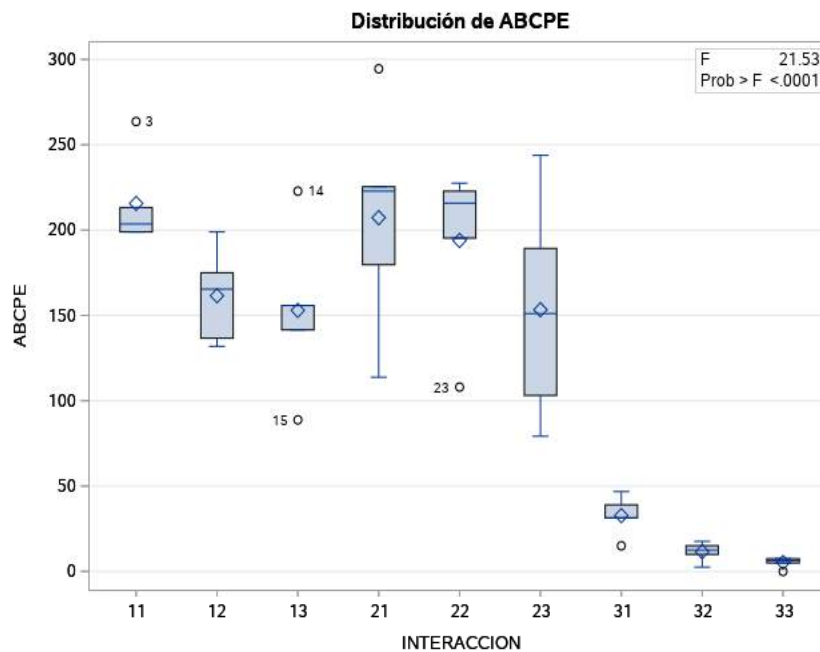


Figura 66. Distribución de datos del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.

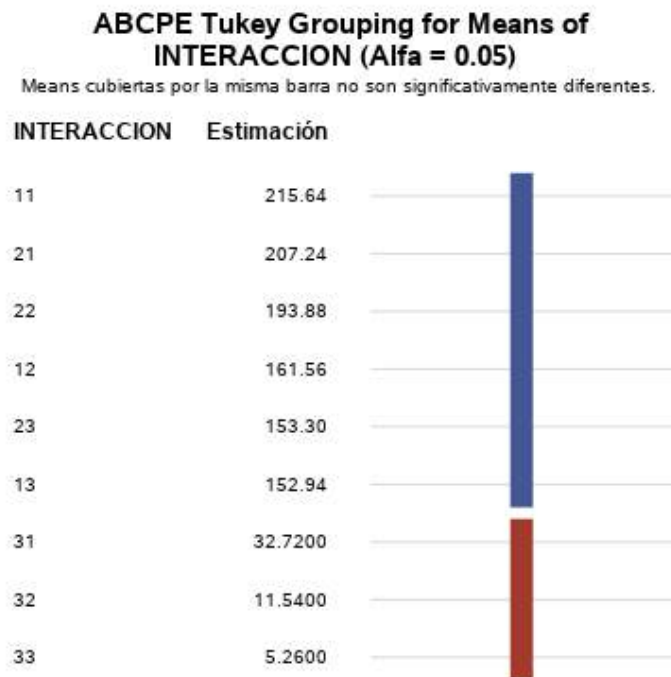


Figura 67. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hojas.

Número de organismos presentes. Se encontraron diferencias significativas para las interacciones de árboles y estratos, es decir, al menos una interacción tiene efecto diferente sobre el número de organismos presentes (Figura 68).

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: ORGANISMOS					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Modelo	8	192.8379778	24.1047472	5.54	0.0001
Error	36	156.5146000	4.3476278		
Total corregido	44	349.3525778			

R-cuadrado	Var Coef.	Raíz MSE	Media de ORGANISMOS
0.551987	62.28300	2.085097	3.347778

Origen	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
INTERACCION	8	192.8379778	24.1047472	5.54	0.0001

Figura 68. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles en aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.

Al hacer la comparación múltiple de medias se observa una mayor variabilidad de los datos en todas las interacciones analizadas, y es claro que la interacción del árbol 3 con el estrato superior presentó la menor variabilidad (Figura 69). Estadísticamente las interacciones del árbol 3 con todos los estratos y las interacciones del árbol 2 con el estrato medio y con el estrato inferior, tienen efectos iguales sobre el número de organismos presentes, sin embargo, se puede observar que las interacciones del árbol 3 con todos los estratos presentaron la menor cantidad de protozoarios (Figura 70).

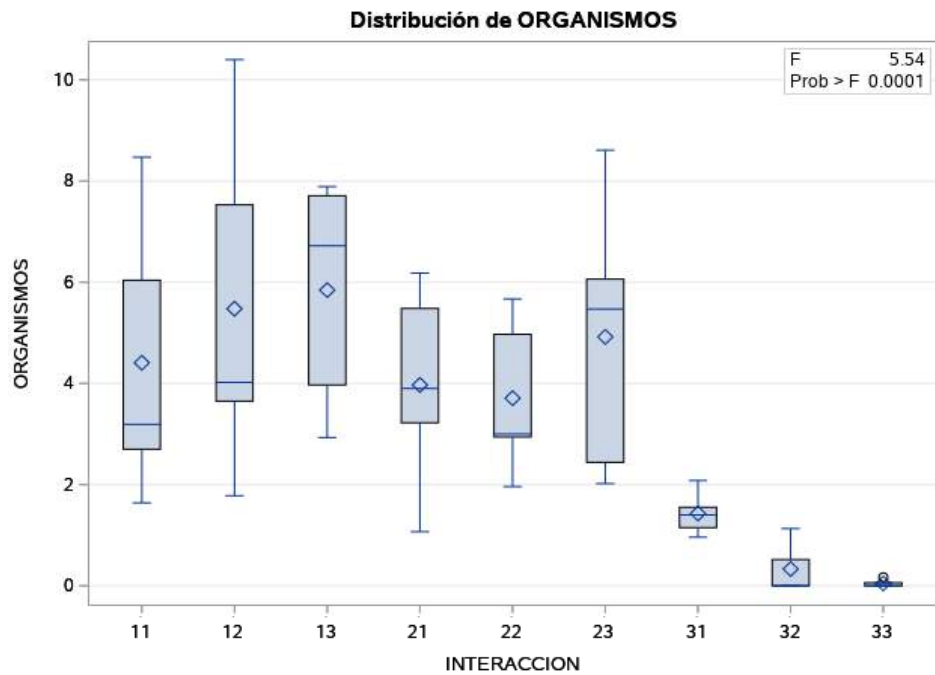


Figura 69. Distribución de datos del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hojas.

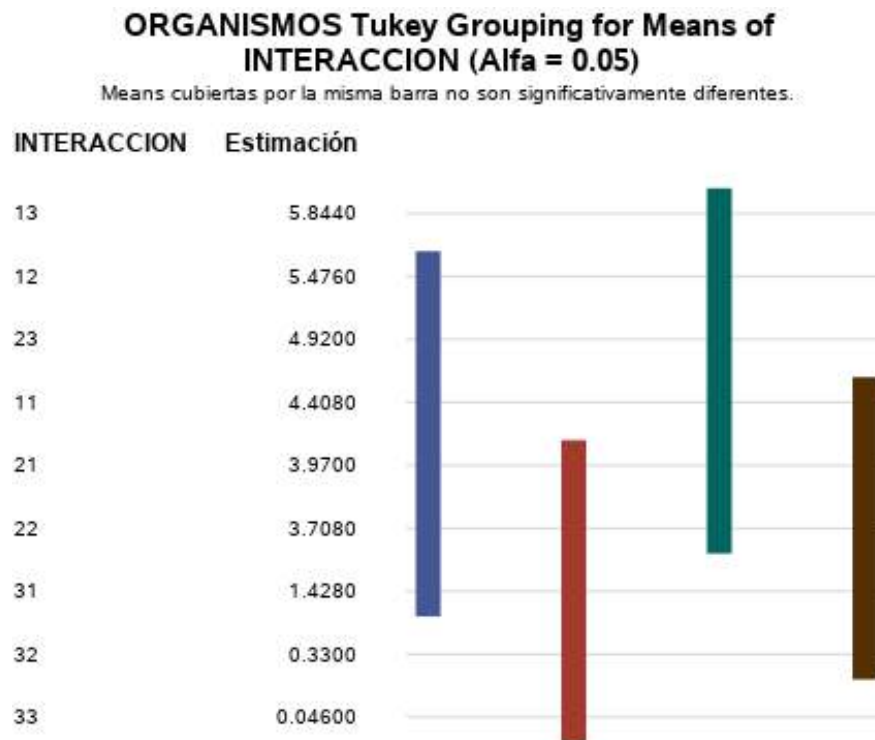


Figura 70. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de organismos presentes en hoias.

Número de cristales formados. Se encontraron diferencias significativas para las interacciones de árboles y estratos, es decir, al menos una interacción tiene efecto diferente sobre el número de cristales formados (Figura 71).

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: CRISTALES					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Modelo	8	95.2000000	11.9000000	3.35	0.0058
Error	36	128.0000000	3.5555556		
Total corregido	44	223.2000000			

R-cuadrado	Var Coef.	Raíz MSE	Media de CRISTALES
0.428523	104.7566	1.885618	1.800000

Origen	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
INTERACCION	8	95.2000000	11.9000000	3.35	0.0058

Figura 71. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de cristales formados en hojas.

Al hacer la comparación múltiple de medias se observa la mayor variabilidad de datos en la interacción del árbol 3 con el estrato inferior y con el estrato medio (Figura 72). Estadísticamente las interacciones del árbol 3 con el estrato medio y con el estrato inferior y a su vez las interacciones del árbol 1 con el estrato medio y con el estrato inferior, son las que presentaron la mayor cantidad de cristales formados (Figura 73).

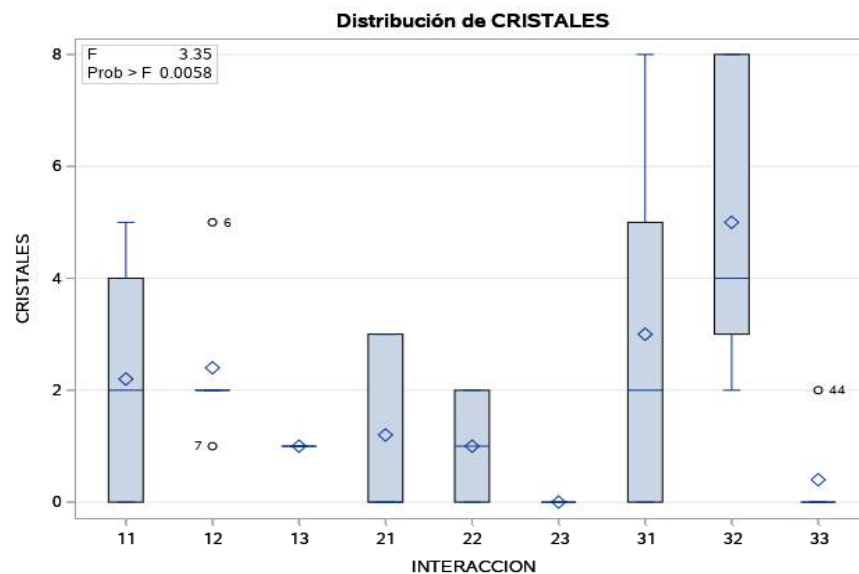


Figura 72. Análisis de varianza univariado de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de cristales formados en hojas.

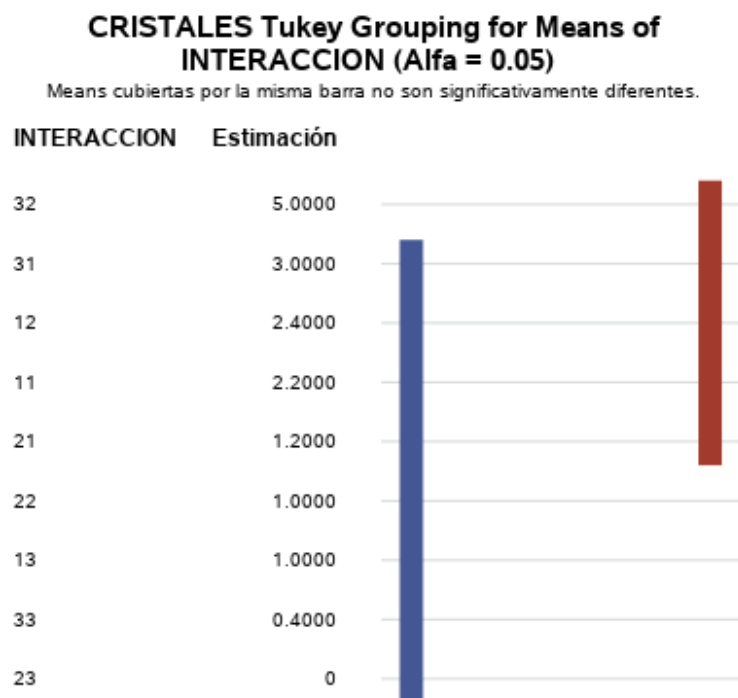


Figura 73. Grupos resultantes de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) del efecto de las interacciones entre estratos y variedades (árboles de aguacate) sobre el número de cristales formados en hojas.

Nuevamente los datos arrojan mayor progreso de la enfermedad en las interacciones del árbol 2 y un menor progreso en las interacciones del árbol 3, el cual a su vez presentó la menor cantidad de protozoarios y la mayor cantidad de cristales formados, es decir, se confirma que la expresión de la sintomatología y la formación de cristales dependen de la cantidad de protozoarios presentes, observando mayor expresión de la enfermedad cuando se tiene la presencia de más organismos y un incremento en la formación de cristales cuando el progreso de la enfermedad comienza a elevarse.

Coeficiente de correlación de Pearson

Variedades. El árbol 1 no mostró correlaciones significativas entre el número de organismos presentes y cristales formados con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, tampoco hubo correlación importante entre el número de organismos presentes con el número de cristales formados (Figura 74). El árbol 2 presentó una relación moderada entre el número de organismos presentes con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, no mostró correlación importante entre el número de organismos presentes con el número de cristales formados (Figura 75), y finalmente el árbol 3 tuvo correlación significativa únicamente entre el número de organismos presentes con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Figura 76).

Procedimiento CORR

VARIEDAD=1

3 Variables: ABCPE ORGANISMOS CRISTALES

Coeficientes de correlación Pearson, N = 15 Prob > r suponiendo H0: Rho=0			
	ABCPE	ORGANISMOS	CRISTALES
ABCPE	1.00000	-0.12021 0.6696	0.23344 0.4024
ORGANISMOS	-0.12021 0.6696	1.00000	-0.33865 0.2169
CRISTALES	0.23344 0.4024	-0.33865 0.2169	1.00000

Figura 74. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en hojas de aguacate número 1.

Procedimiento CORR

VARIEDAD=2

3 Variables: ABCPE ORGANISMOS CRISTALES

Coeficientes de correlación Pearson, N = 15 Prob > r suponiendo H0: Rho=0			
	ABCPE	ORGANISMOS	CRISTALES
ABCPE	1.00000	0.64715 0.0091	0.34897 0.2024
ORGANISMOS	0.64715 0.0091	1.00000	-0.15461 0.5822
CRISTALES	0.34897 0.2024	-0.15461 0.5822	1.00000

Figura 75. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en hojas de aguacate número 2.

Procedimiento CORR

VARIEDAD=3

3 Variables: ABCPE ORGANISMOS CRISTALES

Coeficientes de correlación Pearson, N = 15 Prob > r suponiendo H0: Rho=0			
	ABCPE	ORGANISMOS	CRISTALES
ABCPE	1.00000	0.71893 0.0025	0.05636 0.8419
ORGANISMOS	0.71893 0.0025	1.00000	-0.01048 0.9704
CRISTALES	0.05636 0.8419	-0.01048 0.9704	1.00000

Figura 76. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en hojas de aguacate número 3.

Estratos. El estrato Inferior únicamente mostró correlación moderada entre el número de organismos presentes con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Figura 77). El estrato medio presentó una correlación moderada entre el número de organismos presentes con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, así como también una correlación negativa moderada entre el número de cristales formados con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, además de una correlación negativa moderada entre el número de organismos presentes con el número de cristales formados (Figura 78). El estrato superior solamente presentó una correlación fuerte entre el número de organismos presentes con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Figura 79).

Procedimiento CORR

ESTRATO=1

3 Variables: ABCPE ORGANISMOS CRISTALES

Coeficientes de correlación Pearson, N = 15 Prob > r suponiendo H0: Rho=0			
	ABCPE	ORGANISMOS	CRISTALES
ABCPE	1.00000	0.63923 0.0103	-0.12307 0.6621
ORGANISMOS	0.63923 0.0103	1.00000	-0.13736 0.6254
CRISTALES	-0.12307 0.6621	-0.13736 0.6254	1.00000

Figura 77. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en el estrato inferior de hojas de aguacate.

Procedimiento CORR			
ESTRATO=2			
3 Variables: ABCPE ORGANISMOS CRISTALES			
Coeficientes de correlación Pearson, N = 15 Prob > r suponiendo H0: Rho=0			
	ABCPE	ORGANISMOS	CRISTALES
ABCPE	1.00000	0.62297 0.0131	-0.67963 0.0053
ORGANISMOS	0.62297 0.0131	1.00000	-0.61158 0.0154
CRISTALES	-0.67963 0.0053	-0.61158 0.0154	1.00000

Figura 78. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en el estrato medio de hojas de aguacate.

Procedimiento CORR						
ESTRATO=3						
3 Variables: ABCPE ORGANISMOS CRISTALES						
Estadísticos simples						
Variable	N	Media	Desv. est.	Suma	Mínimo	Máximo
ABCPE	15	103.83333	84.32843	1558	0	243.80000
ORGANISMOS	15	3.60333	3.24349	54.05000	0	8.61000
CRISTALES	15	0.46667	0.63994	7.00000	0	2.00000

Coeficientes de correlación Pearson, N = 15 Prob > r suponiendo H0: Rho=0			
	ABCPE	ORGANISMOS	CRISTALES
ABCPE	1.00000	0.93794 <.0001	0.06336 0.8225
ORGANISMOS	0.93794 <.0001	1.00000	0.13754 0.6250
CRISTALES	0.06336 0.8225	0.13754 0.6250	1.00000

Figura 79. Correlaciones entre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad con el número de organismos presentes y cristales formados, y correlaciones entre el número de organismos presentes y el número de cristales formados en el estrato superior de hojas de aguacate.

En la mayoría de los resultados para variedades y estratos se aprecia una correlación positiva entre el número de organismos presentes y el progreso de la enfermedad. Se obtuvo una correlación negativa entre el número de cristales formados y el progreso de la enfermedad, así como una correlación negativa entre el número de organismos y el número de cristales formados, confirmando nuevamente que el número de protozoarios influye sobre el progreso de la enfermedad y la formación de cristales como mecanismo de defensa.

CONCLUSIONES

Se presenta mayor severidad cuando existe gran cantidad de protozoarios en los vasos del xilema.

La escala logarítmica diagramática para el moteado clorótico de hojas de aguacate es una opción viable para la evaluación de daños, la cual con seis clases tuvo una buena representación.

El estrato medio presenta la mayor expresión de síntomas por la acumulación de protozoarios en los tejidos conductores.

La planta forma cristales como mecanismo de defensa antes de verse severamente afectada y su formación depende de la cantidad de organismos presentes, teniendo una relación inversa, a mayor cantidad de organismos presentes menor cantidad de cristales formados y viceversa.

El progreso de la enfermedad depende de la cantidad de organismos presentes teniendo una relación positiva, a mayor cantidad de organismos presentes mayor progreso de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Arias, F., Montoya, C., & Velásquez, O. (2018). Dinámica del mercado mundial de aguacate. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte*, 5, 22-35.
- Bautista M., N., Soto R., L., & Pérez P., R. (2009). *Tópicos selectos de estadística aplicados a la fitosanidad* (256 p.). Colegio de Postgraduados.
- Camargo, A., Carrascal L., C. E. & Díaz, P. (2019). El progreso de síntomas de enfermedad en plantas de yuca *in vitro* causado por *Xanthomonas phaseoli* pv. manihotis. *PAPELES UAN*, 1(2).
- CEDRSSA (2017). *Caso de exportación: El aguacate*. Centro de Estudios Para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Cámara de Diputados LXIII Legislatura. Palacio Legislativo de San Lázaro, Ciudad de México.
- Cristiane-Delmadi, L., Pieri, Cristiane de Pieri, Sander-Porcena, A. & Luiz-Furtado, E. (2018). Escala diagramática para cuantificación de la severidad de la roya en hojas de teca. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 331-341.
- Hernández R., L. & Sandoval I., J. S. (2015). Escala diagramática de severidad para el complejo mancha de asfalto del maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1), 95-103.
- Hernández O., J. S. (2019). *Elaboración y validación de escala diagramática de severidad de la antracnosis (Colletotrichum spp.) en lima ácida Tahití y su aplicación bajo condiciones de campo*. Tesis de grado, Universidad de los Llanos, Colombia.
- Marshall, D. S., & Rush, M. C. (1980). Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70(10), 947-950.
- Martínez, M. (2018). *México principal productor de aguacate*. El Economista. Recuperado de: <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Mexico-principal-productor-de-aguacate-20180131-0111.html>
- Retana-Sánchez, K., Castro-Zúñiga, O., & Blanco-Meneses, M. (2019). Determinación de la presencia de cristales de oxalato de calcio asociados a la enfermedad abiótica conocida como “mancha blanca” en *Hylocereus costaricensis*. *Agronomía Costarricense*, 43(2), 75-90.
- Rodríguez-Campos, J., Escobedo-Reyes, A. & Lugo-Melchor O.Y. (2017). Inocuidad en Aguacate. *Inocuidad y Trazabilidad en los Alimentos Mexicanos*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.
- Rovner, I. (1988). Fitolitos en las plantas: un factor probable en los orígenes de la agricultura. In Gordon, C. C. V. & Manzanilla, L. (Eds.) *Estudios sobre las revoluciones neolítica y urbana* (pp. 113-132). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Ruiz, A. (1961). Contribución al estudio del género *Phytomonas* Donovan en Costa Rica III. *Phytomonas davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909. *Revista de Biología Tropical*, 9(2), 227-231.
- Sanzón G., D., & Zavaleta M., E. (2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2), 154-164.
- Sherwood, R. T., Berg, C. C., Hoover, M. R., & Zeiders, K. E. (1983). Illusions in visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchardgrass. *Phytopathology*, 73(2), 173-177.
- Ward, D., Spiegel, M., & Saltz, D. (1996). Gazelle Herbivory and Interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *Journal of Chemical Ecology*, 23(2), 333-346.
- Zavala L., M. J. & Alejo, J. C. (2012). Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). *Fitosanidad*, 16(2), 83-86.

DISCUSIÓN GENERAL

En el capítulo 1 no hubo presencia ni movimiento de microorganismos en muestras de savia de tallos y hojas sin síntomas de moteado clorótico, sin embargo, en una de las muestras se percibió parte de la estructura de un nematodo, esto puede ser posible debido a que se han reportado alteraciones por la disposición de este tipo de organismos en floema y xilema, tejidos conductores encargados del transporte de savia bruta y elaborada (Bonilla, 2013; Gómez, 2015;).

Por otro lado, se detectaron pequeños protozoarios en muestras de savia de tallos y hojas síntomas de moteado clorótico, presentando pequeñas formas alargadas y ovaladas con gran movimiento, no obstante, en poca cantidad, coincidiendo con un estudio realizado en Colombia en donde una especie de protozoarios fue reportada en savia de cocoteros con síntomas de marchites sorpresiva y en Brasil con síntomas de amarillamiento de las hojas más viejas (Paz, 2000).

Se comprobó la presencia de microorganismos en los vasos de xilema, donde se distinguieron cuerpos hialinos de forma alargada y circular, en gran cantidad y con bastante movimiento, descripción que coincide con características indicadas en la literatura, referidos con forma esférica, ovalada, alargada, esférica u otra, formando colonias con pocos o numerosos individuos. Al realizar cortes histológicos de inflorescencias de cocotero con Hartrot en un estudio también se han observado de esta manera a una especie de protozoarios encontrados en el floema, llamados tripanosómidos, y en *Euphorbia lasiocarpa* en Ecuador se encontró una infección por protozoos flagelados en los tubos laticíferos, vasos del xilema y espacios intercelulares del parénquima, que pueden ser responsables de inducir síntomas como amarillamiento en plantas (Dollet & Lopez, 1978; Dollet et al., 1983; Dollet, 1984; Álvarez, 2006).

Las tinciones de los cortes no fueron satisfactorias, únicamente se tiñeron las paredes de los vasos del xilema y no la estructura de los protozoarios; la mayoría

de los estudios sobre protozoos son en humanos, animales, ríos, cascadas y aguas residuales, para los cuales se cuentan con guías para su identificación, que incluyen técnicas especiales para la preservación y/o tinción (Luna-Pabello, 2006), sin embargo, se tiene poca información para protozoarios parásitos de plantas.

El crecimiento de los protozoarios en medios de cultivo no fue exitoso, únicamente se observó la presencia de hongos y bacterias contaminantes, lo cual confirma la dificultad de su cultivo *in vitro*, ya que se han realizado numerosos intentos, obteniendo resultados desalentadores puesto que solo se ha logrado mantenerlos vivos en un medio de cultivo primario y generalmente con escasa reproducción (Ruiz, 1961; Dollet, 1984).

El crecimiento de los protozoarios en infusiones tuvo éxito, principalmente cuando se utilizó macerado en lugar de las suspensiones de cortes longitudinales y transversales. Las infusiones de arroz y chícharo fueron las que tuvieron mayor cantidad de organismos presentes, información que coincide con estudios realizados para protozoarios ciliados de vida libre de muestras de agua de lagos, en donde se han podido obtener cultivos mono específicos de estos microorganismos mediante el uso de infusiones a partir de granos de trigo o de arroz, paja, alfalfa, musgo, etc. como estrategia de alimentación sencilla en condiciones de laboratorio y se ha encontrado el éxito de la alimentación con una infusión de hojuelas de avena para promover la proliferación microbiana (Marín et al., 2017).

Las pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate fueron favorables, dado que, transcurrida una semana del establecimiento de las plantas inoculadas, se comenzaron a observar síntomas de clorosis intervenal en las hojas, presentando un patrón desuniforme, manchas pequeñas, circulares y otras más de forma irregular. Las hojas nuevas comenzaron a presentar necrosis y algunas finalmente se secaron completamente, coincidiendo con síntomas descritos por Franchini (1923) sobre el género *Phytomonas* en *Arunja angustifolia* reportado por Dollet (1984), en dónde mencionó que se presentaron hojas pálidas y

amarillentas, caída de hojas y muerte rápida, además, descubrió flagelados en la planta enferma, mientras que otras plantas cercanas de aspecto saludable de la misma especie estaban libres de ellos.

La principal manifestación de síntomas se dio entre los siete y dieciocho días posteriores a la inoculación de las plantas de aguacate, existiendo diferencias en la patogenicidad producida entre tratamientos, siendo el de macerado el que provocó síntomas en un mayor número plantas, seguido del tratamiento de arroz y finalmente el de chícharo. El testigo se mantuvo sin síntomas de moteado clorótico durante todas las evaluaciones.

En la repetición de las pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate para el aislamiento de los microorganismos, se observó la presencia de formas alargadas y circulares en los cortes de las plantas seleccionadas pertenecientes al tratamiento de infusión de arroz, en algunos vasos de xilema se mostraron en gran cantidad y con bastante movimiento, en otros se presenciaron menos adosados y un poco aislados; lo mismo ocurrió para el tratamiento de macerado, no obstante, se apreció una población inferior y en un número menor de vasos de xilema. Por otro lado, en los cortes realizados a los testigos inoculados con agua destilada los vasos de xilema lucieron sin poblaciones de protozoarios, sin embargo, se observó la presencia de algunos cristales y parte de la estructura del tejido conductor.

En este contexto al observar al patógeno en plantas enfermas, ser posible su aislamiento, obtención y crecimiento en infusiones, ser patogénico en plantas sanas y reaislado a partir del hospedador inoculado experimentalmente, se tiene el cumplimiento de los postulados de Koch, siendo un acierto importante de esta investigación, debido a que para algunas especies de protozoarios aún no se ha logrado el cumplimiento de estos postulados (Vickerman & Dollet 1992).

La prueba de nematodos en zanahoria fue negativa, debido a que a pesar de que la zanahoria ha resultado ser un medio adecuado para la multiplicación de nematodos, principalmente de especies migratorias, durante los días de revisión las rodajas inoculadas no presentaron ninguna formación de callos o masas en

la superficie, y al no tener crecimiento se indica que los nematodos presentes pueden ser de vida libre y no son los causantes del daño, ya que cuando se encuentran presentes se ha observado materia color blanco en la superficie de las zanahorias que refiere a un buen indicador del cultivo (Arevalo, 2017).

En Guatemala se han presentado dificultades en el cultivo de aguacate desde el punto de vista fitosanitario, debido a la presencia de patógenos, vectores y plagas, encontrándose alertas fitosanitarias referentes a *Candidatus Liberibacter* comúnmente conocida como Huanglongbing o HLB, encontrándose como vector al psillido *Diaphorina citri*, para el cual se cuenta con poca investigación y desarrollo de diagnósticos más certeros mediante el método de PCR en tiempo real para su identificación, por lo que por su distribución y, por las asociaciones entre los cultivos de aguacate y cítricos, no se podía dejar de lado que en nuestro país se pudiera encontrar esta problemática o alarma, sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación fueron negativos, permitiendo descartar a las variantes asiaticus, americanus y solanacearum de *Ca. Liberibacter* como agentes causales del moteado clorótico de hojas de aguacate (Franco, 2014).

En el segundo capítulo se observó que hojas con bajo grado de severidad contenían pocos organismos en los vasos del xilema y se podían apreciar espacios entre sí e incluso vasos contiguos que se encontraban vacíos, a diferencia de hojas con grado avanzado en donde se tuvo la cantidad más grande de protozoarios, adosados y en todos los vasos del xilema del área observada. Para el caso de hongos fitopatógenos Marshall & Rush (1980) mencionaron que la severidad de la enfermedad tiene una relación directa con la formación de estructuras de infección y al respecto señalaron que esta habilidad es estimulada por el hospedante, por lo que el comportamiento de los protozoarios se asemeja, a mayor cantidad de microorganismos presentes, mayor enfermedad.

Para la escala logarítmica diagramática el valor más alto de AMC obtenido de las 62 hojas analizadas fue de 1105524 px que corresponden a un 64.42 % de severidad, y el valor más bajo de 0 px y 0 % de severidad, es decir, una hoja sin

síntomas. La escala constó de seis clases, donde la clase 0 correspondió a hojas sin daños y la 6 a hojas con el máximo porcentaje de daño o severidad estimada, siendo el número de clases adecuado para la elaboración de la escala de severidad y la obtención de una buena representación, encontrando en trabajos realizados para antracnosis en lima ácida Tahití, roya en hojas de teca, complejo mancha de asfalto del maíz y antracnosis en papaya, el uso de seis a siete clases en las escalas diagramáticas hechas (Zavala & Alejo, 2012; Hernández & Sandoval, 2015; Cristiane-Delmadi et al., 2018; Hernández, 2019).

La escala elaborada tuvo una precisión $R^2=0.82$ considerada como media y una exactitud (b_1) de 1.07 evaluada como una exactitud perfecta, los evaluadores mostraron una tendencia a subestimar positivamente la severidad de la enfermedad, similar a la subestimación en la validación de la escala para el complejo mancha de asfalto del maíz y en la escala para antracnosis en papaya (Hernández & Sandoval, 2015; Cristiane-Delmadi et al., 2018).

Se obtuvo un índice de reproducibilidad de 1.0, un error del 8 % y se mostró una buena estimación de reproducibilidad debido a la similitud de sus evaluaciones; se ha encontrado que la exactitud es mayor para evaluadores con experiencia en la cuantificación de enfermedades, por lo que el hecho de que en la presente investigación los evaluadores no contaran con dicha experiencia fue un factor influyente, además de factores externos como el tamaño y color de la lesión, la intensidad de luz, la fatiga del evaluador al momento de la evaluación o algunos otros que no pueden ser controlados y que afectan la precisión y exactitud de las evaluaciones visuales, no obstante, debido a la proximidad de los valores de severidad estimados a los valores de la intensidad real, la validación de la escala logarítmica diagramática para el moteado clorótico de hojas de aguacate obtuvo resultados favorables, siendo una opción viable para la evaluación de daños (Sherwood et al., 1983; Hernández & Sandoval, 2015; Cristiane-Delmadi et al., 2018).

Se tuvo rapidez en el progreso de la enfermedad, encontrando el árbol 2 con los valores más altos, seguido del árbol 1 y finalmente el árbol 3, todos

principalmente en el estrato inferior, esta rapidez en el progreso de la enfermedad también se ha indicado en plantas de yuca *in vitro*, al ser estudiados síntomas causados por *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihoti*, en donde se observó una tendencia similar del ABCPE en 28 días, además de que dicha investigación permitió caracterizar el perfil patogénico de esta bacteria (Camargo et al., 2019).

El árbol con más cristales formados fue el ejemplar 3, con 25 cristales en el estrado medio, estos cristales presentaron forma romboidal y se hicieron presentes en tejido enfermo tanto con síntomas iniciales como en estados avanzados; se ha encontrado que las plantas forman cristales de diferente morfología y composición como mecanismo de resistencia y defensa de la planta a plagas y enfermedades. En tal sentido, en pitaya se determinó la presencia de cristales de oxalato de calcio asociados a la enfermedad abiótica conocida como “mancha blanca”, en donde con un análisis por microscopía electrónica de tejido afectado se observaron cristales con forma de rafidio y cubos compuestos de carbono, oxígeno y calcio, principalmente y por medio de difracción de rayos X se confirmó la presencia de oxalatos en tejido enfermo (Rovner, 1988; Ward et al., 1996; Retana-Sánchez et al., 2019).

Los datos arrojados en los análisis de varianza mostraron un progreso de la enfermedad para todos los árboles principalmente en el estrato medio, esto puede deberse al movimiento de los protozoarios a lo largo de los tejidos conductores, que en cierto momento tienden a concentrarse en un punto. El árbol 1 fue el que presentó el mayor incremento y a su vez la mayor cantidad de organismos presentes, mientras que el árbol 3 tuvo el menor progreso de la enfermedad y la menor cantidad de organismos, lo que confirma que, a mayor cantidad de microorganismos presentes, mayor enfermedad (Ruiz, 1961).

En ese mismo sentido, el árbol 3 que presentó la menor severidad fue el que tuvo la mayor cantidad de cristales, por lo que es posible que cuando el árbol aún no presenta un número fuerte de organismos no forme una cantidad grande de cristales, los cuales empiezan a incrementarse cuando el árbol comienza a presentar un aumento en la presencia de protozoarios, además, cuando la

cantidad de organismos rebasa su capacidad decide ya no continuar con la formación de estos cristales, lo que podría estar asociado con la muerte celular programada, dado que cuando una planta presenta una enfermedad en progreso las células que rodean el sitio donde se encuentra algún patógeno se suicidan con la intención de detener su avance; esta muerte genera cambios morfológicos y estructurales y por lo tanto un alto en los procesos normales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, entre ellos, la producción de sustancias y mecanismos de defensa (Sanzón & Zavaleta, 2011).

Respecto a las interacciones, se tuvo mayor progreso de la enfermedad en las interacciones del árbol 2 y un menor progreso en las interacciones del árbol 3, el cual a su vez presentó la menor cantidad de protozoarios y la mayor cantidad de cristales formados, es decir, se confirma que la expresión de la sintomatología y la formación de cristales dependen de la cantidad de protozoarios presentes, observando mayor expresión de la enfermedad cuando se tiene la presencia de más organismos y un incremento en la formación de cristales cuando el progreso de la enfermedad comienza a elevarse.

Las pruebas del coeficiente de correlación de Pearson para variedades y estratos mostraron una correlación positiva entre el número de organismos presentes y el progreso de la enfermedad. Se obtuvo una correlación negativa entre el número de cristales formados y el progreso de la enfermedad, así como una correlación negativa entre el número de organismos y el número de cristales formados, confirmando nuevamente que el número de protozoarios influye sobre el progreso de la enfermedad y la formación de cristales como mecanismo de defensa.

CONCLUSIONES GENERALES

Por su forma, movimiento y comportamiento, son protozoarios los microorganismos que causan el moteado clorótico de hojas en plantas de aguacate, los cuales se pudieron reproducir mediante infusiones, principalmente de chícharo y arroz.

Los protozoarios son patogénicos en plantas de aguacate, causando como primeros síntomas clorosis, secamiento de hojas y nuevos brotes; fue posible el cumplimiento de los postulados de Koch.

Los síntomas de moteado clorótico de hojas de aguacate no son producidos por nematodos ni por las variantes *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. liberibacter americanus* y *Ca. liberibacter solanacearum*.

La escala logarítmica diagramática para el moteado clorótico de hojas de aguacate es una opción viable para la evaluación de daños, la cual con seis clases tuvo una buena representación.

La planta forma cristales como mecanismo de defensa antes de verse severamente afectada y su formación depende de la cantidad de organismos presentes, teniendo una relación inversa, a mayor cantidad de organismos presentes menor cantidad de cristales formados y viceversa.

El progreso de la enfermedad depende de la cantidad de organismos presentes teniendo una relación positiva, a mayor cantidad de organismos presentes mayor progreso de la enfermedad.

ANEXOS

Anexo 1. Evaluaciones realizadas a los 3 árboles bajo estudio para conocer el Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad.

Árbol	Estrato	Hoja	Clase Evaluación 1	Sev1	Clase Evaluación 2	Sev 2	Clase Evaluación 3	Sev3	Clase Evaluación 4	Sev4	Clase Evaluación 5	Sev5	ABCPE
1	Inferior	1	3	15.9	4	39.8	3	15.9	3	15.9	4	39.8	198.9
1	Inferior	2	3	15.9	2	6.3	4	39.8	4	39.8	3	15.9	203.6
1	Inferior	3	2	6.3	3	15.9	4	39.8	5	65	3	15.9	263.6
1	Inferior	4	2	6.3	3	15.9	4	39.8	4	39.8	3	15.9	213.2
1	Inferior	5	3	15.9	3	15.9	3	15.9	4	39.8	4	39.8	198.9
1	Medio	1	2	6.3	3	15.9	3	15.9	4	39.8	3	15.9	165.4
1	Medio	2	4	39.8	3	15.9	4	39.8	3	15.9	3	15.9	198.9
1	Medio	3	3	15.9	3	15.9	4	39.8	3	15.9	3	15.9	175
1	Medio	4	3	15.9	2	6.3	2	6.3	4	39.8	3	15.9	136.6
1	Medio	5	4	39.8	2	6.3	3	15.9	3	15.9	3	15.9	131.9
1	Superior	1	3	15.9	4	39.8	2	6.3	3	15.9	3	15.9	155.8
1	Superior	2	4	39.8	3	15.9	3	15.9	3	15.9	2	6.3	141.5
1	Superior	3	4	39.8	3	15.9	2	6.3	3	15.9	4	39.8	155.8
1	Superior	4	4	39.8	3	15.9	4	39.8	3	15.9	4	39.8	222.8
1	Superior	5	3	15.9	2	6.3	3	6.3	3	15.9	3	15.9	88.8
2	Inferior	1	3	15.9	3	15.9	3	15.9	5	65	3	15.9	225.4
2	Inferior	2	3	15.9	4	39.8	2	6.3	3	15.9	4	39.8	179.7
2	Inferior	3	4	39.8	3	15.9	4	39.8	3	15.9	4	39.8	222.8
2	Inferior	4	4	39.8	4	39.8	4	39.8	4	39.8	3	15.9	294.5
2	Inferior	5	1	2.5	3	15.9	3	15.9	3	15.9	3	15.9	113.8
2	Medio	1	4	39.8	3	15.9	4	39.8	3	15.9	4	39.8	222.8

Anexo 1. Continuación...

Árbol	Estrato	Hoja	Clase Evaluación 1	Sev1	Clase Evaluación 2	Sev 2	Clase Evaluación 3	Sev3	Clase Evaluación 4	Sev4	Clase Evaluación 5	Sev5	ABCPE
2	Medio	2	2	6.3	3	15.9	3	15.9	5	65	3	15.9	215.8
2	Medio	3	3	15.9	2	6.3	3	15.9	3	15.9	3	15.9	108
2	Medio	4	2	6.3	3	15.9	4	39.8	2	6.3	5	65	195.3
2	Medio	5	4	39.8	4	39.8	2	6.3	4	39.8	3	15.9	227.5
2	Superior	1	4	39.8	3	15.9	3	15.9	3	15.9	3	15.9	151.1
2	Superior	2	4	39.8	1	2.5	4	39.8	4	39.8	4	39.8	243.8
2	Superior	3	2	6.3	2	6.3	3	15.9	2	6.3	4	39.8	103.1
2	Superior	4	4	39.8	4	39.8	3	15.9	3	15.9	2	6.3	189.3
2	Superior	5	2	6.3	2	6.3	2	6.3	3	15.9	3	15.9	79.2
3	Inferior	1	1	2.5	2	6.3	1	2.5	1	2.5	2	6.3	31.4
3	Inferior	2	1	2.5	1	2.5	1	2.5	0	0	1	2.5	15
3	Inferior	3	2	6.3	1	2.5	2	6.3	1	2.5	1	2.5	31.4
3	Inferior	4	1	2.5	1	2.5	1	2.5	3	15.9	1	2.5	46.8
3	Inferior	5	1	2.5	1	2.5	2	6.3	2	6.3	2	6.3	39
3	Medio	1	0	0	1	2.5	0	0	1	2.5	1	2.5	12.5
3	Medio	2	1	2.5	0	0	0	0	1	2.5	1	2.5	10
3	Medio	3	0	0	0	0	2	6.3	1	2.5	0	0	17.6
3	Medio	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2.5	2.5
3	Medio	5	1	2.5	0	0	2	6.3	0	0	0	0	15.1
3	Superior	1	0	0	0	0	1	2.5	0	0	1	2.5	7.5
3	Superior	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Superior	3	0	0	0	0	0	0	1	2.5	1	2.5	7.5
3	Superior	4	0	0	0	0	0	0	1	2.5	0	0	5
3	Superior	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6.3	6.3

Anexo 2. Número de píxeles totales (PT), número de píxeles ocupados por los protozoos (PO), datos de PO expresado en porcentaje y número de cristales presentes en el área observada de cortes longitudinales de peciolo y hojas con síntomas de moteado clorótico del árbol 1.

No. Hoja	Estrato Inferior				Estrato Medio				Estrato Superior			
	PT	PO	%	Cristales	PT	PO	%	Cristales	PT	PO	%	Cristales
Hoja 1	4496181	381046	8.47	0	4580975	81396	1.78	5	5284990	154816	2.93	1
Hoja 2	5108838	308555	6.04	5	5389424	405732	7.53	1	4474314	300683	6.72	1
Hoja 3	4886848	132048	2.70	4	4543697	182843	4.02	2	4602261	354954	7.71	1
Hoja 4	4735496	77511	1.64	2	4529963	165133	3.65	2	4487606	354211	7.89	1
Hoja 5	5376462	171357	3.19	0	4423862	459989	10.40	2	4565409	181110	3.97	1

Anexo 3. Número de píxeles totales (PT), número de píxeles ocupados por los protozoos (PO), datos de PO expresado en porcentaje y número de cristales presentes en el área observada de cortes longitudinales de peciolo y hojas con síntomas de moteado clorótico del árbol 2.

No. Hoja	Estrato Inferior				Estrato Medio				Estrato Superior			
	PT	PO	%	Cristales	PT	PO	%	Cristales	PT	PO	%	Cristales
Hoja 1	4510375	175900	3.90	3	4609732	261214	5.67	0	4487247	245380	5.47	0
Hoja 2	4555026	146834	3.22	0	4523804	132923	2.94	1	4660775	401247	8.61	0
Hoja 3	4585365	283374	6.18	0	4921094	147572	3.00	2	4492427	109559	2.44	0
Hoja 4	4577857	250710	5.48	3	4487949	88112	1.96	2	4537667	275054	6.06	0
Hoja 5	4494740	48262	1.07	0	4692660	233013	4.97	0	5200850	105095	2.02	0

Anexo 4. Número de píxeles totales (PT), número de píxeles ocupados por los protozoos (PO), datos de PO expresado en porcentaje y número de cristales presentes en el área observada de cortes longitudinales de peciolo y hojas con síntomas de moteado clorótico del árbol 3.

No. Hoja	Estrato Inferior				Estrato Medio				Estrato Superior			
	PT	PO	%	Cristales	PT	PO	%	Cristales	PT	PO	%	Cristales
Hoja 1	4461065	62419	1.40	8	4562708	23917	0.52	3	4435399	0	0.00	0
Hoja 2	4517934	51871	1.15	5	4566018	51454	1.13	2	4499575	7552	0.17	0
Hoja 3	4534574	94215	2.08	2	5200124	0	0.00	8	4993325	3083	0.06	0
Hoja 4	4721597	45370	0.96	0	4346004	0	0.00	4	5271901	0	0.00	2
Hoja 5	4500300	69832	1.55	0	4684898	0	0.00	8	4428389	0	0.00	0