



Artículo Científico

Uniformidad en el desarrollo de brotes en injertos de aguacate y su importancia para establecer niveles de resistencia indirecta a *Phytophthora cinnamomi*

Yeison David López-Galé*, Mauricio Fernando Martínez, Lizeth Paola Palacios Joya, Nubia Murcia-Riaño, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira. Diagonal a la Intersección de la Carrera 36ª con Calle 23, Palmira, Valle de Cauca, C. P. 763533, Colombia; Mario Augusto García-Dávila, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Carrera 32 # 12-00, Palmira, Valle de Cauca, C. P. 763533, Colombia.

*Autor de

correspondencia:

Yeison David López-Galé
ylopezga@agrosavia.co

Sección:

Edición periódica

Recibido:

22 Noviembre, 2023

Aceptado:

16 Julio, 2024

Publicado:

08 Agosto, 2024

Cita:

López-Galé YD, Fernando MM, Palacios JLP, Murcia-Riaño N y García-Dávila MA. 2024. Uniformidad en el desarrollo de brotes en injertos de aguacate y su importancia para establecer niveles de resistencia indirecta a *Phytophthora cinnamomi*.

Revista Mexicana de Fitopatología 42(3): 31.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2311-1>



RESUMEN

Antecedentes / Objetivo. El nivel de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* en germoplasma de aguacate puede ser evaluado de forma indirecta a través de la inoculación del patógeno por herida al tallo. El objetivo de este trabajo fue comparar el método de desarrollo convencional de injertos y el método de injertos etiolados para determinar niveles de resistencia indirecta a *P. cinnamomi* a través de la técnica de inoculación por herida al tallo.

Materiales y métodos. En el estudio, se utilizaron tres aislamientos de *P. cinnamomi* y dos genotipos de aguacate con diferente nivel de resistencia al patógeno, Duke-7 (medianamente resistente) y Hass (susceptible). La multiplicación clonal de los genotipos se realizó con yemas injertadas sobre portainjertos propagados por semillas de aguacate antillano. La inoculación fue realizada en el brote a la altura de 8 cm y el crecimiento de las lesiones se midieron durante 24 días. Con los datos, se determinó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) y el Coeficientes de Variación (CV). La información fue analizada con un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2*2*3 (Método*Genotipo*Aislamiento).

Resultados. El análisis de varianza para el ABCPE no mostró diferencias entre métodos ($p=0.1881$); sin embargo, se presentaron diferencias entre genotipos, aislamientos y entre las interacciones genotipo*método y genotipo*aislamiento ($p\leq 0.05$). Con el método convencional, el desarrollo de los brotes fue tardío (141-159 días) y el tamaño de las lesiones fue altamente variable ($CV=38.9-64.4\%$).

Los brotes etiolados y reverdecidos en vivero, por el contrario, presentaron rápido crecimiento (101-107 días) y mayor uniformidad en las lesiones generadas por el patógeno (CV=11.1-24.2 %), lo que permitió discriminar niveles de resistencia entre genotipos, así como grados de agresividad entre aislamientos.

Conclusión. El desarrollo de brotes etiolados en injertos de aguacate se propone como un método alternativo rápido que puede garantizar mayor uniformidad en el desarrollo de lesiones dentro de las unidades experimentales de un tratamiento, logrando de esta manera mayor confiabilidad al momento de evaluar y seleccionar de forma preliminar genotipos de aguacate con atributos de resistencia indirecta a *P. cinnamomi*.

Palabras clave: *Persea americana*, etiolación, virulencia, mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

La caracterización y evaluación de los recursos fitogenéticos del aguacate (*Persea americana*) (Lauraceae) constituye un área de investigación estratégica que puede responder a retos en sistemas productivos actuales y futuros (Ben-Ya'acov y Zilbersteine, 1999). Una de las principales limitantes del cultivo en la actualidad, es la pudrición de raíz causada por el oomicete *Phytophthora cinnamomi* (Peronosporaceae). Este patógeno destruye las raíces finas afectando la captación de agua y nutrientes, lo que conlleva al desarrollo de síntomas secundarios en el follaje y a mediano plazo muerte de la planta (Mora-Aguilera *et al.*, 2007). El manejo de esta problemática es limitado y se recomienda abordarla desde una perspectiva integrada (Drenth y Guest, 2004; Ramírez-Gil *et al.*, 2017), en donde el uso de portainjertos con atributos de resistencia a *P. cinnamomi* se propone como una de las principales opciones, debido a que, al ser combinada con otras prácticas de manejo de forma adecuada puede ser una alternativa de solución sostenible a mediano y largo plazo (Engelbrecht y Van den Berg, 2013).

El nivel de resistencia a *P. cinnamomi* en germoplasma de aguacate puede ser evaluado de forma indirecta a través de la técnica de inoculación por herida al tallo. Esta técnica de selección emplea la propagación vegetativa de germoplasma de aguacate a través de yemas injertadas sobre portainjertos desarrollados por semilla sexual. Cuando el brote injertado obtiene el desarrollo adecuado, se realiza una pequeña herida en el tallo en la que se inserta un disco de PDA (Agar-Papa-Dextrosa) con micelio del patógeno, sobre el cual se evalúa el progreso de la lesión durante un tiempo determinado (Dolan y Coffey, 1986; Gabor y Coffey, 1991; Rodríguez *et al.*, 2017). Esta es una técnica probada como método alternativo preliminar para

la detección rápida y conveniente de genotipos de aguacate potencialmente resistentes a *P. cinnamomi*, debido a su fácil reproducibilidad y favorable correlación con el método de inoculación directa en raíz (Dolan y Coffey, 1986; Gabor y Coffey, 1991; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). Sin embargo, el uso de esta técnica de selección debe garantizar la mayor uniformidad en el desarrollo vegetativo de los injertos, especialmente en tamaño, grado de lignificación y diámetros de tallo adecuados para la inoculación, esto con el propósito de obtener menor variación en el área de las lesiones en las unidades experimentales de un genotipo al ser inoculado con *P. cinnamomi* (Gabor y Coffey, 1991; Rodríguez *et al.*, 2017).

El objetivo de este trabajo fue comparar y caracterizar dos métodos de desarrollo de brotes en injertos de aguacate para determinar niveles de resistencia indirecta a *P. cinnamomi* a través de la técnica de inoculación por herida al tallo, esto con el propósito de disponer de un método adecuado de multiplicación y de desarrollo de brotes, que permita la mayor fiabilidad al momento de evaluar y seleccionar de forma preliminar genotipos de aguacate con atributos de resistencia al patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El trabajo fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación Palmira de AGROSAVIA, Valle del Cauca, Colombia (03°30'43.6" LN y 76°18'53.5" LO; 1001 msnm), durante octubre de 2019 a marzo de 2020.

Acondicionamiento de semillas y producción de portainjertos. Para la producción de portainjertos se utilizaron semillas de aguacate antillano (*P. americana* var. *americana*) provenientes de árboles reconocidos como donadores de semilla del centro productor de Alvarado (Tolima, Colombia) (Berdugo-Cely *et al.*, 2023; López-Galé *et al.*, 2022). La extracción de semillas se realizó de forma manual de frutos sanos y en etapa de madurez fisiológica. Para garantizar la limpieza y desinfección de las semillas la cubierta seminal fue retirada completamente. A todas se les realizó corte apical de 1 cm para facilitar la emergencia del epicótilo. Posteriormente, fueron desinfectadas con una solución de 2 cm³ L⁻¹ Fosetyl + Propamocard y 3 g L⁻¹ Carboxin + Captan por 2 minutos.

El sustrato utilizado para la germinación fue arena fina previamente solarizada y desinfectada con 2 cm³ L⁻¹ Fosetyl + Propamocard. Las semillas una vez sembradas permanecieron bajo cubierta plástica y polisombra color negro con reducción de luz del 50 % hasta obtener emergencia del epicótilo mayor a 1 cm, el cual marcaba el momento óptimo de trasplante a bolsa de vivero con sustrato. El sustrato utilizado en el trasplante fue turba, cascarilla de arroz, arena y vermiculita en relaciones 4:2:1:1, respectivamente, previamente solarizado y desinfectado con 2 cm³ L⁻¹ Fosetyl + Propamocard.

Propagación vegetativa de germoplasma de aguacate. Se seleccionaron dos genotipos de aguacate con diferente grado de resistencia y susceptibilidad a *P. cinnamomi* de la Colección Colombiana de Germoplasma de Aguacate (AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira). Los genotipos seleccionados fueron aguacate var. 'Hass' identificado como genotipo susceptible (Rodríguez *et al.*, 2017; Sánchez-González *et al.*, 2019) y el clon estándar 'Duke-7' reportado como genotipo medianamente resistente a *P. cinnamomi* (Barrientos-Priego *et al.*, 2007; Kellam y Coffey, 1985). La multiplicación clonal de los genotipos de aguacate se realizó con yemas injertadas en púa terminal sobre portainjertos previamente propagados por semilla. Las yemas de cada genotipo fueron colectadas, procesadas y desinfectadas atendiendo las recomendaciones de Rodríguez *et al.* (2017).

Método convencional de desarrollo de injertos. El método se tomó a partir de las recomendaciones establecidas por Bernal-Estrada y Díaz-Díez (2020), en donde se dan los lineamientos para la propagación de material de siembra en vivero. En este método, las semillas germinadas de aguacate antillano fueron trasplantadas a bolsas de vivero color negro con capacidad volumétrica de 6 L de sustrato. El injerto de las yemas de aguacate Hass y Duke-7 se realizó a la altura de 20 cm con respecto a la base del tallo del portainjerto, garantizando como mínimo diámetro en el portainjerto ≥ 6 mm. Las plántulas injertadas permanecieron bajo cubierta plástica y polisombra color negro con reducción de luz del 50 % hasta obtener prendimiento y alturas de brotes mayor a 30 cm y diámetros de tallo ≥ 6 mm a la altura de 8 cm por encima del punto de injertación (Figura 1A).

Método de desarrollo de injertos etiolados. El método fue ajustado a partir del protocolo descrito por Frolich y Platt (1972), para la propagación de portainjertos clonales y las recomendaciones establecidas por Gabor y Coffey (1985), para evaluar germoplasma de aguacate frente a *P. cinnamomi*. En este método, el trasplante de las semillas germinadas se realizó sobre bolsas negras de vivero con capacidad volumétrica de 0.5 L de sustrato. Las yemas de aguacate Hass y Duke-7 se injertaron a la altura de 3 cm con respecto a la base del tallo del portainjerto, garantizando que como mínimo a esta altura el portainjerto tuviera un diámetro ≥ 6 mm. Las plantas injertadas se trasladaron a cámara oscura o de etiolación al observar prendimiento del injerto y desarrollo de brote apical mayor a 1 cm, esto con la finalidad de garantizar su viabilidad antes de entrar a la cámara de etiolación (Figura 1B).

La etiolación de los brotes fue de aproximadamente 25 días, durante este proceso la cámara de etiolación presentó temperatura promedio de 25.8 °C (Intervalo: 23.9–26.9 °C) y humedad relativa promedio del 88.1 % (Intervalo: 76.1–93.5 %). Las plántulas etioladas fueron trasladadas a condiciones de casa malla con cubierta plástica y polisombra color negro con reducción de luz del 50 % cuando registraron

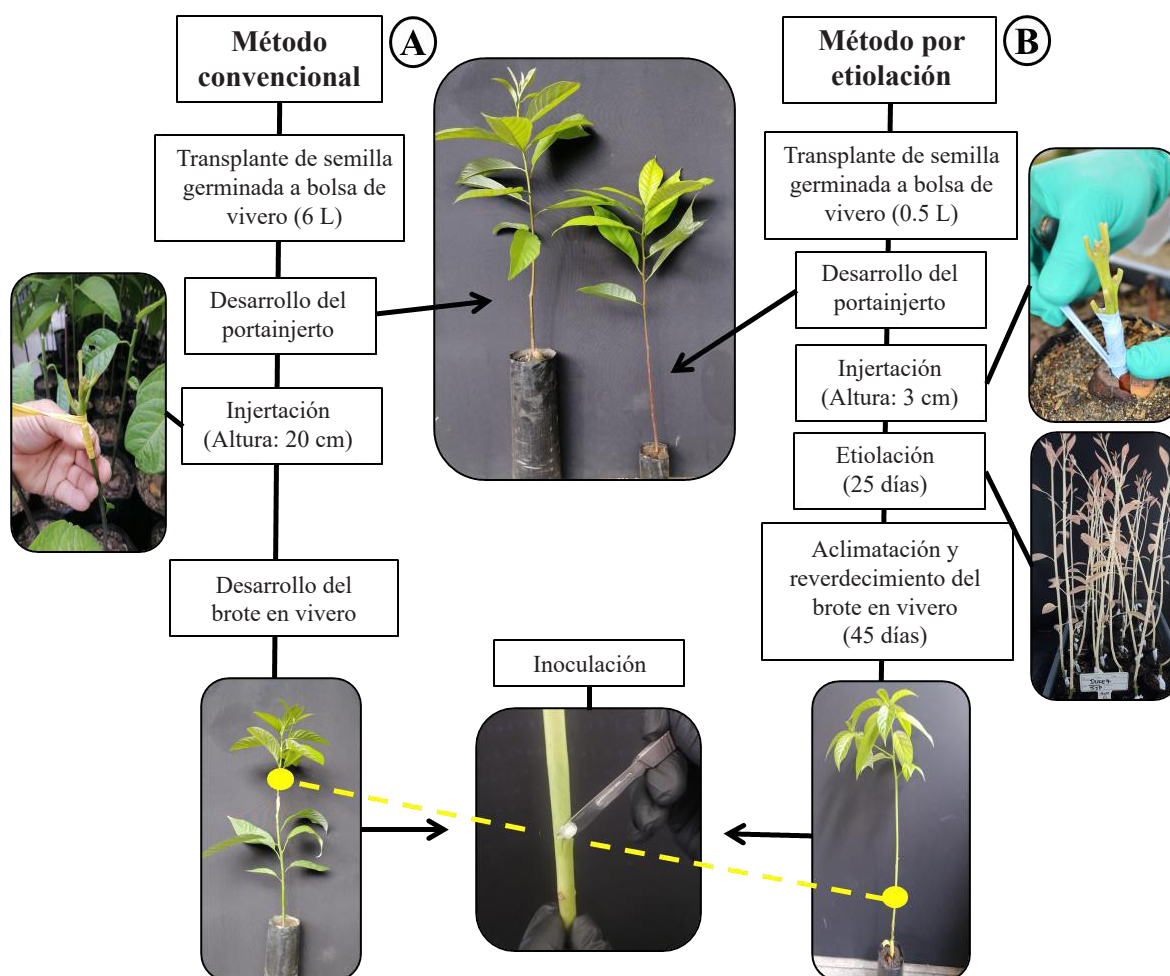


Figura 1. Proceso de propagación y desarrollo de brotes en injertos de aguacate. A) Método convencional de desarrollo de injertos, B) método de desarrollo de injertos etiolados. Los puntos y líneas amarillos indican la ubicación en donde se realizó la herida e inoculación de *P. cinnamomi*.

tamaño mayor a 30 cm de alto y diámetros de tallo ≥ 6 mm a la altura de 8 cm por encima del punto de injertación. El tiempo de aclimatación y reverdecimiento de los brotes etiolados fue de 45 días (Schmidt, 1986) (Figura 1B).

Aislamientos de *Phytophthora cinnamomi*. Para la obtención y producción de inóculo de *P. cinnamomi*, se realizó la reactivación de tres aislamientos conservados en la colección de trabajo del laboratorio de fitopatología de AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira, los cuales han sido previamente evaluados y catalogados como altamente virulentos en pruebas de patogenicidad (Palacios-Joya *et al.*, 2023;

Rodríguez *et al.*, 2017; Rodríguez-Polanco *et al.*, 2015). Los aislamientos seleccionados fueron: Ag-A-041 colectado en el corregimiento de Tribunas Córcega en el departamento de Risaralda, Ag-A-003 procedente de municipio de Rionegro en el departamento de Antioquía y Tamb-009 colectado en el municipio de El Tambo, departamento del Cauca. Los tres aislamientos de *P. cinnamomi* provienen de muestras de raíces colectadas en árboles de aguacate con síntomas de marchitez.

La reactivación de los aislamientos se realizó en manzanas verdes de acuerdo con la metodología de Erwin y Ribeiro (1996). En cámara de flujo laminar, las manzanas fueron desinfectadas superficialmente con alcohol al 96 %, luego con hipoclorito de sodio al 1 % y posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. De la parte media de las manzanas, se extrajo una porción de pulpa creando un orificio de 1 cm de profundidad con un sacabocados de 1 cm de diámetro previamente esterilizado. En el orificio se colocó un disco de PDA con micelio de cada aislamiento conservado. Finalmente, el orificio fue cerrado con la pulpa extraída y cubierto con cinta Parafilm. Las manzanas fueron depositadas en cámara húmeda a 28 °C hasta obtener necrosis de corteza.

A partir de las necrosis observadas en las manzanas, se tomaron pequeños fragmentos de tejido sano y necrosado (5 mm²) que fueron sembrados en cajas Petri con un medio de cultivo selectivo para *Phytophthora* (PDA + fungicidas + antibióticos) (Tsao y Guy, 1983). El crecimiento en caja Petri de los tres aislamientos se realizó en incubadora a 28 °C y la confirmación taxonómica se realizó por caracterización morfológica macroscópica de crecimiento de colonia y microscópica de estructuras vegetativas y reproductivas (Abad *et al.*, 2023).

Inoculación. La inoculación con *P. cinnamomi* se realizó por medio de la técnica de herida al tallo (Dolan y Coffey, 1986; Gabor y Coffey, 1991; Rodríguez *et al.*, 2017; Rodríguez-Polanco *et al.*, 2015). La herida fue realizada a la altura de 8 cm por encima del punto de injertación, para lo cual se levantó un fragmento de corteza de 10 mm de largo por 5 mm de ancho y un 1 mm de profundidad. En la herida se colocó un disco de PDA de 6 mm de diámetro con micelio de cada uno de los tres aislamientos de *P. cinnamomi* evaluados de forma individual (Figura 1). En las plantas testigo se insertaron discos de PDA de 6 mm de diámetro sin inóculo. La herida fue cubierta con cinta Parafilm para fijar el inóculo, evitar la contaminación y asegurar la colonización del patógeno al tejido.

Parámetros de comparación y análisis de datos. En cada método se cuantificó el número de días que tardaron los injertos en alcanzar el diámetro de inoculación (≥ 6 mm) a la altura de 8 cm por encima del punto de injertación.

El área de las lesiones generadas por *P. cinnamomi* se determinó mediante la medición del largo y ancho cada tres días hasta completar 24 días de evaluación.

Con los datos obtenidos se determinó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) y sus respectivos Coeficientes de Variación (CV). Durante todo el periodo de evaluación se documentó la aparición de síntomas de enfermedad a través de la identificación de necrosis, clorosis, marchitez y muerte de los injertos. Las condiciones climáticas de temperatura (°C) y humedad relativa (%) en casa malla fueron monitoreadas con una Miniestación WatchDog 2475.

Se realizaron cortes histológicos de tallos en injertos de aguacate Hass y Duke-7 con el fin de conocer la estructura tisular de los brotes en cada método antes de realizar la inoculación con *P. cinnamomi*. Los cortes histológicos fueron realizados con la metodología de Andrade-Hoyos *et al.* (2015).

El estudio se evaluó bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2*2*3, donde el primer factor correspondió a los métodos de desarrollo de brotes evaluados, el segundo factor a los genotipos de aguacate y el tercer factor a los tres aislamientos de *P. cinnamomi*. Por tratamiento se consideraron tres repeticiones y por repetición tres plantas como unidad experimental. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) y las comparaciones de medias se determinaron con la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$). Los datos fueron procesados con el programa estadístico SAS versión 9.4 (Statistical Analysis System) para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los tiempos de desarrollo de los brotes de acuerdo con los métodos evaluados ($F=12.18$; $p \leq 0.05$). En los dos genotipos de aguacate (Hass y Duke-7), los brotes sometidos a etiolación y posterior reverdecimiento en condiciones de vivero presentaron rápido crecimiento y desarrollo en comparación con el método convencional.

El desarrollo del diámetro mínimo estimado (6 mm) a la altura de 8 cm por encima del punto de injertación en brotes etiolados de aguacate Hass, se obtuvo a los 101 días y en Duke-7 a los 107 días en promedio; mientras que, en brotes propagado por el método convencional el diámetro mínimo en aguacate Hass se obtuvo a los 141 días y en Duke-7 a los 159 días en promedio (Cuadro 1). Lo anterior indica que, para aguacate Hass y Duke-7 la obtención de diámetros de tallos adecuados para la inoculación con *P. cinnamomi* a través del método de etiolación, puede reducir los tiempos de desarrollo de los brotes (medido en días) hasta en un 30.6 % en promedio, comparado con los brotes desarrollados por el método convencional. Además, la etiolación de los injertos también pudo garantizar mayor uniformidad en el desarrollo de los brotes, lo cual puede ser explicado por los bajos CV obtenidos para aguacate Hass (5.14 %) y para Duke-7 (5.51 %) (Cuadro 1).

Los diámetros adecuados para inoculación (≥ 6 mm) en cámara de etiolación se obtuvieron entre los 19 y 25 días posterior a la injertación en ambos genotipos.

Cuadro 1. Desarrollo vegetativo estimado (días) de injertos de aguacate Hass y Duke-7 propagados por el método convencional y por etiolación.

Método	Genotipo	Desarrollo vegetativo (días)	
		Promedio \pm D.E. ^x	CV ^y (%)
Convencional	Hass	141 \pm 12.8 a*	9.07
	Duke-7	159 \pm 14.1 a	8.86
Etiolación	Hass	101 \pm 5.2 b	5.14
	Duke-7	107 \pm 5.9 b	5.51
		DMS ^z = 38.2	

*valores promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes.

^xD.E.: desviación estándar

^yCV: coeficiente de variación

^zDMS: diferencia mínima significativa

Además, se corroboró que la aclimatación y reverdecimiento por 45 días de los tejidos etiolados, fue adecuado para garantizar la lignificación y anchura de corteza en los brotes de aguacate Hass y Duke-7 (Schmidt, 1986) (Figura 2), atributos que son requeridos en inoculaciones artificiales de tallos de aguacate con *P. cinnamomi* (Rodríguez *et al.*, 2017).

La etiolación de los tejidos es una respuesta de crecimiento natural de las plantas de aguacate que se produce en ausencia de luz, este estado proporciona cambios estructurales a nivel morfológico y anatómico que promueven el desarrollo celular (Hiti-Bandaralage *et al.*, 2017). Los brotes etiolados de los genotipos Hass y Duke-7 presentaron aumentos estructurales de diámetros de tallo, especialmente en el ancho cortical y de los radios del xilema, favorecido por un agrandamiento celular (Figura 2). Estos resultados explicarían en cierta manera, el rápido desarrollo obtenido de los brotes para ambos genotipos en cámara de etiolación, y son muy consistentes con lo observado por Schmidt (1986) en tallos etiolados de la especie arbórea *Tilia tomentosa* (Malvaceae).

Para los dos métodos de desarrollo de brotes y para los dos genotipos de aguacate, los tres aislamientos de *P. cinnamomi* causaron pudriciones en corteza externa en forma de manchas o canchales color café oscuro con exudaciones de apariencia blanquecina; mientras que, en la corteza interna se observó el avance de lesiones y decoloraciones de tejido con pudriciones color marrón o rojizo. Estas observaciones son consistentes con lo informado por Fischer *et al.* (2020) y Rodríguez-Padrón *et al.* (2018), quienes indicaron que las lesiones externas e internas generadas en tallos por diferentes aislamientos de *P. cinnamomi* a través de la inoculación de discos de PDA con micelio, son capaces de inducir muerte de corteza y muerte de tejido vascular. Esto confirma que el uso de micelio de *P. cinnamomi* puede causar

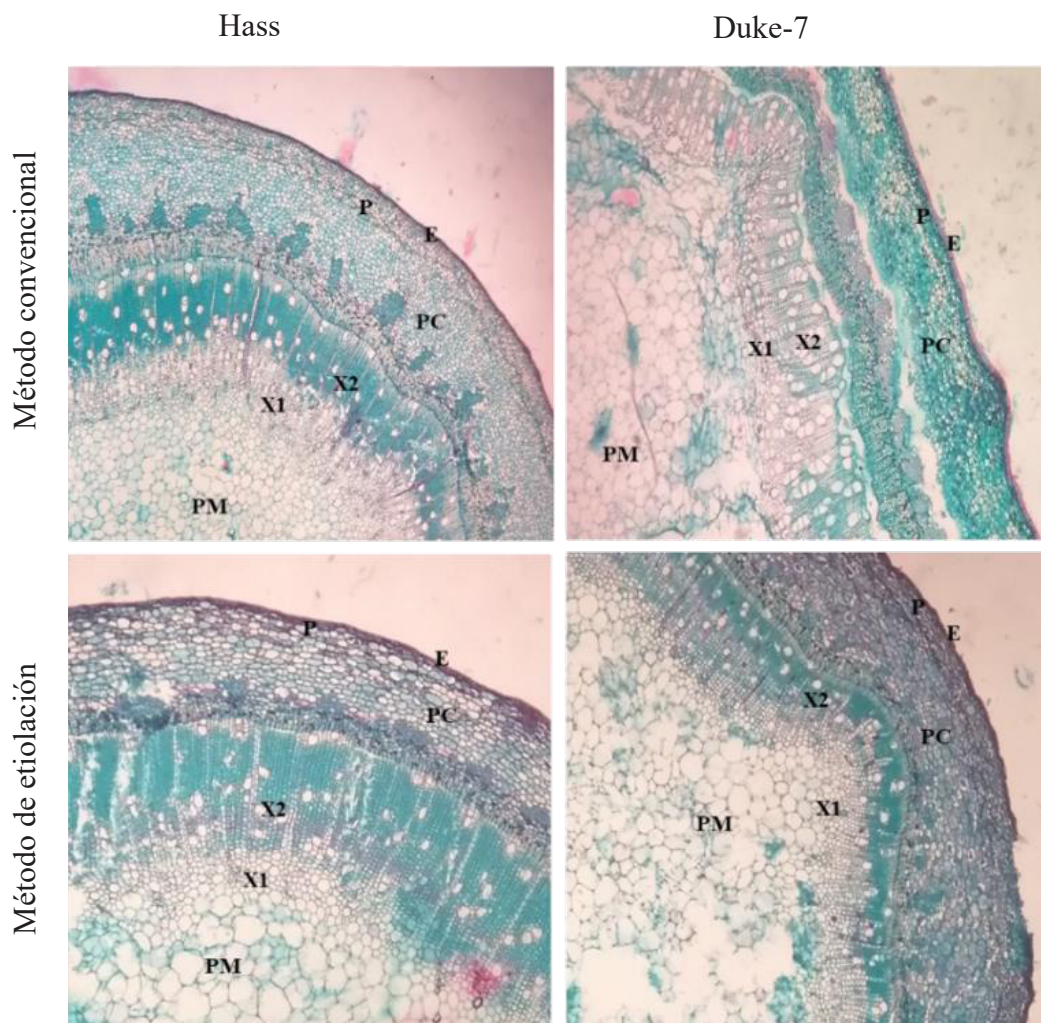


Figura 2. Micrografías de cortes histológicos de tallos de aguacate Hass y Duke-7 desarrollados por el método convencional y por el método de etiolación (40X). (PM) Parénquima medular, (X1) xilema primario, (X2) xilema secundario, (PC) parénquima cortical, (P) peridermis, (E) epidermis.

infecciones tan efectivas como las generadas con la inoculación de zoosporas en tallos de aguacate (Van der Merwe *et al.*, 1990).

En todas las plantas inoculadas fue posible el reaislamiento de *P. cinnamomi* como el agente causal del incremento de necrosis en los brotes de aguacate. Los tres aislamientos de *P. cinnamomi* en medio de cultivo PDA presentaron patrones similares de crecimiento de colonia tipo petaloide con coloración blanca y micelio con crecimiento rastrero (Figura 3A). Microscópicamente presentaron hifas cenocíticas, ramificadas, con hinchazones globosas y subglobosas (Figura 3B);

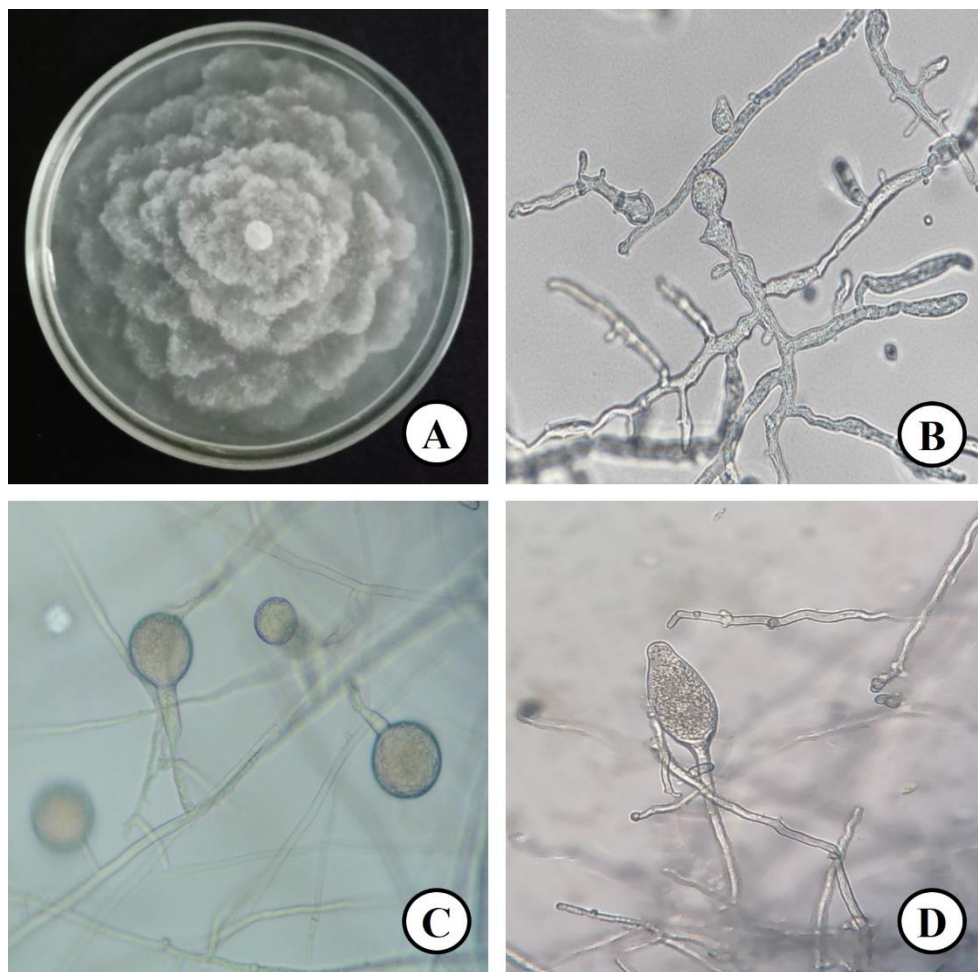


Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento A-Ag-041 de *P. cinnamomi*. (A) Crecimiento de colonia en medio de cultivo PDA, (B) micelio (hifas), (C) clamidosporas, (D) esporangio.

clamidosporas globosas terminales de pared gruesa (Figura 3C), esporangióforos no ramificados con esporangios no papilados, con forma elipsoide y limoniforme (Figura 3D), con dimensiones de alto entre 48.2-57.3 μm y ancho entre 32.7-33.4 μm . Estas descripciones son similares a las reportadas por Abad *et al.* (2023) para *P. cinnamomi*.

Síntomas de clorosis, marchitez y decaimiento de hojas y tallos se observaron a partir de los 9 días posteriores a la inoculación (dpi) en ambos métodos de desarrollo de brotes. Sin embargo, la muerte de brotes en plántulas propagadas por el método convencional fue evidente a partir de los 15 dpi; mientras que, en brotes etiolados se presentó a los 22 dpi. La mayor mortalidad de brotes ocurrió en Hass y fue mayor en brotes propagados por el método convencional (Cuadro 2). La muerte

Cuadro 2. Mortalidad de brotes en injertos de aguacate Hass y Duke-7 propagados por el método convencional y por etiolación e inoculados con *P. cinnamomi*.

Método	Hass		Duke-7	
	Número de plantas inoculadas	Mortalidad	Número de plantas inoculadas	Mortalidad
Convencional	27	5 (18 %)	27	2 (7 %)
Etiolación	27	3 (11 %)	27	0 (0 %)
Total	54	8 (14.8 %)	54	2 (3.7 %)

de los brotes estuvo relacionada con el avance de la lesión, ya que una vez el daño lograba cubrir completamente el perímetro del tallo se producía la muerte del injerto (Fischer *et al.*, 2020). En las plantas testigo sin el patógeno, no se observaron necrosis ni avance de lesiones en corteza más allá del punto de corte.

Las condiciones climáticas de la casa malla fueron adecuadas para el desarrollo de síntomas de enfermedad. En el experimento, la temperatura promedio fue de 23.3 °C (Intervalo: 17.2–31.2 °C) y la humedad relativa promedio del 71.6 % (Intervalo: 42.7–97.8 %), lo cual coincide con condiciones climáticas informadas por Andrade-Hoyos *et al.* (2012), Fischer *et al.* (2020) y Rodríguez *et al.* (2017) en ensayos de infección con *P. cinnamomi*.

El análisis de varianza para los valores medios del ABCPE no mostró diferencias significativas entre métodos ($F=1.84$; $p=0.1881$); sin embargo, se presentaron diferencias entre genotipos ($F=13.52$; $p=0.001$), aislamientos ($F=3.47$; $p=0.047$) y entre las interacciones de genotipo*método ($F=4.22$; $p=0.05$) y genotipo*aislamiento ($F=3.34$; $p=0.037$), esto hizo que cada tratamiento fuera analizado de forma independiente en cada método y por cada genotipo de aguacate.

En brotes desarrollados por el método convencional, se observó solapamiento en las curvas de crecimiento promedio de las lesiones entre aislamientos a través del tiempo (Figura 4A y B). El tamaño de lesión (24 dpi) para aguacate Hass en los tres aislamientos varió entre los 1.78 y 2.40 cm; mientras que en Duke-7 varió entre los 1.70 y 1.89 cm. En estos brotes no se encontraron diferencias significativas entre genotipos de acuerdo con el ABCPE ($F=0.73$; $p=0.4091$). En brotes de aguacate Hass, el aislamiento Tamb-009 fue el de mayor agresividad; mientras que los aislamientos Ag-A-041 y Ag-A-003 el ABCPE fue menor y estadísticamente similar. En Duke-7, por el contrario, no se logró discriminar diferencias de agresividad entre aislamientos (Figura 5A). En los brotes propagados por el método convencional fue frecuente encontrar hojas y ramas laterales en la zona de inoculación que dificultaron la evaluación (Figura 6A) y posiblemente el avance de las lesiones necróticas generadas por el oomicete.

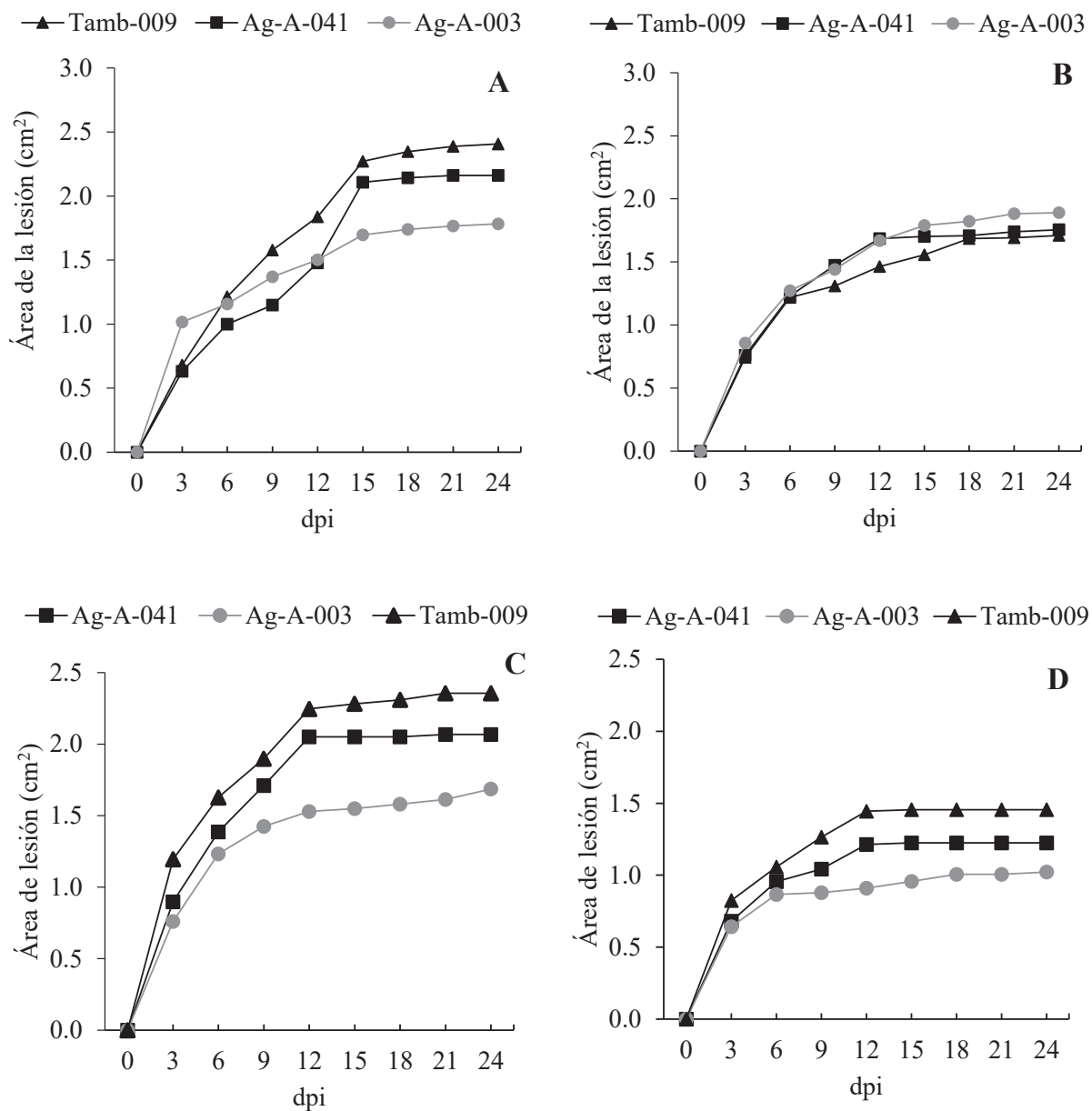


Figura 4. Avance del área de la lesión en injertos de aguacate Hass y Duke-7 desarrollados por el método convencional y el método de etiolación, e inoculados con tres aislamientos de *P. cinnamomi*. (A) Genotipo Hass convencional, (B) genotipo Duke-7 convencional, (C) genotipo Hass etiolado, (D) genotipo Duke-7 etiolado.

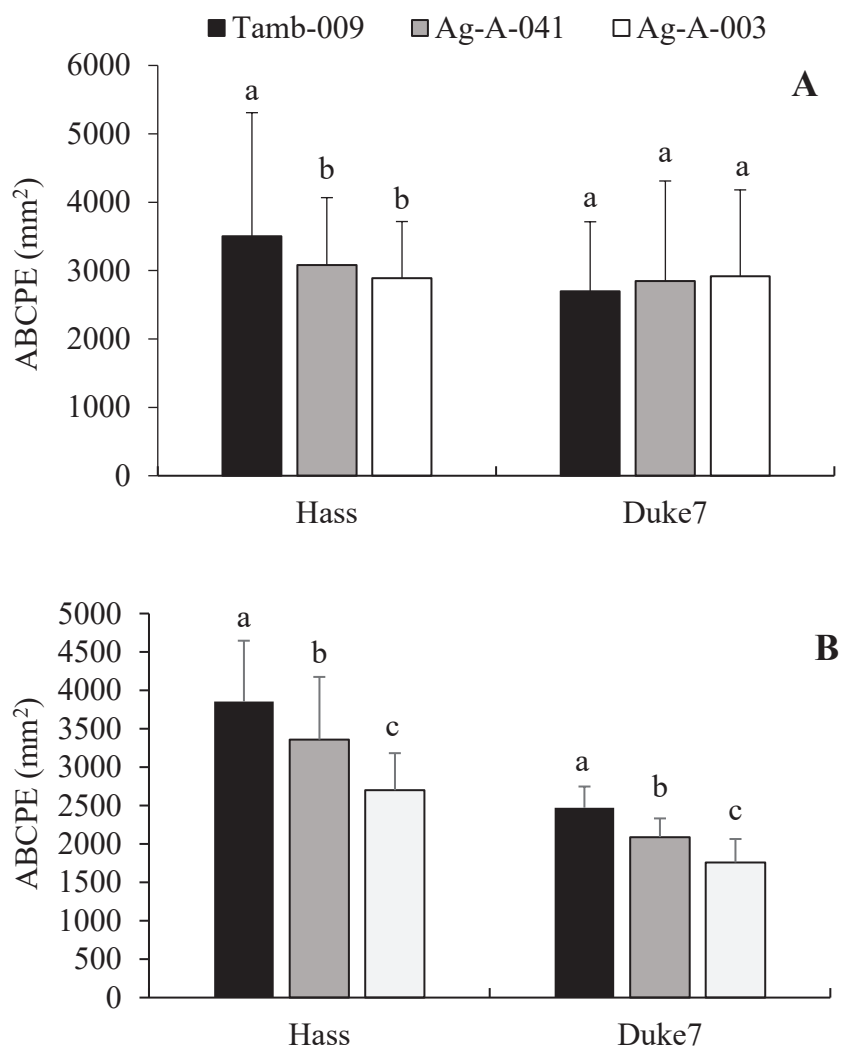


Figura 5. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en injertos de aguacate Hass y Duke-7 desarrollados por el método convencional (A) y por el método de etiolación (B).

En brotes desarrollados por el método de etiolación, el tamaño de las lesiones (24 dpi) en aguacate Hass para los tres aislamientos varió entre 1.68 y 2.35 cm; mientras que en Duke-7 varió entre 1.02 y 1.45 cm. En este método, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre genotipos ($F=4.22$; $p<0.05$) y entre aislamientos de *P. cinnamomi* de acuerdo con los valores medios de ABCPE ($p\leq 0.05$). El desarrollo de las lesiones para los tres aislamientos fue mayor en el genotipo Hass comparado con Duke-7. En los dos genotipos el tamaño de la lesión tuvo un crecimiento exponencial durante los primeros 12 dpi, y a partir de los 15



Figura 6. Desarrollo de necrosis en injertos de aguacate inoculados con *P. cinnamomi*. (A) Variación del área de necrosis en injertos de aguacate Hass desarrollados por el método convencional (12 dpi). (B) Testigo sin inóculo en injerto de aguacate Hass desarrollados por el método convencional. (C) Variación en el área de necrosis en injertos de aguacate Hass desarrollados por el método de etiolación (12 dpi). (D) Testigo sin inóculo en injerto de aguacate Hass desarrollados por el método de etiolación. Las fechas en rojo indican la presencia estructuras vegetativas que impiden la adecuada evaluación del área de la necrosis.

dpi se observó un patrón de crecimiento relativamente estable hasta finalizar el estudio (Figura 4C y D). La prueba de comparación de medias de Duncan para ambos genotipos identificó al aislamiento Tamb-009 como el de mayor agresividad, seguido por los aislamientos Ag-A-041 y Ag-A-003 los de menor agresividad (Figura 5B).

Independiente del método de desarrollo de brotes evaluado, el genotipo ‘Hass’ fue el de mayor desarrollo de lesión, ABCPE (3231.7 mm²) y muerte de injertos (14.8 %), lo cual confirma la alta susceptibilidad de este genotipo a *P. cinnamomi* (Rodríguez *et al.*, 2017; Sánchez-Gonzalez *et al.*, 2019). Del mismo modo, se

corroborar mayor resistencia a *P. cinnamomi* en el genotipo Duke-7 al presentar menor tamaño de lesión, ABCPE (2463.6 mm²) y muerte de injertos (3.7 %) (Barriontos-Priego *et al.*, 2007; Kellam y Coffey, 1985). Estas diferencias de resistencia y susceptibilidad a *P. cinnamomi* expresada por los genotipos Duke-7 y Hass, respectivamente, fueron muy marcadas en los injertos desarrollados por el método de etiolación.

Por otro lado, se confirma la alta capacidad infectiva del aislamiento Tamb-009 en los ensayos evaluados, inclusive mayor al aislamiento Ag-A-041, de quien se ha corroborado alta patogenicidad y agresividad en estudios previos de inoculación en tallos de aguacate. Por ejemplo, Rodríguez-Polanco *et al.* (2015), utilizando la técnica de herida al tallo en injertos de aguacate Hass, evaluaron 22 aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de diferentes regiones productoras de aguacate en Colombia, estos autores encontraron que el aislamiento Ag-A-041 fue el de mayor agresividad (ABCPE=64104 mm²), logrando longitudes de necrosis en tallos entre 15 y 20 cm. Resultados similares fueron presentados por Rodríguez *et al.* (2017), quienes evaluando 21 genotipos de aguacate con tres aislamientos de *P. cinnamomi* por herida al tallo, encontraron que el aislamiento Ag-A-041 fue el de mayor agresividad y velocidad de infección (ABCPE=4086 mm²).

La uniformidad del tamaño de las lesiones generadas por los tres aislamientos de *P. cinnamomi* en los dos genotipos de aguacate, fue mayor en brotes desarrollados por el método de etiolación (Figura 6). Estos resultados estuvieron respaldados por porcentajes menores registrados en los CV del ABCPE para brotes etioladas de los genotipos Hass y Duke-7, en donde el nivel de variación fluctuó entre el 11.1 y el 24.2 %; mientras que, en brotes desarrollados por el método convencional los

Cuadro 3. Valores promedios y Coeficiente de Variación (CV) del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de tres aislamientos de *P. cinnamomi* inoculados en injertos de aguacate Hass y Duke-7 desarrollados por el método convencional y por el método de etiolación.

Método	Genotipo	Aislamiento	ABCPE	CV (%)
Convencional	Hass	Tamb-009	3504.4	60.0
		Ag-A-041	3081.6	64.4
		Ag-A-003	2890.9	38.9
	Duke-7	Tamb-009	2698.1	37.6
		Ag-A-041	2846.4	51.4
		Ag-A-003	2915.6	43.3
Etiolación	Hass	Tamb-009	3853.8	20.0
		Ag-A-041	3358.7	24.2
		Ag-A-003	2700.8	17.8
	Duke-7	Tamb-009	2471.4	11.1
		Ag-A-041	2089.5	11.6
		Ag-A-003	1760.5	17.2

porcentajes de variación fluctuaron entre el 38.9 y el 64.4 % para ambos genotipos (Cuadro 3). Lo anterior, permite confirmar mayor uniformidad en el tamaño de las lesiones en brotes etiolados cuando las unidades experimentales de un genotipo son sometidas a un tratamiento específico (p. ej. Aislamiento), esto es producto de la menor variación en el desarrollo vegetativo de los injertos y posiblemente favorecido por el agrandamiento y mejor arreglo celular a nivel histológico en los brotes etiolados, especialmente en el parénquima cortical (PC) (Figura 1), que es donde se produce el corte y la inserción del disco de PDA con micelio de *P. cinnamomi*.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados muestran que las plantas de aguacate obtenidas a partir de la injertación y posterior etiolación de brotes, presentaron rápido crecimiento (101-107 días), mayor uniformidad en el diámetro de tallos (6 mm) (CV=5.14-5.51 %) y mayor uniformidad en el desarrollo de las lesiones dentro de las unidades experimentales de cada genotipo al momento de ser inoculadas con *P. cinnamomi* (CV=11.1-24.2 %), lo que genera una mayor confiabilidad en los resultados a la hora evaluar resistencia-susceptibilidad en germoplasma de aguacate. El método de brotes etiolados también permitió discriminar diferencias en los niveles de resistencia entre genotipos y en el grado de agresividad entre aislamientos de *P. cinnamomi*.

En el método convencional de desarrollo de injertos, la respuesta de infección con *P. cinnamomi* presentó mayor variabilidad en el crecimiento de las lesiones (CV=38.9-64.4 %), logrando discriminar grados parciales de agresividad entre aislamientos, pero no niveles de resistencia entre genotipos.

AGRADECIMIENTOS

Este manuscrito fue originado con resultados de investigación del proyecto: “Estrategias de prevención y manejo de enfermedades limitantes en la producción de aguacate en las principales zonas productoras de Colombia” (ID. 1000548), agenda de trabajo de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, 2019 – 2021, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

LITERATURA CITADA

- Abad ZG, Burgess T, Redford AJ, Bienapfl JC, Mathew R., et al., (2023). *IDphy*: An international online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora*. *Plant Disease* 107: 987–998. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-22-0448-fe>
- Andrade-Hoyos P, De León C, Espíndola M, Alvarado D, López A y García E. 2012. Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* usando temperaturas controladas. *Spanish Journal of Rural Development* 3:23-30.
- Andrade-Hoyos P, Molina E, De León C, Espíndola M, Alvarado D y López A. 2015. Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:347-360. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n2/v6n2a10.pdf>
- Barrientos-Priego A, Muñoz-Pérez R, Reyes-Alemán J, Borys M y Martínez-Damián M. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos. Pp:31-62. In: Téliz D y Mora A (Coord.). *El aguacate y su manejo integrado*. Vol. 2. Mundi Prensa. México, D. F. 300p.
- Ben-Ya'acov A and Zilbersteine M. 1999. The possible use of avocado (*Persea americana*) germplasm material as rootstocks for soil stress conditions. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:25-28. <https://revistas.chapingo.mx/horticultura/?section=articles&subsec=issues&numero=70&articulo=720>
- Berdugo-Cely J, Cortés A, López-Hernandez F, Delgadillo-Durán P, Cerón-Souza I, Reyes-Herrera P, et al. 2023. Pleistocene-dated genomic divergence of avocado trees supports cryptic diversity in the Colombian germplasm. *Tree Genetics & Genomes* 19: 1-24. <https://doi.org/10.1007/s11295-023-01616-8>
- Bernal-Estrada J y Díaz-Díez C. 2020. Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo del aguacate. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA. Antioquia, Colombia. 777p. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7403831>
- Dolan TE and Coffey MD. 1986. Laboratory screening technique for assessing resistance of four avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease* 70:115-118. https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n02_115.PDF
- Drenth A and Guest DI. 2004. Principles of *Phytophthora* disease management. Pp:154-160. In: Drenth A and Guest DI (Eds.). *Diversity and management Phytophthora in Southeast Asia*. Australian Centre for International Agricultural Research ACIAR. Canberra, Australia. 233p. <https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/legacy/node/598/mn114-part1.pdf>
- Engelbrecht J and Van den Berg N. 2013. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal Science* 109:1-8. <https://doi.org/10.1590/sajs.2013/20120058>
- Erwin C and Ribeiro K. 1996. *Phytophthora* diseases Worldwide. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, EE.UU. 562p. <https://doi.org/10.1017/S001447979825109X>
- Fischer I, Sampaio A, Bertani, R, Gonçalves B and Feichtenberger E. 2020. Aggressiveness of *Phytophthora cinnamomi* in avocado seedlings and effect of pathogen inoculum concentration and substrate flooding periods on root rot and development of the plants. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* 42:e-352 <https://doi.org/10.1590/0100-29452020352>
- Frolich EF and Platt RG. 1972. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. *California Avocado Society, Yearbook* 55:97-109. https://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_55_1971/CAS_1971-72_PG_097-109.pdf
- Gabor BK and Coffey MD. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. *Plant Disease* 75:118-120. https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n02_118.PDF
- Hiti-Bandaralage J, Hayward A and Mitter N. 2017. Micropropagation of Avocado (*Persea Americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences* 8: 2898-2921. [10.4236/ajps.2017.811197](https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811197)
- Kellam M and Coffey MD. 1985. Quantitative Comparison of the Resistance to *Phytophthora* Root Rot. *Phytopathology* 75:230-234. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n02_230.PDF
- López-Gale Y, Murcia-Riaño N, Romero-Barrera Y and Martínez MF. 2022. Morphological characterization of seed-donor Creole avocado trees from three areas in Colombia. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 28:93-108. <https://doi.org/10.5154/rchsh.2021.06.010>

- Mora-Aguilera A, Téliz-Ortíz D, Mora-Aguilera G y Etchevers-Barra J. 2007. Tristeza del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*). Pp:193-202. In: Téliz-Ortíz D y Mora-Aguilera A (Eds.) El aguacate y su manejo integrado. 2^{da} edición. Mundi Prensa. México D. F. 300p.
- Palacios-Joya L, Martínez MF, Rodríguez-Arévalo K, Rodríguez-Mora D y Murcia-Riaño N. 2023. Microorganismos asociados a la pudrición de raíces en plántulas de aguacate procedentes de viveros de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda y Quindío. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia. <https://doi.org/10.15472/geavk3>
- Ramírez-Gil G, Gilchrist E and Morales J. 2017. Economic impact of the avocado (cv. Hass) wilt disease complex in Antioquia, Colombia, crops under different technological management levels. *Crop Protection* 101:103-115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.023>
- Rodríguez E, Caicedo A, Enriquez A and Muñoz J. 2017. Evaluation of tolerance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado (*Persea americana*) germplasm. *Acta Agronómica* 66:128-134. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n1.50705>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57(1): 89-106. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022
- Rodríguez-Polanco E, Murcia-Riaño N y Martínez MF. 2015. Desarrollo de un protocolo de infección en raíz para cuantificación de resistencia genética a *Phytophthora cinnamomi* en aguacate. Pp.121-127. In: VIII Congreso Mundial del aguacate, Lima, Perú. https://www.avocadosource.com/WAC8/Section_02/RodriguezPolancoE2015.pdf
- Sánchez-Gonzales E, Gutiérrez-Soto G, Olivares-Sáenz E, Gutiérrez-Díez A, Barrientos-Priego A and Ochoa-Ascencio S. 2019. Screening progenies of mexican race avocado genotypes for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *Horticultural Science* 54: 809-813. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI113552-18>
- SAS Institute Inc. 2013. Statistical Analysis System: User's guide, ver. 9.4. Cary, New York, USA. https://www.sas.com/en_us/home.html
- Schmidt G. 1986. Effect of etiolation on the histological structure of the stem of *Tilia tomentosa* Moench. *Folia Dendrologica* 13:217-262.
- Tsao PH and Guy S. 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. Pp:219-235. In: Erwin C, Bar-nicki-Garcia S and Tsao PH (eds.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. Taylor & Francis, Ltd. 380p. <https://doi.org/10.2307/3793121>
- Van der Merwe M. 1990. An improved method to evaluate avocado rootstocks for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 13:67-68. https://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA_1990/SAAGA_1990_PG_67-68.pdf