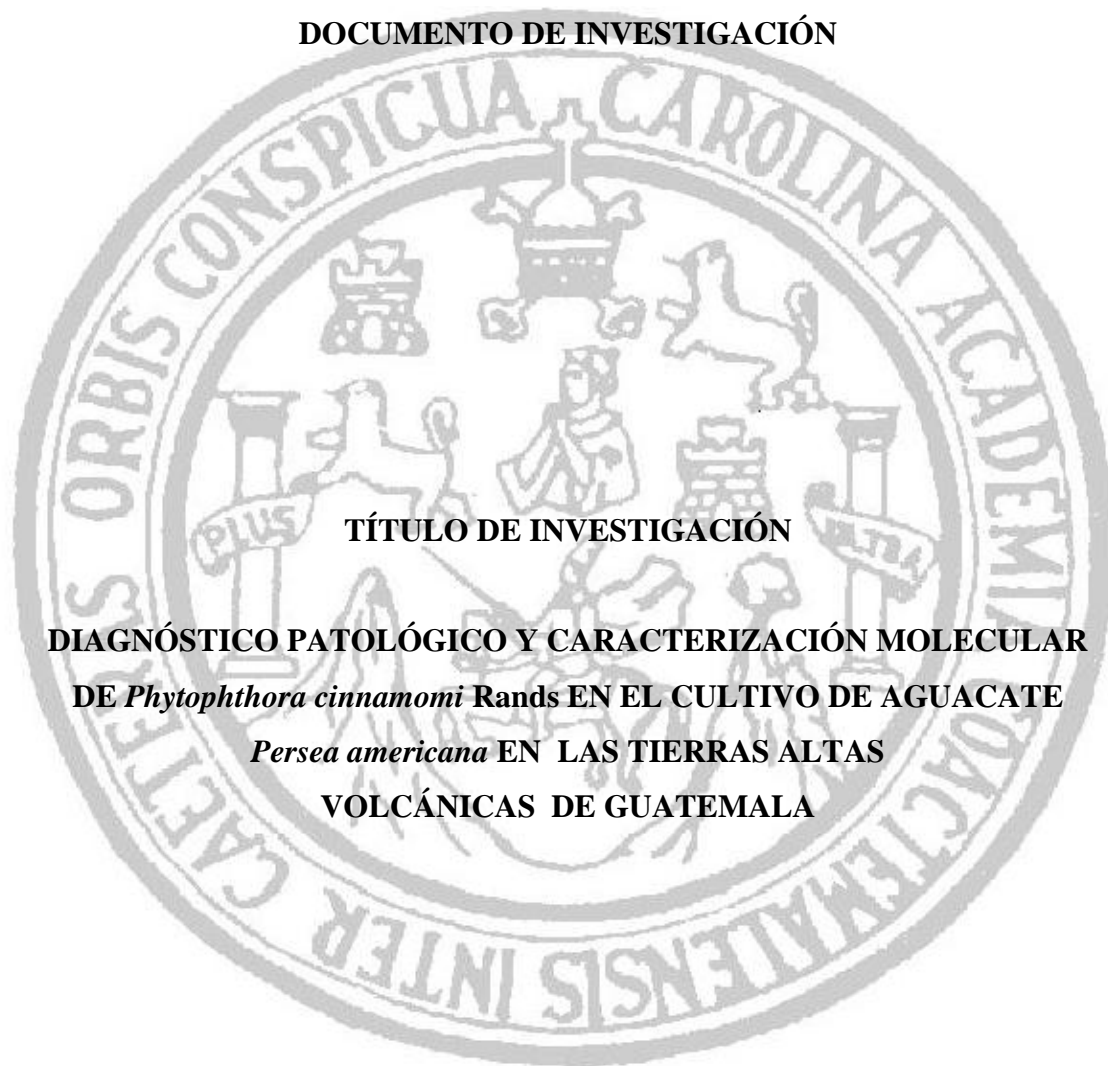


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**ÁREA INTEGRADA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**  
**DOCUMENTO DE INVESTIGACIÓN**



**TÍTULO DE INVESTIGACIÓN**

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DE *Phytophthora cinnamomi* Rands EN EL CULTIVO DE AGUACATE  
*Persea americana* EN LAS TIERRAS ALTAS  
VOLCÁNICAS DE GUATEMALA**

**JOSÉ DAVID OVALLE RIVERA**

**Guatemala Noviembre de 2011**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
*Phytophthora cinnamomi* Rands EN EL CULTIVO DE AGUACATE  
*Persea americana* EN LAS TIERRAS ALTAS VOLCÁNICAS DE GUATEMALA**

**TESIS  
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**Por  
JOSÉ DAVID OVALLE RIVERA**

**En el Acto de Investidura como  
INGENIERO AGRÓNOMO  
EN  
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADO**

**Guatemala, Noviembre de 2011**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR MAGNÍFICO  
Lic. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO            Dr. LAURIANO FIGUEROA QUIÑONEZ  
VOCAL PRIMERO   Dr. ARIEL ABDERRAMAN ORTIZ LÓPEZ  
VOCAL SEGUNDO   Ing. Agr. MARINO BARRIENTOS GARCÍA  
VOCAL TERCERO   Ing. Agr. OSCAR RENÉ LEIVA RUANO  
VOCAL CUARTO   Bachiller LORENA CAROLINA FLORES PINEDA  
VOCAL QUINTO   Per. Agr. JOSUE ANTONIO MARTÍNEZ ROQUE  
SECRETARIO       Ing. Agr. CARLOS ROBERTO ECHEVERRIA ESCOBEDO

Guatemala, Noviembre de 2011

Guatemala, Noviembre de 2011

Honorable Junta Directiva  
Honorable tribunal examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente.

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora cinnamomi* Rands EN EL CULTIVO DE AGUACATE *Persea americana* EN LAS TIERRAS ALTAS VOLCANICAS DE GUATEMALA**

Presentado como requisito previo a optar al Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

En espera que la presente investigación llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente,

José David Ovalle Rivera

## ACTO QUE DEDICO

**A:**

**DIOS** Por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida.

**MI MADRE** Consuelo Rivera Flores. Como una pequeña recompensa a su gran esfuerzo y sacrificio brindado para mi superación como persona profesional.

**MIS HERMANOS** Ludwing Mauricio y Cony Nataly por el apoyo incondicional.

**MI HIJO** † Carlos Mauricio (Q.E.P.D.), ya que él me motivó a terminar mi proceso de aprendizaje en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

**MI ABUELA** † María Dominga (Q.E.P.D.)

**MIS TIOS** En especial a Aura Violeta

**MIS PRIMOS** Carolyn Violeta y José Andree

**MI SOBRINO** † Ludwing Alejandro (Q.E.P.D), quién en muy poco tiempo nos dio un gran amor y felicidad.

**MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A:**

Mi madre por su esfuerzo y apoyo incondicional.

Mis hermanos por su colaboración y apoyo en la culminación de mis estudios.

Mi hijo Carlos Mauricio, ya que él me ayudó a concluir la finalización de mi documento de investigación y aprendizaje dentro de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Mi asesor Msc. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez por su interés y dedicación en la asesoría y revisión del presente trabajo de investigación.

Mis compañeros y amigos por su apoyo.

La Universidad de San Carlos de Guatemala por haberme brindado los conocimientos en mi formación profesional.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en la realización de esta tesis.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	2
3.	JUSTIFICACIÓN.....	2
4.	MARCO TEÓRICO.....	3
4.1.	MARCO CONCEPTUAL.....	3
4.1.1.	Descripción del aguacate.....	3
4.1.2.	Fruto del aguacate.....	3
4.1.3.	Clima.....	4
4.1.4.	Suelo.....	4
4.1.5.	Variedades de aguacate.....	4
4.1.6.	Manejo agronómico.....	5
A.	Viveros.....	5
B.	Propagación.....	5
C.	Injerto.....	6
D.	Plagas (insectos y ácaros).....	6
E.	Enfermedades.....	6
4.1.7.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Phytophthora</i> .....	7
A.	Ubicación Taxonómica.....	7
B.	Caracteres morfológicos generales de las especies de <i>Phytophthora</i> .....	7
a.	Micelio.....	7
C.	Reproducción.....	8
a.	Reproducción asexual.....	8
D.	Reproducción sexual.....	10
a.	Oogonio (Órgano sexual femenino).....	10
b.	Anteridio (Órgano sexual masculino).....	10
E.	Aislamiento.....	14
F.	Identificación.....	14
G.	Ciclo de enfermedades y epidemiología.....	14
4.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
4.3.	Análisis de diversidad genética.....	20
4.3.1.	Marcadores microsatélites para el análisis de diversidad genética.....	21
4.3.2.	Electroforesis del ADN en geles de agarosa.....	23
4.3.3.	Amplificación de secuencias microsatélites (PCR de microsatélites).....	24
4.4.	MARCO REFERENCIAL.....	26
4.4.1.	Tierras altas volcánicas.....	26
5.	OBJETIVOS.....	29
5.1.	General.....	29
5.2.	Específicos.....	29
6.	HIPOTESIS.....	29
7.	METODOLOGÍA.....	30
7.1.	Fase de campo.....	30
7.1.1.	Establecimiento de los sitios de muestreo.....	30
A.	Muestreos no probabilísticos.....	30
7.1.2.	Recolección de muestras.....	31
7.1.3.	Aislamientos del patógeno en muestras de tallo.....	31
7.2.	Fase de laboratorio.....	32

7.2.1.	Aislamiento del patógeno .....	32
A.	Método directo.....	32
B.	Método indirecto o trampa .....	32
C.	Identificación del patógeno .....	32
7.2.2.	Caracterización molecular .....	34
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	40
8.1.	Fase de laboratorio.....	40
8.1.1.	Aislamiento del patógeno .....	40
A.	Método directo.....	40
B.	Método indirecto o trampa .....	40
C.	Prueba de patogenicidad.....	45
8.2.	Caracterización Molecular.....	49
8.2.1.	Análisis de Grupos y Ordenamiento de los materiales.....	55
9.	CONCLUSIONES.....	57
10.	RECOMENDACIONES .....	58
11.	BIBLIOGRAFÍA .....	59
12.	ANEXOS .....	62



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Variedades de aguacate recomendadas en Guatemala para la producción en las distintas alturas sobre el nivel del mar.....	04
Cuadro 2 Sitios para la obtención de las cepas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.....	31
Cuadro 3 Cantidad de reactivos y su concentración para la realización del proceso de PCR para la utilización de primers microsátélites .....	36
Cuadro 4 Programa de PCR para los Primers (GTG)5 y (GT)7.....	37
Cuadro 5 Programa de PCR para los Primers (TCG)5 y (CGA)5.....	37
Cuadro 6 Programa de PCR para el Primers (CA)7.....	37
Cuadro 7 Código de las Cepas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands y sitio de colecta.....	54
Cuadro 8A Temperaturas cardinales de crecimiento de algunas especies del género <i>Phytophthora</i> .....	63
Cuadro 9A Representación numérica del gráfico de Sedimentación .....	63

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de Reproducción de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.....	15
Figura 2 Pasos a seguir para llevar a cabo un análisis de diversidad genética.....	21
Figura 3 Identificación de regiones microsátélites.....	23
Figura 4 Zonas de vida presentes de Guatemala elaborada mediante la metodología de Holdridge.....	27
Figura 5 Mapa fisiográfico de la República de Guatemala, donde se da a conocer la ubicación de las Tierras Altas Volcánicas.....	28
Figura 6 Toma y selección de las plantas con síntomas de marchites.....	31
Figura 7 Uso de la manzana como medio de cultivo trampa para <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands .....	41
Figura 8 Distribución de las porciones de cultivo trampa en el medio selectivo PARPHB para la purificación de la especie de trabajo .....	41
Figura 9 Semillas de manzana con micelio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands en solución de suelo para la esporulación .....	43
Figura 10 Esporangio de <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands en medio de solución de suelo .....	43
Figura 11 Micelio globoso de <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands en medio de cultivo de PDA .....	44
Figura 12 Esporangio de <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands en medio de cultivo de solución de suelo.....	44
Figura 13 Crecimiento roceteado de <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands en medio de cultivo PDA .....	45
Figura 14 Esporulación de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands en medio de cultivo Agar Vómito listo para ser inoculado en las plantas de aguacate.....	46
Figura 15 Planta de aguacate lista para inocularla con <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands con medio de cultivo Agar Vómito .....	46
Figura 16 de aguacate Hass .....	47
Figura 17 Raíces de aguacate dañada por <i>Phytophthora cinammomi</i> Rands.....	47
Figura 18 Plantas de Aguacate después de 45 días de la inoculación del patógeno. ....	48
Figura 19 Sistema radicular de Aguacate Hass después de 45 días de la inoculación del patógeno .....	48
Figura 20 Fotografía de la corrida en gel de agarosa donde muestra las bandas obtenidas en el proceso de PCR utilizando el Primer (CA)7.....	49
Figura 21 Fotografía de la corrida en gel de agarosa mostrando las bandas obtenidas en el proceso de PCR del ADN molde mediante el uso del Primer (CGA)5.....	50
Figura 22 Fotografía mostrando en la corrida del gel de agarosa las bandas obtenidas en el proceso de PCR del ADN molde mediante el Primer (GT)7.....	50
Figura 23 Fotografía de la Corrida en gel de agarosa mostrando las bandas obtenidas del PCR del ADN molde utilizando el Primer (GTG)5.....	51
Figura 24 Fotografía de corrida en gel de agarosa donde se observa las bandas obtenidas en el proceso de PCR del ADN molde utilizando el Primer (TCG)5.....	51
Figura 25 Fotografía donde muestra las bandas obtenidas en la corrida en gel de agarosa mediante el proceso de PCR de ADN molde utilizando el Primer (CGA)5 y (TCG)5.....	52
Figura 26: Grafico de Sedimentación .....	53

Figura 27 Análisis jerárquico usando el método de conglomerado del vecino más lejano, mediante el sistema Bloque .....	55
Figura 28A Típico crecimiento de una colonia de <i>P. cinnamomi</i> Rands en PDA.....	62
Figura 29A Diferentes tipos de esporangios de las especies del género <b><i>Phytophthora</i></b> .....	62
Figura 30A Manzanas verdes utilizadas como cultivos trampa para la obtención de <i>Phytophthora</i> .....	65
Figura 31A Pasos a realizar para poder realizar un cultivo Trampa.....	66
Figura 32A Medios de Cultivos de Agar Vómito listos para realizar la prueba de patogenicidad.....	66
Figura 33A Cepas de <i>P. cinnamomi</i> Rands esporuladas en agar vómito.....	67

# DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora cinnamomi* Rands EN EL CULTIVO DE AGUACATE *Persea americana* EN LAS TIERRAS ALTAS VOLCÁNICAS DE GUATEMALA

## RESUMEN

En Guatemala la producción del cultivo de Aguacate *Persea americana* L ha incrementado su superficie de producción cercana a mas de 5,000 ha. Cultivadas (1). No obstante a esto, uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo, es la enfermedad denominada “Tristeza del aguacate”, causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. Con el objetivo de poder conocer la diversidad genética del fitopatógeno se hizo la colecta de plantas de aguacate afectadas por dicho agente fitopatógeno en viveros de aguacate comerciales, los aislamientos del oomycete consistieron en realizar cultivos trampa como la manzana verde y posteriormente purificarla en medio nutritivo específico para el desarrollo de *P. cinnamomi* Rands y poder así realizar siembras en el medio nutritivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) para la extracción de micelio que fue utilizado en la obtención de ADN molde y realizar el proceso de PCR por medio del uso de 5 primers microsatélites como lo fueron: a) (GTG)<sub>5</sub>; b) (GT)<sub>7</sub>; c) (TCG)<sub>5</sub>; d) (CGA)<sub>5</sub> y e) (CA)<sub>7</sub>. Obteniéndose al final 85 tipos de bandas amplificadas de las cuales con 29 bandas de las 85 obtenidas se lograba explicar la variación genética de la especie en estudio. Encontrándose con un 20% de variación genética la existencia de 3 grupos de este fitopatógeno, en donde la variación genética presente puede deberse a las mutaciones frecuentes que suceden en los nucleótidos cuando la reproducción es de forma asexual y como también al intercambio genómico existente debido a la recombinación genética de forma sexual.

PATHOLOGICAL DIAGNOSIS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
*Phytophthora cinnamomi* Rands IN THE AVOCADO *Persea americana* CULTURE IN  
THE HIGHLANDS VOLCANO GUATEMALA

ABSTRACT

In Guatemala crop production Avocado *Persea americana* L has increased its production area close to over 5,000 ha. Cultured (1). Notwithstanding this, one of the main problems in the crop plant, is the disease called "Sadness of avocado, caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. In order to know the genetic diversity of the plant pathogen collection was made from avocado plants affected by this phytopathogen agent in commercial avocado nursery, oomycete isolates consisted of trap crops do like apple green and then purify on specific nutrient media development of *P. cinnamomi* Rands and power and do plantings in the nutrient medium PDA (Potato Dextrose Agar) for the extraction of mycelium that was used in obtaining template DNA and perform the PCR process through the use of 5 microsatellite primers as were : a) (GTG) 5; b) (GT) 7; c) (TCG); 5 d) (CGA); 5 e) y (CA) 7. Obtaining the final 85 types of which amplified bands with 29 bands of the 85 could be obtained to explain the genetic variation of the species under study. Found with 20% of genetic variation the existence of 3 groups of this phytopathogen, where this genetic variation may be due to frequent mutations in the nucleotides that occur when the reproduction is asexual and as also due to exchange existing genomic recombination sexually.



# 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de aguacate *Persea americana* L. ha cobrado un incremento de la superficie en producción, principalmente un crecimiento de las exportaciones de producto industrializado, en fresco. Esto lo hace que la especie sea de alta importancia en el sector frutícola, con mas de 5,000 ha cultivadas en todo el país. (1)

Los municipios de Chimaltenango (Chimaltenango), San Marcos (San Marcos), Santo Domingo Xenacoj en Sacatepéquez, San Vicente Pacaya en Escuintla, Atitlán en Sololá y Villa Nueva, Guatemala son reconocidos como zonas de producción de aguacate, en donde actualmente para el país son de altos índices de productividad y crecimiento económico.

Al tener un incremento en la superficie de producción hace mucho mas importante el producto por lo que debido a esto se corre el riesgo de que la especie sea susceptible a los agentes fitopatógenos debido a el monocultivismo que se generaría y una de las enfermedades mas importantes dentro de una plantación de aguacate es la marchites causada por el hongo Oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands.

La presencia de *Phytophthora cinnamomi* Rands causa pérdidas totales cuando dicho Oomicete afecta en los viveros de aguacate o puede causar pérdidas parciales cuando ataca a la planta en estado adulto, tomando en cuenta que el patógeno habita en el suelo y afecta las raíces de la planta.

La investigación consistió en el aislamiento del agente causal de la enfermedad conocida como tristeza del aguacate ocasionada por cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands mediante un diagnóstico patológico en donde el patógeno era aislado en manzana verde y así facilitar la purificación del mismo mediante un medio de cultivo específico para dicho patógeno y posteriormente realizar así una caracterización molecular de las mismas cepas recolectadas debido a que la diversidad genética del agente causal es desconocida; y esto a limitado la generación de estrategias de control de dicha enfermedad.

En el diagnostico patológico se realizaron pruebas de patogenicidad utilizando plantas de aguacate de variedad Hass para constatar que el agente fitopatógeno mencionado anteriormente era el causante de la enfermedad en las plantas de aguacate provenientes de viveros.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

*Phytophthora cinnamomi* Rands es un oomicete de distribución mundial, el cual provoca daños de pudrición en la raíz y cáncer en el tallo de plantas de aguacate ya sea en viveros o en las plantaciones para producción. La incidencia de esta enfermedad en las plantaciones provoca grandes pérdidas en la industria del aguacate y constituye un problema serio en la mayoría de las regiones donde se produce este cultivo.

La pudrición de las raíces por *P. cinnamomi* Rands provoca un declinamiento progresivo del árbol, en el cual se observan hojas más pequeñas que lo normal, usualmente de color verde pálido o amarillentas y a menudo marchitas. Las ramas mueren regresivamente producto del avance de la enfermedad y los frutos son de corteza brillante, cuando la enfermedad se encuentra bien avanzada, suele que exista una fructificación excesiva y los frutos suelen ser de tamaño pequeño que no llegan a engordar.

El cultivo de Aguacate en Guatemala esta en crecimiento dentro del sector frutícola, sin embargo presenta factores que limitan su producción y afectan su calidad, destacando la presencia de enfermedades de tipo fungoso como la denominada tristeza del aguacate, ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, siendo está, por su importancia y distribución en la región, una limitante en la producción de este importante frutal.

## 3. JUSTIFICACIÓN

En las Tierras Altas Volcánicas este patógeno constituye uno de los principales problemas económicos tanto en su manejo y/o control como también en la disminución de la producción de plántulas dentro de viveros como así en el rendimiento por área debido a la muerte de las plantas de aguacate dentro de la plantación establecida, por lo que el método Molecular se encuentra presente en el diagnóstico ya que este ayudará a determinar la variabilidad genética existente de este tipo de población en particular, en donde los datos obtenidos pueden ser utilizados en programas futuros de investigación para la detección de cultivares o portainjertos resistentes hacia este patógeno en particular, mejorando así estrategias eficientes de control.



## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. MARCO CONCEPTUAL

#### 4.1.1. Descripción del aguacate

- Familia: Lauraceae
- Especie: *Persea americana* L, *Persea gratissima*.
- Origen: México, y luego se difundió hasta las Antillas.

Árbol extremadamente vigoroso y perennifolio (tronco potente con ramificaciones vigorosas), pudiendo alcanzar hasta 30 m de altura (3). Hojas alternas, pedunculadas, muy brillantes. Flores: flores perfectas en racimos subterminales; sin embargo, cada flor abre en dos momentos distintos y separados, es decir los órganos femeninos y masculinos son funcionales en diferentes tiempos, lo que evita la autofecundación. En ambos tipos, las flores abren primero como femeninas, cierran por un período fijo y luego abren como masculinas en su segunda apertura. Esta característica de las flores de aguacate es muy importante en una plantación, ya que para que la producción sea la esperada es muy conveniente mezclar variedades adaptadas a la misma altitud, con tipo de floración A y B y con la misma época de floración en una proporción 4:1, donde la mayor población será de la variedad deseada. (3)

#### 4.1.2. Fruto del aguacate

No se puede decir que el aguacate sea una fruta propiamente dicha, ya que no tiene apenas dulzor y se suele tomar en ensaladas, como si fuera una hortaliza. Se la ha definido por su riqueza en grasa como "la mantequilla vegetal".

Composición química del aguacate:

- Agua 70%
- Proteínas 1,5%
- Lípidos 22%
- Hidratos de Carbono 6%
- Vitamina A 40 microgramos/100 g
- Vitamina B1 0,09 mg/100 g
- Vitamina B2 0,12 mg/100 g
- Vitamina B6 0,5 mg/100 g

- Vitamina E (tocoferol) 3,2 mg/100 g
- Vitamina C 17 mg/100 g
- Potasio 400 mg/100 g

### 4.1.3. Clima

La raza antillana es poco resistente al frío, mientras que las variedades de la raza guatemalteca son más resistentes y las mexicanas las que presentan la mayor tolerancia al frío. Sequías prolongadas provocan la caída de las hojas, lo que reduce el rendimiento; el exceso de precipitación durante la floración y la fructificación, reduce la producción y provoca la caída del fruto. (3)

### 4.1.4. Suelo

Los suelos más recomendados son los de textura ligera, profundos, bien drenados con un pH neutro o ligeramente ácidos (5,5 a 7), pero puede cultivarse en suelos arcillosos o franco arcillosos siempre que exista un buen drenaje, pues el exceso de humedad propicia un medio adecuado para el desarrollo de enfermedades de la raíz, fisiológicas como la asfixia radical y fúngicas como *Phytophthora*. (3)

### 4.1.5. Variedades de aguacate

En el cuadro 1 puede observarse las distintas variedades de aguacate que pueden cultivarse en base a la altura sobre el nivel del mar.

Cuadro 1: Variedades de aguacate recomendadas en Guatemala para la producción en las distintas alturas sobre el nivel del mar

ALTURA		
De 0-1.000 msnm	1.000-1.500 msnm	1.500-2.500 msnm
Simmons Catalina Booth 8 Booth 7 Masutomi Kahalú	Choquete Kahalú Hall Simpson Booth 8 Guatemala Fujikawa Itzama	Nabal (G) Azteca Fuerte Hass Ettinger Wurstz

Fuente: Anacafé (3)

### Variedad Hass

El árbol es sensible al frío, por lo que es aconsejable su plantación en zonas libres de heladas. Evitar regiones con vientos calurosos, pues deshidratan tanto las flores como los brotes jóvenes. Época de floración

normal es de diciembre a marzo, floración loca de agosto a octubre cosecha de noviembre a abril y de julio a septiembre. (3)

Principal variedad comercial en el mundo, buen nivel de productividad, fruto oval periforme, tamaño medio, de 200 a 300 gramos de peso, calidad excelente, piel gruesa (resistente al transporte), rugosa, que se pela con facilidad, fruto maduro color violeta oscuro. La pulpa no tiene fibra, contenido de aceite de 18 a 22%, el fruto permanece temporalmente en el árbol, después de madurar sin pérdida de calidad. (3)

#### **4.1.6. Manejo agronómico**

##### **A. Viveros**

Existe la opción de realizar viveros propios para lo cual tendrá que preparar los porta injertos con semillas de árboles criollos con buen desarrollo, buena producción y resistencia a plagas, enfermedades, sequía y otros factores adversos. Procediendo a realizar el semillero en tablones o directamente en bolsas de polietileno de 9 x 12” las cuales se colocan en hileras de tres a 4 filas. Para lograr un buen desarrollo de los patrones se debe procurar un buen cuidado, riegos, fertilización y control de plagas y enfermedades. (3)

##### **B. Propagación**

La propagación por injerto es el método más apropiado para reproducir las variedades seleccionadas de cultivo comercial, ya que los árboles injertados son uniformes en cuanto a la calidad, forma y tamaño de la fruta. Las semillas deben provenir de frutas sanas, de buen tamaño, cosechadas directamente del árbol. Su viabilidad dura hasta tres semanas después de extraída de la fruta. La semilla se lava con agua limpia y se expone al sol durante una hora, removiéndola cada quince minutos, esto facilita el desprendimiento de la testa. Es necesario someter la semilla a tratamiento con fungicida para disminuir la incidencia de enfermedades. (3)

Es recomendable cortar la parte angosta de la semilla, en un tramo de una cuarta parte del largo total, para ayudar así a la germinación y para hacer una primera selección, ya que el corte permite eliminar las semillas que no presenten el color natural blanco amarillento, debido a podredumbre, lesiones o cualquier otro daño. Inmediatamente después se siembran en las bolsas colocándolas de modo que la parte cortada quede hacia arriba. Las semillas empiezan a brotar aproximadamente treinta días después de sembradas. (3)

### C. Injerto

El injerto se realiza cuando el tallo de la planta patrón tiene aproximadamente 1 centímetro de diámetro, el cual se alcanza entre los 4-6 meses después de la siembra. La altura a que debe injertarse es a 20-30 centímetros de la base. Injertar en un lugar fresco y aireado para lograr una buena unión vascular entre el patrón y el injerto. (3)

### D. Plagas (insectos y ácaros)

- **Trips:** Los trips son pequeños insectos que se alimentan de tejidos tiernos como: brotes foliares y florales, hojas y frutos pequeños.
- **Barrenador de ramas** (*Copturus aguacate Kissinger*): Es un coleóptero que oviposita en la corteza de ramas.
- **Barrenador del Hueso** (*Stenomoma catenifer Walsingham*): Es una palomilla de color amarillo pálido a café claro, el daño lo realizan las larvas que penetran el fruto hasta llegar a la semilla para alimentarse de ella.
- **Agalla de la Hoja** (*Trioza anceps Tuthill*): Es un Psilido pequeño de 2 a 5 mm. De largo, distribuido en toda Guatemala, bajo nuestras condiciones se han observado daños severos en la variedad Hass.
- **Enrollador de la hoja ó Gusano Telarañero** (*Amorbia sp.*): Es una palomilla en forma de campana que mide 2.5 cm. De expansión alar, son de color café claro.
- **Araña Roja** (*Oligonychus sp.*): Es un acaro que con dificultad se puede observar a simple vista, es de color café-rojizo. (3)

### E. Enfermedades

**Tristeza del Aguacate:** Causada por el hongo del suelo (*Phytophthora cinnamomi*), es una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de aguacate en el mundo. Las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo son: Suelos arcillosos con mal drenaje interno exceso de humedad, temperatura del suelo alta y un Ph ligeramente ácido. El hongo se puede propagar por medio del agua de riego, maquinaria, herramienta de trabajo, calzado. El primer síntoma en árboles infectados es un marchitamiento de la planta por pudrición de raíces absorbentes y secundarias, disminuyendo la absorción de agua y de nutrientes, las hojas se tornan de color amarillento y las puntas de las mismas pierden rigidez como si necesitaran agua, al final la plantía muere. (3)

#### 4.1.7. CARACTERISTICAS GENERALES DE *Phytophthora*.

##### A. Ubicación Taxonómica

El género *Phytophthora* pertenece a (36):

- DOMINIO Eucariota
- SUB-GRUPO Heterokonta
- REINO Cromista (grupo Stramenophyle)
- PHYLUM Oomycota
- CLASE Oomicete
- SUB CLASE Peronosporomycetidae
- ORDEN Peronosporales
- GENERO *Phytophthora*
- ESPECIE: *Phytophthora cinnamomi* Rands

##### B. Caracteres morfológicos generales de las especies de *Phytophthora*.

###### a. *Micelio*.

Todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo, de paredes paralelas o irregularmente calibradas, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. El micelio es cenocítico, observándose solo raramente la presencia de algunos tabiques que normalmente se encuentran separando las partes viejas carentes de protoplasma (5, 38).

Existen algunas especies en las cuales, bajo ciertas condiciones de cultivo, el micelio se presenta toruloso, con protuberancias y vesículas como por ejemplo en *P. cinnamomi*, *P. cactorum* y *P. cryptogea* (5, 38).

En los medios de cultivo el micelio se presenta aéreo, el cual puede ser marcadamente radiado o ligeramente estrellado, presentándose los bordes de la colonia redondeados o sinuosos y sumergido en el medio siendo precisamente en este último en el que pueden diferenciarse las protuberancias y engrosamientos, más o menos notable (36).

El micelio es capaz de vivir de forma saprófita sobre las partículas de materia orgánica del suelo en ausencia del huésped (18, 20). Sin embargo según otros autores (40) existe una invasión muy pobre de la materia orgánica por parte del micelio, y el movimiento de este través del suelo es muy pequeño o nulo.

Es importante señalar que en el cultivo in vitro se pueden originar variaciones del aspecto del micelio en algún sector de la colonia, las cuales pueden ser relevantes tanto macroscópica como microscópicamente en cuanto a la morfología, así como desde el punto de vista fisiológico y parasitario, debido a la posibilidad de producirse nuevas razas más virulentas (5).

Cuando las especies del género *Pythophthora* son cultivadas in vitro el desarrollo del micelio se ve condicionado por varios factores tales como la composición del medio, la temperatura, los nutrientes, la tensión de oxígeno y de CO<sub>2</sub>, el pH y en menor escala la luz (14, 36).

El tipo de medio ejerce una influencia muy importante en la velocidad de crecimiento, el cual se ve favorecido en aquellos ricos en hidratos de carbono. Es importante resaltar el papel que ocupa la temperatura entre los factores que limitan el crecimiento vegetativo, razones por las cuales constituye un parámetro de elevada relevancia en la taxonomía. El margen de temperatura en el cual está comprendido el desarrollo del micelio va desde 1 °C de temperatura mínima hasta los 37 °C como máxima temperatura de crecimiento activo, situándose entre los 20-28 °C la temperatura óptima para la mayoría de las especies, teniendo en cuenta que este valor es específico para cada una de ellas (5).

En el caso del pH el rango permisible para el cultivo in vitro de estas especies se encuentra entre 3.5 y 10, siendo el crecimiento óptimo específico para la mayoría de las especies, encontrándose en un rango entre 4.5 y 5.5. Generalmente, los valores de pH que permiten el mejor desarrollo del micelio, también son favorables para la producción de esporangios, clamidosporas y oosporas (5).

## C. Reproducción.

Las especies del género *Phytophthora* presentan dos tipos de reproducción: asexual (con la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas) y sexual (mediante la formación de oosporas).

### a. Reproducción asexual.

El esporangióforo no se diferencia normalmente de las hifas, aunque en algunas ocasiones este puede ser más ancho o delgado que éstas y puede presentar hinchamientos.

La presencia de esporangios es común para todas las especies del género, son incoloros o de color amarillo tenue y de manera general se insertan terminalmente en el esporangióforo, aunque también pueden estar intercalados.

El esporangio muchas veces presenta vacuolas y al microscopio se observa un aspecto granuloso en su interior.

Existen características del esporangio que son muy importantes para la taxonomía de las especies como su forma y tamaño, la presencia o no de la papila y sus dimensiones, la manera en que estos se producen, así como la mayor o menor facilidad de este para desprenderse del esporangióforo (esta última característica permite clasificarlos en caedizos: si se desprenden fácilmente del esporangióforo y no caedizos: si se desprende difícilmente) siendo también importante desde el punto de vista taxonómico la longitud del pedicelo que va unido al esporangio cuando este se desprende del esporangióforo (5, 42).

Existen factores que afectan la producción y el desarrollo de los esporangios como son: la humedad, la tensión de oxígeno, la luz, la temperatura y la nutrición.

La presencia de humedad es fundamental para la formación de esporangios, aunque la cantidad necesaria de la misma varía para cada especie. En la mayoría de las especies los esporangios se producen más abundantemente en presencia de luz, aunque el efecto de la misma es muy variable, llegando a estimularla en algunos casos e inhibiéndola en otros.

El factor temperatura, que como se indicó anteriormente ejerce una gran influencia en el desarrollo vegetativo del hongo, también influye grandemente en el desarrollo y formación del esporangio. La temperatura óptima para la producción de esporangios es diferente y específica para cada especie, por lo que juega un papel destacado en la taxonomía, las mismas están comprendidas entre los 20 y los 28 °C (5, 42).

Las zoosporas se forman dentro del esporangio, para lo cual es necesario la presencia de agua libre. La formación de estas puede estimularse in vitro cuando se incuba un cultivo con esporangios durante pocos minutos a temperaturas entre 5 y 10 °C. La exposición más prolongada a estas temperaturas (10-15 minutos) provoca que las zoosporas sean liberadas, lo cual constituye la forma de germinación indirecta de estos hongos.

Las especies de este género presentan además una forma de germinación directa, en la cual el tubo germinativo se origina, principalmente, a partir de la papila del esporangio, este a su vez puede dar lugar rápidamente al micelio o producir un nuevo esporangio, todo lo cual depende de las condiciones del medio de cultivo (5, 42).

Las zoosporas son las estructuras primarias que causan una nueva infección de las raíces. Estas esporas pueden nadar cortas distancias en el suelo con elevada humedad, así como también pueden ser transportadas grandes distancias en el agua de irrigación o por las lluvias. Además de esta forma de dispersión las especies de *Phytophthora* pueden dispersarse en la naturaleza por el aire o siendo transportadas por la actividad de los humanos y algunos invertebrados (31).

Los miembros de este género producen además clamidosporas, las cuales constituyen un órgano de conservación y supervivencia (15). Generalmente son de forma redondeada con una pared bien definida (más

de 2 micras de espesor), siendo comúnmente intercalares aunque también pueden encontrarse en el extremo terminal de la hifa. Al principio las clamidosporas son hialinas, tornándose de un color amarillo o ligeramente marrón con la edad. Es importante señalar que no se forman en todas las especies, por lo cual su presencia es importante para la taxonomía de las mismas (5, 36).

Las clamidosporas pueden germinar dando lugar a numerosos tubos germinativos o a la producción de esporangios, lo cual dependerá de la cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo.

En cuanto a la influencia de la temperatura se plantea que un rango entre 18-30 °C es óptimo para que ocurra la germinación de las clamidosporas, aunque también se ha producido germinación entre 9-12 °C y a 33 °C.

El pH óptimo para que ocurra este proceso está comprendido entre 5 y 7, aunque a valores de pH de 3 y 9 también se ha producido germinación de las clamidosporas (5, 42).

Además es importante mencionar que las clamidosporas que persisten en el suelo constituyen también unidades infectivas (20).

#### D. Reproducción sexual.

Los órganos sexuales constituyen el elemento taxonómico más constantes y por tanto son de gran valor en la clasificación de las especies. No todas las especies los producen o se muestran inconstantes en cuanto a su formación, por lo que en algunos casos se requieren medios de cultivo especiales. Incluso en la naturaleza existen casos, como por ejemplo *P. citrophthora*, donde no se ha observado la producción de estos órganos de reproducción (5, 36).

##### *a. Oogonio (Órgano sexual femenino)*

Es de forma esférica o ligeramente ahusada, usualmente se encuentra en el ápice de una hifa, aunque también puede aparecer intercalado, separado del resto de la hifa por un grueso tabique. En cultivos jóvenes es hialino pero posteriormente, con el envejecimiento, se torna amarillo o ligeramente marrón. En la mayoría de las especies es suave y puede presentar ligeras protuberancias o verrugas en algunos casos (5, 42).

##### *b. Anteridio (Órgano sexual masculino)*

Presenta una forma variable, puede ser esférico, oval, en forma de clavo o cilíndrico. Observándose de manera habitual solitario, hialino y con una pared externa delgada. Su disposición respecto al oogonio puede ser anfígeno o paragino, o ambas a la vez, siendo importante tener en cuenta esta disposición para realizar la clasificación taxonómica de las especies (5, 42).



Oospora:

Siempre se presenta de manera individual, ocupando relativamente toda la cavidad del oogonio. Es de forma esférica, lisa o moderadamente verrugosa, y su coloración puede ser hialina o ligeramente amarillo oscuro.

El medio de cultivo ejerce una influencia considerable en la formación de la oospora, los medios naturales ricos, tales como el maíz y la avena, son los más favorables. No produciéndose en medios líquidos. (22)

Es importante señalar también que existen ciertas sustancias que favorecen su formación, como son los extractos de plantas, ciertas vitaminas y algunos esteroides.

Entre otros factores que también influyen en la formación de la oospora podemos citar la tensión de oxígeno y CO<sub>2</sub>, la presencia de luz, la temperatura cuyo óptimo está entre 20- 22 °C, así como también los cultivos asociados de diferentes especies y razas que facilitan la producción de oosporas entre las especies heterotálicas (especies auto estériles).

Dentro de las especies heterotálicas se encuentran:

- *P.cinnamomi*
- *P. palmivora*
- *P. citrophthora*
- *P. parasitica*
- *P. arecae*
- *P. cambivora*
- *P. capsici*
- *P. colocasiae*
- *P. cryptogea*
- *P. drechsleri*
- *P. infestan*
- *P. meadii*
- *P. mexicana*

La formación de la oospora es el resultado de la fertilización de una oosfera uninucleada, la cual tiene lugar de diferentes formas según la posición del anteridio.

Una vez que se ha formado la oospora esta entra en un período de reposo en el cual se distinguen dos estados: Latencia constitutiva y Latencia exógena.

Una vez terminado este período la oospora germina dando lugar a un tubo germinativo, que a su vez deriva en la formación de un esporangio, o con la formación del talo micelial (5, 36).

Es importante mencionar que todos los procesos de reproducción, ya sean sexuales o asexuales, juegan un papel fundamental en el ciclo de vida del hongo.

El aguacate es un cultivo tropical o subtropical nativo de las Américas. Son cuatro las especies de *Phytophthora* que causan enfermedades en este cultivo: *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. palmivora*, *P. heveae*, provocando la pudrición de las raíces, el cáncer del tronco en California, el declinamiento de las plantas de semillero, y cáncer del tronco en Guatemala, respectivamente. (42)

Pudrición de las raíces:

*P. cinnamomi* fue descrito por primera vez en 1922 por Rands, en plantas de canela y desde entonces ha sido encontrado aproximadamente en 70 países de las regiones tropicales y subtropicales, causando enfermedades en diferentes cultivos.

La incidencia de este patógeno sobre el aguacate se describió por primera vez en 1927, en Puerto Rico, y actualmente podemos encontrarlo como agente causal de la pudrición de las raíces del aguacate en casi todas las áreas del mundo donde se practica este cultivo (por ejemplo: Estados Unidos, México, América Central y América del Sur, el Caribe, Australia, Nueva Zelanda, África, Israel, España, Marruecos, etc. (42)

La incidencia de esta enfermedad en las plantaciones provoca grandes pérdidas en la industria del aguacate y constituye un problema serio en la mayoría de las regiones tropicales donde se practica este cultivo.

La pudrición de las raíces por *P. cinnamomi* provoca un declinamiento progresivo del árbol, en el cual se observan hojas más pequeñas que lo normal, usualmente de color verde pálido o amarillentas y a menudo marchitas. Las ramas mueren regresivamente producto del avance de la enfermedad y los frutos son de corteza brillante.

Como consecuencia de esta enfermedad el árbol muestra un aspecto general de marchites y la copa del mismo se va desfoliando, llegando a secarse completamente en estados avanzados de la enfermedad. Como resultado la fructificación va decayendo, aunque a veces se puede producir una fructificación excesiva, con frutos de pequeño tamaño que no llegan a engordar.

Producto del ataque del hongo las raíces alimenticias (o raíces absorbentes) mueren, observándose ennegrecidas y quebradizas, siendo posible no encontrarlas en estados avanzados de la infección, sin embargo la infección raramente se extiende hacia las raíces principales (20).

Esta enfermedad puede producirse bajo un amplio rango de temperaturas del suelo que va desde 21 hasta 30 °C, produciéndose muy poca o ninguna infección a 33 °C y muy poca a temperaturas entre los 9-10 °C (9, 14, 32, 41). Se presenta mayormente en los suelos con un drenaje deficiente, siendo la presencia del hongo y el exceso de humedad los dos factores que potencian el rápido desarrollo de la enfermedad (18, 19).

En el caso de la pudrición de las raíces del aguacatero las zoosporas son atraídas por las raíces mediante un proceso de quimiotáctico, luego germinan y penetran las raíces iniciándose la pudrición de las mismas.

Cáncer del tronco:

Al menos tres especies de *Phytophthora* provocan cáncer del tronco en el aguacate: ***P.cinnamomi***, ***P.heveae*** y ***P.citrícola***.

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de una zona decolorada en la parte baja del tronco y la exudación de grandes cantidades de un polvo blanco (un azúcar hepta-carbonado común en el aguacate) (27, 42).

Control de la enfermedad:

Virtualmente es imposible erradicar ***P. cinnamomi*** una vez que este se ha instalado en el suelo plantado. Sin embargo los cultivadores de aguacate emplean un conjunto de medidas prácticas para reducir el daño a las raíces y lograr evitar el declinamiento del árbol.

Algunos autores plantean que el control sobre ***P. cinnamomi*** puede lograrse aplicando un conjunto de medidas que forman parte de un programa integral el cual abarca la prevención, las buenas practicas culturales, medidas de control biológico, el control químico y el uso de patrones resistentes.

Dentro de estas medidas se encuentran plantar en suelos con un adecuado drenaje interno, producir patrones libres de la enfermedad en semilleros certificados y prevenir el movimiento de suelo o de agua de las áreas infectadas hacia las áreas con un crecimiento saludable.

Un factor que debe ser cuidadosamente controlado es la irrigación del terreno plantado, tratando de evitar que el suelo se torne demasiado húmedo ya que esta enfermedad se ve favorecida en los suelos con un exceso de humedad.

Pueden utilizarse productos fungicidas tales como el Ridomil (metalaxil) y el Alitte (fosetil Al), sin embargo el tratamiento químico es muy costoso.

Trabajos previos sobre el uso de patrones resistentes al ataque del hongo indican que este podría ser el método más satisfactorio para controlar la pudrición de las raíces del aguacatero por *P. cinnamomi*. Estudios realizados en California reportan como relativamente resistentes a los patrones: Duke 6, Duke 7, G 22, G 6, Huntalis, Barr Duke y Thomas (16, 17, 27, 37).

## E. Aislamiento

Alternativa a tierra directa en placas, diversos métodos han sido desarrollados para cebo *Phytophthora* especies de la tierra, incluido el uso de plantas sensibles, pedazos de hoja, las manzanas, peras, altramuces radicales, y agujas de pino. *Phytophthora cinnamomi* es la más fiable detección de muestras de suelo fresco utilizando la hoja de camelia piezas como cebo. Una submuestra de la nueva tierra se inunda en una cápsula de Petri profundas y inundados con 50 ml de agua destilada. Cinco superficie de la hoja de camelia disinfestados discos son flotaba en la placa y se incuban en la oscuridad durante 72 horas. Los cebos son a continuación eliminados, borrados en una toalla de papel, y chapada en PARPH-V8.

## F. Identificación

Esporangios son ovoides, piriformes con un engrosamiento apical, cónico o redondeado en la base, terminales y cargo. Esporangios, que liberan zoosporas móviles. Chlamidosporas que se producen abundantemente en los tejidos infectados. Hifas globosas y con paredes delgadas. Los tamaños van desde 31 a 50 micras de diámetro y están a la terminal, ya sea intercalado en el micelio. El hongo es heterotálico, que requieren tipos compatibles a esporulación sexualmente. Anteridia con un promedio de 19x17 micras. Oogonia redonda con una base cónica, lisa, hialina a amarillo, con dimensiones que van desde 21 a 58 micras. Oosporas hialino a amarillo de 19 a 54 micras (9).

## G. Ciclo de enfermedades y epidemiología

Clamidosporas, la supervivencia de esporas de *P. cinnamomi*, puede persistir hasta seis años, y se producen en las raíces infectadas, corona, y suelo infestado (10, 12). La germinación se produce en una forma óptima de agua del suelo mátrico potencial entre -5 y 15°C (2). *P. cinnamomi* crece y se infecta en forma óptima a través de temperaturas más altas, pero es capaz de infectar a temperaturas tan bajas como 15 ° C (10). En virtud de óptimo abastecimiento de agua y condiciones de temperatura, las clamidosporas germinan para producir esporangios, para la liberación de zoosporas infecciosas (10). Por lo tanto, el exceso de agua en el suelo aumenta la incidencia y la gravedad de la enfermedad (12). Por lo tanto, la enfermedad no

es tan común en la suelos arenosos bien drenados (10). Una vez que una planta está infectada, el flujo de agua a través del xilema se reduce a través de la inducción de marchitamiento-toxinas, tales como  $\beta$ -glucanos y  $\beta$ -glucano hidrolases. A diferencia de plantas sanas, las infectadas con *P. cinnamomi* no pueden recuperarse de las tensiones de la baja humedad del suelo. El uso excesivo de nitrógeno de los fertilizantes aumenta la susceptibilidad a las enfermedades debido al aumento de la absorción de agua de la matriz del suelo (10). La dispersión se produce a través de múltiples vías: el agua subterránea, arroyos, y el riego, así como en macetas de suelo infestado, salpicaduras, semilleros enfermos, etc.

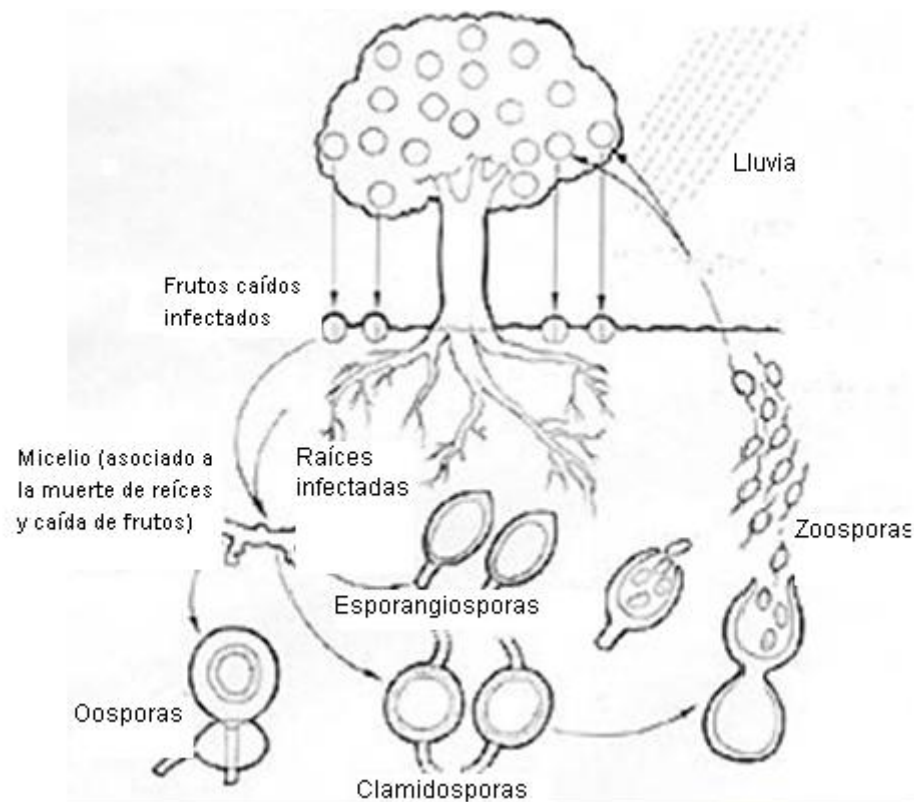


Figura 1: Ciclo de Reproducción de *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Fuente: Belize citrus Growers (8)

#### 4.2. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo.

#### Reactivos

Tubos de PCR que albergan la mezcla en un volumen total de 100  $\mu$ L. Para realizar la técnica se necesitan: (9)

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores (o primers), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia (no más de 4 kb. Delimitan la zona de ADN a amplificar.
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio ( $Mg^{2+}$ ), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso ( $Mn^{2+}$ ), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de  $Mn^{2+}$  incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de  $70^{\circ}C$  (la más común es la Taq polimerasa).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

#### Ciclo de amplificación

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos de temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ( $> 90^{\circ}C$ ), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen

de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores. (9)

- **Inicialización**

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C (ó 98°C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

- **Desnaturalización**

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

- **Alineamiento/Unión del cebador**

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

- **Extensión/Elongación de la cadena**

Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80°C (comúnmente 72°C). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a

amplificar. Hay una regla básica: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto.

- **Elongación final**

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

- **Conservación**

Este paso se lleva a cabo a 4-15°C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 0.2-0.5 ml, en pequeños tubos de 15-100 µl que se colocan en el termociclador.

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la electroforesis capilar.(5) El/los tamaño/s de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de peso molecular de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR.

Agronomía y diversidad tal y como la PCR multiplex permite producir huellas genéticas de individuos concretos, dentro del marco de la genética forense, existen métodos basados en la PCR que permiten discernir entre grupos infraespecíficos de cultivos de interés agronómico; por ejemplo, de cultivares (10). Para ello, se emplean oligonucleótidos de un tamaño lo suficientemente pequeño como para que ceben de forma relativamente inespecífica, aunque siempre de tal forma que produzcan un patrón de bandas discreto e interpretable. De este modo, la pauta obtenida tras la electroforesis de los fragmentos tiende a agrupar a los individuos de mayor semejanza, que poseen un comportamiento similar, de los que divergen.

El actual desarrollo de las técnicas de genética molecular ha permitido sustituir el marcado físico por un marcado genético, más eficiente en tanto que se transmite a generaciones sucesivas. Durante los últimos años, un grupo de estos marcadores genéticos, los denominados microsatélites, han sido la herramienta más utilizada para estudiar distintos aspectos de interés, como son el éxito reproductivo, la estructura social y el parentesco entre individuos en una amplia variedad de especies vegetales y animales, incluidas algunas de peces (29, 6, 2, 32, 14)



Los microsatélites son secuencias de ADN nuclear constituidas por repeticiones en tándem de entre uno y seis nucleótidos (33) y cuya longitud total es inferior a 0,2 kb. Las regiones flanqueantes de los microsatélites son secuencias únicas, lo que determina la especificidad de locus (24, 39). El polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado refleja la existencia de variaciones en el número de veces que se encuentra repetido el motivo que origina el microsatélite (35, 24, 39).

Los microsatélites presentan características que les hacen especialmente interesantes como marcadores genéticos: a) son muy abundantes en el genoma, lo que, en principio, permite disponer de tantos como sean necesarios para el trabajo concreto que se desarrolla; b) muestran niveles muy altos de variabilidad (significativamente mayores que los loci que codifican proteínas), lo que permite llegar a la caracterización inequívoca del individuo; c) son marcadores codominantes que se heredan de forma mendeliana, lo que les hace más informativos en estudios de pedigríes; y d) para su análisis sólo se necesitan cantidades mínimas de tejido y, por tanto, obtenibles con técnicas no lesivas para el individuo y que no afectan a su supervivencia. La posibilidad de establecer de forma precisa la relación genética entre dos individuos depende fundamentalmente del nivel de variabilidad de los loci considerados, y también del número de éstos (7). Aun aceptando que los microsatélites son la mejor herramienta para este cometido, es importante asegurar un número mínimo de loci informativos para cada caso en función de los niveles de variación que presente (4)

En este trabajo se pretende comprobar la utilidad de los loci microsatélites en el establecimiento de relaciones de parentesco que puedan ser utilizadas para mejorar cuestiones prácticas como:

- El establecimiento de pedigríes no documentados. Permitiría el cultivo conjunto de las descendencias o, para caracteres de interés, el cálculo de la heredabilidad estimada por parecido entre parientes en condiciones ambientales homogéneas.
- La identificación del grado de parentesco entre los lotes de reproductores. Esta información permitiría evitar óptimamente los procesos de endogamia, tan negativos en los resultados a medio y largo plazo.
- La evaluación del éxito de cada reproductor en cuanto a su aportación a la generación siguiente.

Variabilidad de los loci microsatélites: El éxito de los estudios de parentesco depende en gran medida de los niveles de variación genética que sean detectables en las muestras en estudio, ya que las probabilidades de acierto aumentan con el número de loci ensayados, el número de alelos por locus y las frecuencias génicas de éstos (7).

### **4.3. Análisis de diversidad genética**

La mayoría de los análisis de diversidad genética incluyen los siguientes pasos:

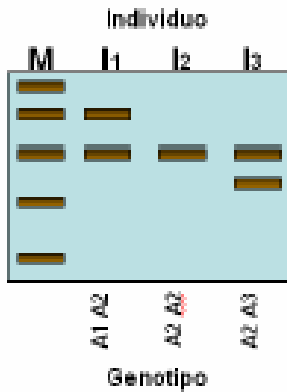
1. **La descripción de la diversidad.** Esto se puede hacer dentro de una población o entre poblaciones. También puede extenderse a unidades más grandes como zonas y regiones. La descripción de la diversidad empieza con la elaboración de tablas de datos resultantes de la lectura de los geles, que pueden variar de formato dependiendo del programa de análisis que se vaya a emplear. Existen diversos parámetros utilizados para estimar la diversidad genética, su aplicación dependerá de los objetivos del estudio y sobre todo del nivel poblacional al que se esté trabajando. De esta manera, cuando se está investigando sobre la diversidad intrapoblacional las medidas de diversidad se desarrollan con respecto a la variación de genes y variantes alélicas. Algunos de los parámetros de diversidad intrapoblacional habitualmente estimados son: la tasa de polimorfismo, número promedio de alelos por locus, heterocigosidad esperada y el número efectivo de alelos. Por otro lado, los parámetros de diversidad entre poblaciones investigan la estructura poblacional. Los estadísticos F (Wright 1951), GST (Nei 1973), y el análisis de varianza molecular (AMOVA) son algunos de los parámetros de diversidad genética interpoblacional habitualmente empleados (11).

2. **El cálculo de las relaciones entre las unidades analizadas (individuos, variedades, subpoblaciones).** Esto implica el cálculo de las distancias entre todos los pares de unidades analizadas en el estudio. La distancia genética entre dos muestras se define como la proporción de elementos genéticos (alelos, genes, gametos, genotipos) que no son compartidos por ambas muestras. Este puede calcularse como  $1-S$ , donde  $S$  es la similitud entre las unidades. La escogencia apropiada de medidas de distancia debe ser realizada teniendo en cuenta el tipo de marcador molecular con el que se esté trabajando, si éste es dominante o codominante, las características de la especie en cuestión como su nivel de ploidía y los objetivos del estudio, si se van a tener en cuenta aspectos evolutivos, hacer inferencias filogenéticas o no (11, 23).

3. **La expresión de estas relaciones con cualquier método de ordenación y/o clasificación disponible.** Algunos de estos métodos permiten comparar los resultados del estudio molecular con otros tipos de datos (por ejemplo, geográficos, de pedigrí, etc.). Son varios los métodos de ordenación disponibles entre los que se destacan el análisis de clusters, el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), el análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés) y el escalamiento multidimensional (MDS, por sus siglas en inglés). Los dos primeros han sido los más ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética. Entre los métodos de análisis de clusters se destacan el de UPGMA (Unweighted Paired

Group Method using Arithmetic average) y el método de Wards. Adicionalmente, una herramienta útil para reforzar los análisis de clusters o los dendrogramas resultantes, es el bootstrapping que estima los límites de confianza de los agrupamientos, utilizando un método de remuestreo de los datos a partir de la tabla de datos original (25).

**1. Elaboración de geles**



**2. Lecturas de bandas, descripción de la variación**

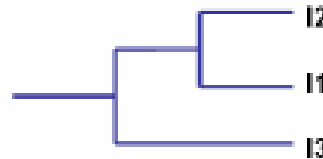
	Locus A
I1	1,1,0
I2	0,1,0
I3	0,1,1

	I1	I2	I3
A1	1	0	0
A2	1	1	1
A3	0	0	1

**3. Calculo de distancias, relaciones entre individuos**

	I1	I2	I3
I1	0		
I2	0,5	0	
I3	0,3	0,26	0

**4. Construcción de dendrogramas, graficación de las relaciones.**



*Figura 2. Pasos a seguir para llevar a cabo un análisis de diversidad genética (1) Se elaboran los geles donde son visualizados los productos de PCR de los marcadores moleculares escogidos, en este caso se tienen tres genotipos y un marcador molecular codominante A. (2) Se evalúa la variabilidad entre las unidades de estudio, a partir de las tablas de datos extraídos de la lectura de geles. (3) Se calculan las relaciones entre las unidades de estudio. (4) Se representan gráficamente las relaciones encontradas en el punto anterior.*

**4.3.1. Marcadores microsatélites para el análisis de diversidad genética**

En la actualidad se dispone de diversos tipos de marcadores moleculares para evaluar la diversidad genética. Estos incluyen marcadores basados en el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), amplificación aleatoria de secuencias polimórficas de ADN (RAPD, por sus siglas en inglés), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés) y microsatélites o secuencias sencillas repetidas (SSR, por sus siglas en inglés). Estos marcadores se diferencian en su grado de polimorfismo, dominancia y técnicas de detección. Un número de marcadores moleculares están basados en la presencia de secuencias repetitivas de ADN, las cuales representan una proporción importante del genoma de organismos eucariotas. Dentro de esta clase de marcadores se

encuentran las repeticiones de secuencia simple (SSR) o microsatélites. Los microsatélites consisten en repeticiones cortas de 1 a 10 pb; los más típicos miden de 2 a 3 pb. Estos marcadores también son denominados sitios de microsatélite de secuencia etiquetada (STMS) o polimorfismo de repeticiones de secuencia simple (SSRP). Los microsatélites son comunes en organismos eucariotas; el número de unidades repetidas varía ampliamente entre los organismos hallándose en algunos hasta 50 copias de la unidad repetida. El nombre “satélite” se debe a que las secuencias repetitivas forman un nódulo satélite distinto al nódulo principal de ADN genómico en la separación de ADN en gradientes de cloruro de cesio, por contener una proporción de pares de bases G-C diferente a la media del resto del genoma.

Los microsatélites son amplificados mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando “primers” específicos complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite (secuencia “blanco”). Cada locus de microsatélite es analizado individualmente al utilizarse el par de “primers” construido específicamente para su amplificación. Los microsatélites son *altamente polimórficos*. Su polimorfismo se deriva de la presencia de diferente número de elementos simples repetidos. Los microsatélites son *marcadores codominantes y multialélicos*.

Ambos alelos de un individuo heterocigótico son visualizados; y potencialmente pueden detectarse y discriminarse todos los alelos de un locus dentro de una población. Cada segmento amplificado de tamaño diferente representa un “alelo” diferente del mismo locus. El polimorfismo de SSR se puede visualizar mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio, nitrato de plata, radioisótopos o fluorescencia.

El descubrimiento de regiones microsatélites ha sido uno de los limitantes para la utilización de estos marcadores en estudios de diversidad genética (y otras aplicaciones), pues requiere del conocimiento de la secuencia del genoma.

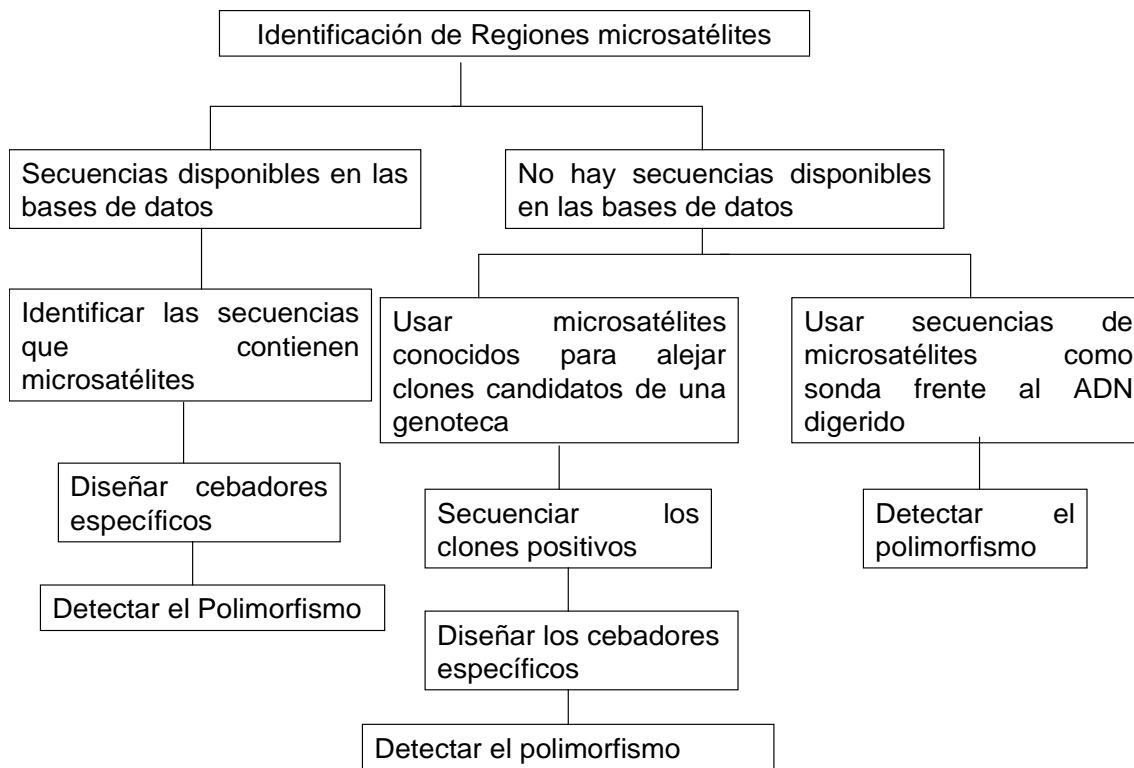


Figura 3: Identificación de regiones microsatélites

En especies en las que esta información es limitada o inexistente, la identificación de microsatélites es un proceso arduo que incluye la construcción de genotecas, selección de colonias, secuenciación de clones y el diseño de primers. Sin embargo, a medida que las nuevas estrategias moleculares de secuenciación se tornan más simples, automatizadas y accesibles, los marcadores microsatélites serán utilizados para un número mayor de especies.

#### 4.3.2. Electroforesis del ADN en geles de agarosa

La concentración e integridad del ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos de ADN (por ejemplo, productos de PCR) pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis. La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración

de agarosa en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel.

Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante la tinción con bromuro de etidio, lo cual permite evaluar la integridad del ADN y estimar su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de concentración conocida. La técnica para la cuantificación de ADN consiste simplemente en la utilización de una secuencia de concentraciones de solución patrón de ADN con la que se comparan muestras de ADN de concentración desconocida. El cálculo de las concentraciones se hace bajo la luz ultravioleta según la fluorescencia. Debe evitarse la exposición prolongada a la luz ultravioleta, incluso con máscara de protección. La estimación de las concentraciones de ADN puede realizarse sobre una fotografía digital del gel tomada bajo luz ultravioleta si se cuenta con un analizador de imágenes.

#### **4.3.3. Amplificación de secuencias microsatélites (PCR de microsatélites)**

Las regiones que contienen microsatélites son amplificadas individualmente a través de la reacción en cadena de polimerasa (*PCR*) a partir de un par de “primers” específicos (de 20 a 30 pares de bases) con secuencias complementarias a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Es posible amplificar varios loci microsatélites simultáneamente, siempre y cuando tengan tamaños suficientemente diferentes y migren hacia zonas separadas del gel. En estos métodos de genotipado “múltiplex” son utilizados más de un par de primers en la misma reacción de PCR.

La PCR debe ser ajustada para amplificar cada microsatélite a estudiar pues estos varían en tamaño y secuencia. Un ciclo de PCR, el cual se repite al menos una decena de veces, consta de tres etapas:

1. Desnaturalización del ADN. El ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar entre 92 y 95oC.
2. Apareamiento (“annealing”). En esta etapa la temperatura es rápidamente reducida entre 35oC y 60oC, dependiendo esencialmente de la secuencia y tamaño del “primer” utilizado, para promover la hibridación ADN-ADN de cada primer con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco”.
3. Elongación o polimerización. La temperatura es elevada a 72oC para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de la terminal 3’ de los “primers” mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia “blanco”. Para la polimerización se requiere de Mg<sup>2+</sup>.

El ajuste u optimización de la PCR para cada par de primers se realiza variando la temperatura de apareamiento y/o la concentración de  $Mg^{2+}$ . Una temperatura de apareamiento muy baja reduce la especificidad de apareamiento entre los primers y la secuencia “blanco” dando como resultado múltiple bandas; una temperatura muy alta limita el apareamiento entre los primers y sus secuencias “blanco” dando como resultado la ausencia de productos. La concentración óptima de  $Mg^{2+}$  debe ajustarse para cada nueva secuencia, usualmente la concentración utilizada está en el rango de 1 a 4 mM. Generalmente, la optimización se inicia variando en 1 o 2°C la temperatura de apareamiento; pueden realizarse múltiples pruebas simultáneas si se dispone de un termociclador de gradientes. Una vez determinado el óptimo de la temperatura de apareamiento (o si cambios en ésta no resultan en mejores resultados) puede modificarse la concentración de  $Mg^{2+}$ .

## **4.4. MARCO REFERENCIAL**

### **4.4.1. Tierras altas volcánicas**

Lo que se denomina Tierras Altas Volcánicas, comprende principalmente lo que se conoce como altiplano, el cual toma en cuenta tanto la porción occidental y central, así como la que se localiza al oriente guatemalteco.

Estas tierras se encuentran parcialmente en los Departamentos de San Marcos, Quetzaltenango, Totonicapán, Sololá, Chimaltenango, Sacatepéquez, Guatemala, Jalapa, Santa Rosa, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa. Desde el punto de vista geológico, comprende especialmente el Terciario Volcánico, en donde se incluye Rocas Volcánicas sin dividir y en algunos casos depósitos volcánicos del cuaternario. Se ha involucrado en esta región, algunas tierras sobre materiales Intrusivos, principalmente Granitos y Dioritas, que se encuentran principalmente al norte de San Marcos, al Norte de Totonicapán y en las proximidades del cauce del río Motagua en la parte nororiental del país. Lo anterior se da como consecuencia de las evidencias encontradas en similitud de condiciones climáticas y por razones de mapeo a la escala de trabajo que se utilizó en la delimitación de cada una de las regiones.

Algunos poblados que se encuentran dentro de la región de las tierras altas volcánicas, son: San José Ojetenán, Comitancillo, Sibilia, Palestina de los Altos, San Marcos, Quetzaltenango, San Francisco el Alto, Totonicapán, todos los municipios del norte de Sololá, Chimaltenango, San Martín Jilotepeque, Antigua G., Guatemala, Palencia, Nueva Santa Rosa, Cuilapa, Jalapa, Monjas, Agua Blanca, Esquipulas, Jutiapa, Achuapa, Quezada. En esta región la mayor parte de las tierras están cubiertas con bosques, cultivos de subsistencia, hortalizas (de consumo nacional y exportación), frutales decíduos.



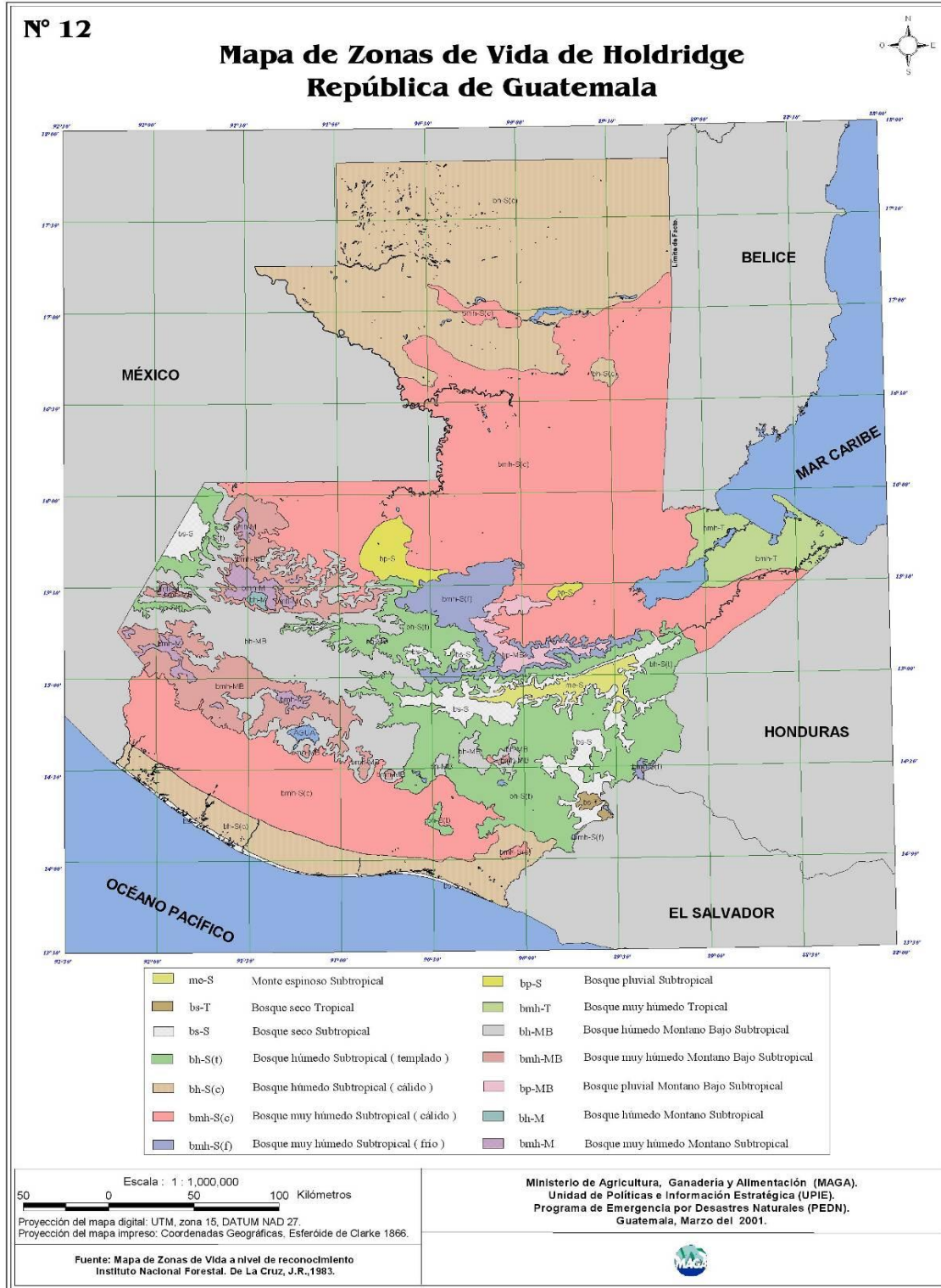


Fig. 4: Zonas de vida presentes de Guatemala elaborada mediante la metodología de Holdridge

Fuente: Base de datos del MAGA

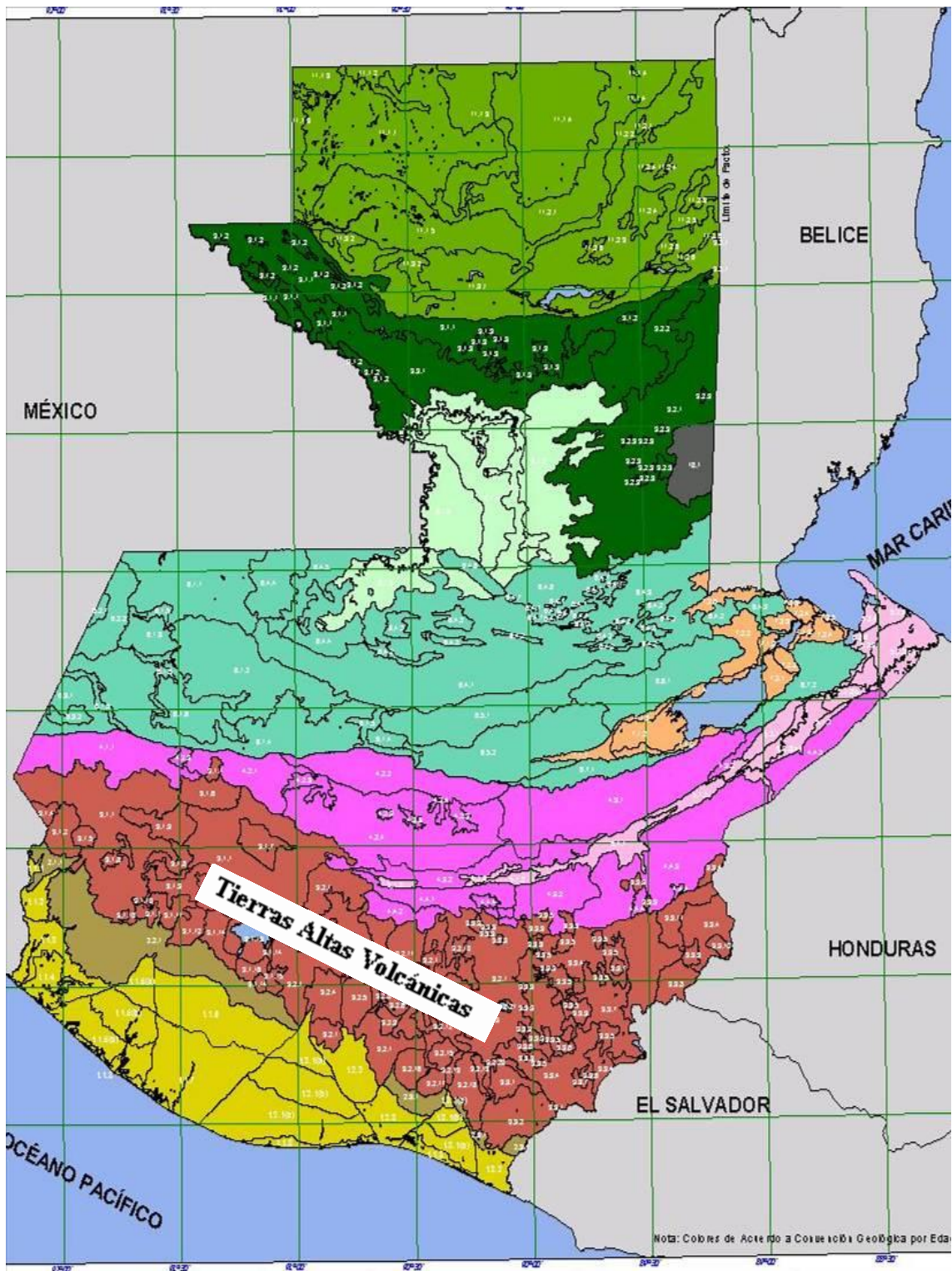


Figura 5: Mapa fisiográfico de la República de Guatemala, donde se da a conocer la ubicación de las Tierras Altas Volcánicas.

Fuente: MAGA

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. *General*

- Diagnosticar patogénicamente y caracterizar molecularmente el hongo *Phytophthora cinnamomi* **Rands** en el cultivo de aguacate en las Tierras Altas Volcánicas del País de Guatemala.

### 5.2. *Específicos*

- Determinar la patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* **Rands** mediante los postulados de Koch.
- Caracterizar molecularmente *Phytophthora cinnamomi* **Rands** por medio de la técnica de marcadores moleculares microsátélites.

## 6. HIPOTESIS

Las muestras de suelo y tallo de las plantas de aguacate tomadas en viveros de Chimaltenango, Sacatepequez, Escuintla, Guatemala, Sololá y San Marcos presentarán como agente causal de la tristeza del aguacate el hongo *Phytophthora cinnamomi* **Rands**, en los cuales se podrán encontrar algunas variaciones genéticas dentro de los individuos de esta misma población.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. *Fase de campo*

#### 7.1.1. Establecimiento de los sitios de muestreo

##### A. Muestreos no probabilísticos

Estos tipos de muestreos no permiten generalizar sus resultados a toda la población, no obstante, son muy útiles para estudios exploratorios y en general para estudios de corte cualitativo. La elección del procedimiento depende fundamentalmente de los objetivos del estudio.

Existen diversos métodos en éste tipo de muestreo, uno de ellos es el llamado "Muestreo a juicio", se busca seleccionar a individuos que se juzga de antemano tienen un conocimiento profundo del tema bajo estudio, por lo tanto, se considera que la información aportada por esas personas es vital para la toma de decisiones. En el área de vacunas sintéticas, el Dr Patarroyo, es considerado una eminencia, luego sería un personaje ideal para hablar sobre esa temática. Si se utilizara un método aleatorio, probablemente quedarían en la muestra algunas personas con poco dominio sobre el tema en estudio.

Se pueden encontrar otros nombres en procedimientos de muestreo, sin embargo, se pueden encasillar en alguno de los descritos anteriormente. (26)

Para recolectar muestras de tejidos vegetales y suelo, se establecieron sitios de muestreo tipo dirigido o de juicio, basándose en la sintomatología que define a la enfermedad recolectando al final las plantas en los distintos puntos de muestreo, conociendo los principales viveros en los cuales se producen plántulas de aguacate comercial de la variedad Hass, el cual da a entender que se está muestreando dentro de las parcelas de aguacate y de vivero localizándonos en las partes afectadas de dichas parcelas en donde se presenten los síntomas de tristeza del aguacate. Los nombres de cada sitio están en el Cuadro siguiente:

Cuadro 2: Sitios para la obtención de las cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands

Departamento	Municipio
Escuintla	San Vicente Pacaya
Guatemala	Villa Nueva
San Marcos	San Marcos
Sacatepéquez	Santo Domingo Xenacoj y Santa María de Jesús
Sololá	Atitlan
Chimaltenango	Chimaltenango

### 7.1.2. Recolección de muestras

Para determinar la presencia de *P. cinnamomi* Rands, en cada sitio de muestreo se tomaron el mayor número de plantas posiblemente afectadas por dicho hongo recorriendo el vivero en busca de plantas con los síntomas característicos de la especie, las cuales eran posteriormente colectadas para su propio análisis dentro del laboratorio.



Figura 6: Toma y selección de las plantas con síntomas de marchites.

### 7.1.3. Aislamientos del patógeno en muestras de tallo

Se hicieron siembras in situ de tejido localizado en la corteza interna de las plantas de aguacate con canchales y exudado color oscuro cortando piezas de 3 a 7 mm<sup>2</sup> de tejido enfermo y asintomático serán sembradas en cajas petri con medio de cultivo selectivo PARPH (Erwin y Ribeiro, 1996; Alvarado-Rosales et al., 2007). Se sembraron 3 porciones de tallo en cada siembra, el equipo de disección será desinfectado con alcohol etílico al 95% y posteriormente es flameado, esto con el fin de prevenir alguna contaminación posible dentro del medio de cultivo.

## 7.2. Fase de laboratorio

### 7.2.1. Aislamiento del patógeno

#### A. Método directo

En el laboratorio las muestras de tejido se llevan a la cámara de aislamientos, dividiéndolas en trozos de 7.0 x 3.0 mm aproximadamente y se desinfectan mediante inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, luego se lavan durante 1 min con agua destilada estéril y se secan con papel secante estéril. Los trozos de tejidos luego son sembrados en cajas de Petri con medio selectivo PARPH.

#### B. Método indirecto o trampa

Para aislar a *P. cinnamomi* Rands de suelo se emplea la técnica de la manzana, en donde se utiliza esta fruta para este tipo de hongo ya que se proporciona un medio agri-dulce, el cual permite generalmente el crecimiento de otros Oomicetos como *Pythium* y no de otro hongo en particular. Para utilizar la manzana se realizan de 4 a 5 agujeros circulares de un diámetro de 8 mm aproximadamente con un sacabocados en una manzana, en donde se rellenan seguidamente con 5 a 10 mg de suelo con el fin de llenar los orificios dentro de la manzana y posteriormente se sellan los agujeros con cinta adhesiva para evitar el ingreso de algún otro agente patógeno dentro de la manzana; se deja alrededor de 5 días a que el oomicete crezca dentro de la manzana y se va visualizando durante el transcurso de los días una zona de avance del patógeno dentro de la manzana, en donde al cabo del quinto día se hacen cortes en las zonas de avance del patógeno y son colocados sobre un medio de cultivo selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol). Al observar crecimiento fungoso atribuido al patógeno en el respectivo medio de cultivo selectivo se transfiere a PDA (Papa-Dextrosa-Agar) para purificar la colonia.

#### C. Identificación del patógeno

La identificación se hace mediante características del cultivo y morfología. Para verificar que los aislamientos pertenezcan a *P. cinnamomi* Rands se observa que los esporangios fueran ovoides, piriformes con un engrosamiento apical, cónico o redondeado en la base y terminales. Los esporangios y las Clamidosporas son observadas en abundancia sobre el medio de cultivo PDA. Las hifas del oomicete son del tipo globoso y con paredes delgadas. Los tamaños de los esporangios van desde 31 a 50 micras de diámetro y están en la parte terminal, ya sea intercalado en el micelio. El hongo es heterotálico, que requieren tipos compatibles a esporulación sexualmente. Anteridia con un promedio de 19x17 micras. Oogonia redonda con

una base cónica, lisa, hialina a amarillo, con dimensiones que van desde 21 a 58 micras. Oosporas hialino a amarillo de 19 a 54 micras (5).

Las dimensiones de esporangios de *Phytophthora cinnamomi* Rands, oscilan dentro de un promedio de 46.1 micras de largo y 31.3 micras de diámetro.

### 7.2.2. Caracterización molecular

Para esta metodología se hace uso de la caracterización molecular de todas las cepas aisladas de *Phytophthora cinnamomi* Rands utilizando la técnica de microsatélites la cual consiste en pequeñas secuencias repetidas de nucleotidos, describiendo seguidamente los siguientes pasos necesarios para el desarrollo de los mismos:

#### A. Cultivo de micelio

El patógeno de estudio es colocado en una caja petri de 9 cm de diámetro, en medio de cultivo de PDA para obtener así una cepa de hongo puro, de donde posteriormente se obtiene una mínima cantidad de micelio para realizar la prueba molecular.

#### B. Extracción de ADN

Los materiales utilizados para este proceso son los siguientes:

- Muestra del Oomiceto *Phytophthora cinnamomi* proveniente del medio PDA
- Bisturí
- Micropipetas
- Tubos plásticos de capacidad de 1.5 ml.
- Pistilos de Kontes
- Solución Buffer de extracción (0.34M D-sorbitol, 0.1M Tris-HCl, pH 7.6, 0.5M EDTA, 0.2% v/v 2-mercaptoetanol)
- Vortex
- Centrífuga
- Solución de Isopropanol al 95%.
- Solución de etanol al 70%
- Papel mayordomo
- Solución Buffer de TE (0.1M tris-HCl, pH 7.6-8.0, 0.01 EDTA)

La metodología empleada es la siguiente:

1. Con la ayuda de un bisturí se hace un raspado en la superficie del medio para extraer micelio del Oomiceto.



2. Se coloca el fragmento de micelio dentro de un tubo plástico con capacidad de 1.5 ml y se agregan 400 microlitros de solución Buffer de extracción para romper la pared celular.
3. Posteriormente se hace una maceración y homogenización del micelio con la solución extractora, usando un pistilo de kontes.
4. Seguidamente se agita en el vortex el tubo con el contenido durante 20 segundos para lograr una mezcla homogénea del micelio dentro de la solución extractora.
5. Se deja en reposo el tubo con el contenido durante una hora a temperatura ambiente.
6. Se centrifuga a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para lograr precipitar el micelio ya macerado.
7. El sobre-nadante se transfiere a un tubo plástico nuevo de 1.5 ml de capacidad.
8. Se agregan 300 microlitros de una solución de isopropanol al 95% y mezclando de arriba y abajo.
9. Nuevamente se centrifuga a 12,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para lograr precipitar el ADN del micelio.
10. Se lava el ADN con 100 microlitros de una solución de etanol al 70%
11. Seguidamente se desecha la solución de etanol al 70% con el cuidado de no perder el ADN al momento de trasvasar la solución (Pastilla).
12. Los tubos plásticos que contienen el ADN son colocados en un papel mayordomo para lograr que los restos de etanol al 70% se volatilicen.
13. Se agregan posteriormente 50 microlitros de una solución buffer de TE y se espera que el precipitado (ADN) se disolviera.
14. Al final de todo el proceso los tubos que contienen el ADN son colocados en el refrigerador a una temperatura de -20° C.

### **C. Amplificación por PCR**

Los materiales utilizados para este proceso de PCR son:

- Micropipetas y sus respectivas puntas
- Termociclador
- Tubos plásticos con capacidad de 1.5 ml y 0.5 ml.
- Reactivos y enzimas necesarias para desarrollar la reacción en cadena de la polimerasa PCR.
- Hielo triturado
- Hielera especial

La metodología empleada dentro del laboratorio para el PCR de ADN es la siguiente:

1. Se coloca hielo triturado dentro de una hielera para mantener las soluciones bajo condiciones de baja temperatura.
2. Los tubos conteniendo los componentes correspondientes para la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa PCR ((Taq polimerasa, Buffer, Primer o cebador, Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y dNTPs) son extraídos del congelador y colocados en la hielera que contiene el hielo. Esto con el fin de no dañar los componentes para llevar a cabo el proceso del PCR.
3. Dentro de un tubo plástico de 1.5 ml de capacidad, se agregan las cantidades totales para la preparación de la mezcla maestra (Master mix) y con la ayuda de una micropipeta se mezcla todo el contenido.
4. Se identifican los tubos de 0.2 ml., correspondientes a cada muestra de ADN a trabajar.
5. A estos se les agrega 0.5 microlitros de ADN dentro de los tubos plásticos de 0.2 ml. de capacidad.
6. Se Agregan 24 microlitros de la solución maestra (Master mix) al tubo de 0.2 ml que contiene la muestra de ADN.

Cuadro 3: Cantidad de reactivos y su concentración para la realización del proceso de PCR para la utilización de primers microsatélites

COMPONENTE	[ ]	CANTIDAD UNITARIA (μl) (C.U.)	NÚMERO DE MUESTRAS DE ADN (n)	CANTIDAD TOTAL (μl) (C.U.)* (n)
H2O		12.8	31	396.8
Solución dNTP	2.5 mM	2.5		77.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5		77.5
Solución Buffer		2.5		77.5
Primer	10 pmol	3.0		93
Taq polimerasa	0.5 U	0.2		6.2
ADN		1.5		
TOTAL DE MEZCLA		25.0		728.5

1. Para que se lleve a cabo el proceso de PCR es necesaria la programación del termociclador de la siguiente manera:

Cuadro 4. Programa de PCR para los Primers (GTG)5 y (GT)7

No.	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Inicialización)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	56 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido
8	Fin	

Cuadro 5. Programa de PCR para los Primers (TCG)5 y (CGA)5

No.	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Inicialización)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	61 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido
8	Fin	

Cuadro 6. Programa de PCR para el Primers (CA)7

No.	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	96 (Inicialización)	5 minutos
2	94 (Desnaturalización)	30 segundos
3	41 (Hibridación)	30 segundos
4	72 (Extensión)	30 segundos
5	Repetición 36 veces a No. 2 a 4	
6	72 (Extensión final)	10 minutos
7	4 (Conservación)	Indefinido
8	Fin	

#### D. Electroforesis

Los materiales empleados para llevar a cabo la técnica de electroforesis en geles de agarosa son los siguientes:

- Muestras de ADN obtenida mediante el proceso de PCR.
- Earlenmayer de 500 ml.
- Peines
- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Agarosa

- Sistema horizontal de electroforesis
- Fuente de poder
- Micropipetas
- Puntas
- Buffer TBE 0.5X (Tris-HCl, EDTA, ácido bórico).
- Búffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, sacarosa en agua 40%).
- Guantes de latex.
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Bromuro de etidio (1 pastilla por cada 5 ml de agua)
- Cámara fotográfica.

La metodología empleada dentro del laboratorio para el proceso de electroforesis en gel es de la siguiente manera:

1. Se pesan 0.75 gramos de agarosa, esto con el fin de tener el 1.5% del volumen total a utilizar para llenar el molde deseado.
2. Se introduce la agarosa pesada a un earlenmayer de 500 ml. de capacidad y se agrega el volumen de la solución TBE 0.5X (50 ml).
3. Se calienta la solución preparada con la ayuda del horno de microondas, hasta que desaparezcan los restos de agarosa.
4. Se espera hasta que el contenido del earlenmayer esté tibio.
5. La bandeja contenedora del gel de agarosa se coloca en dirección perpendicular al sistema horizontal de electroforesis.
6. El sistema horizontal de electroforesis se prepara y nivela con ayuda del nivel de ojo de gallo.
7. Se inserta en el molde de electroforesis los peines que forman los pozos en los cuales son colocados los ADN ya amplificados.
8. Se vierte la solución de agarosa al 1.5% en el molde del sistema horizontal de electroforesis y se espera a que la agarosa vertida se solidifique a temperatura ambiente.
9. Los peines se retiran con mucho cuidado y delicadeza para no romper los pozos.
10. Se cambia de posición la bandeja contenedora del gel de agarosa.
11. El sistema de electroforesis se llena con la solución de TBE 0.5X.
12. Se corta una porción de papel parafilm, retirándole la cubierta protectora y sobre este es colocado 2.5 µl de una solución buffer de carga tipo III con la ayuda de una micropipeta.

13. Se vierte sobre el buffer de carga tipo III, 6  $\mu$ l de ADN proveniente del proceso de PCR.
14. Los pozos son llenados con la mezcla de 2.5  $\mu$ l de la solución buffer de carga tipo III y 6  $\mu$ l de ADN.
15. Se coloca la tapa del sistema horizontal de electroforesis y se conecta a la fuente de poder para seguidamente encenderla y graduarla a 110 voltios.
16. Luego se espera el tiempo de movilización de los fragmentos de ADN a través del gel de agarosa durante 30 minutos aproximadamente.
17. Cuando se haya finalizado el tiempo esperado de la corrida del ADN en el gel de agarosa se apaga la fuente de poder.
18. El gel de agarosa es retirado del sistema de electroforesis y teñido con bromuro de etidio durante aproximadamente 10 minutos, utilizando de forma obligatoria guantes de látex debido a que este reactivo es cancerígeno.
19. Transcurrido los 10 minutos se retira el gel de agarosa del bromuro de etidio y se observa las bandas de ADN en el transiluminador de luz ultravioleta.
20. Posteriormente los resultados son interpretados en el gel de agarosa realizando un cuadro de lectura de las bandas para observar la descripción de la variación.

### **Desarrollo del dendrograma de variación genética**

Para el desarrollo del dendrograma se hace uso de un paquete estadístico conocido por sus siglas en inglés como SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) ya que no es nada más que un programa estadístico informático muy usado en las ciencias sociales y las empresas de investigación de mercado. En la actualidad, la sigla se usa tanto para designar el programa estadístico como la empresa que lo produce. Originalmente SPSS fue creado como el acrónimo de Statistical Package for the Social Sciences ya que se está popularizando la idea de traducir el acrónimo como "Statistical Product and Service Solutions". Fue creado en 1968 por Norman H. Nie, C. Hadlai (Tex) Hull y Dale H. Bent. Entre 1969 y 1975 la Universidad de Chicago por medio de su National Opinión Research Center estuvo a cargo del desarrollo, distribución y venta del programa. A partir de 1975 corresponde a SPSS Inc.

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 8.1. Fase de laboratorio

#### 8.1.1. Aislamiento del patógeno

##### A. Método directo

En el laboratorio las muestras de tejido afectadas fueron divididas en trozos de 7.0 x 3.0 mm aproximadamente y se desinfectaron mediante inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, luego se lavaron durante 1 min con agua destilada estéril y se secaron con papel secante estéril. Los trozos de tejidos fueron sembrados en cajas de Petri con medio selectivo PARPH para propiciar únicamente el desarrollo de este tipo de hongo y no de otro contaminante.

##### B. Método indirecto o trampa

Para aislar a *P. cinnamomi* Rands de suelo se empleó la técnica de la manzana, realizando de 4 a 5 agujeros circulares de un diámetro de 8 mm aproximadamente con un sacabocados en una manzana, los cuales fueron rellenos con 5 a 10 gramos de suelo con el fin de llenar los orificios dentro de la misma, sellando los agujeros con cinta adhesiva para evitar el ingreso de algún otro agente patógeno que pueda dañar la manzana; se dejó alrededor de 5 días a que el oomicete creciera dentro del cultivo trampa y se va visualizando durante el transcurso de los días una zona de avance del patógeno dentro de la manzana, en donde al cabo del quinto día se realizaron cortes en las zonas de avance del patógeno y estos fueron colocados sobre un medio de cultivo selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) para dar inicio al proceso de purificación del patógeno de estudio. Al observar crecimiento fungoso atribuido al patógeno en el respectivo medio de cultivo selectivo se transfirió a PDA (Papa-Dextrosa-Agar) para purificar la colonia respectiva y poder dar inicio al proceso de identificación y caracterización molecular.



Figura 7: Uso de la manzana como medio de cultivo trampa para *Phytophthora cinammomi* Rands



Figura 8: Distribución de las porciones de cultivo trampa en el medio selectivo PARPHB para la purificación de la especie de trabajo.

- Piramicina: Antibiótico de Polyene; activo contra la mayoría de los hongos excepto la familia Pythiaceae del reino de los Oomicetes.
- Ampicillina: Antibiótico; activo contra las bacterias gram-positivas.
- Rifampicina: Antibiótico macrocíclico; predominando activo contra mycobacterias y las bacterias gram-negativas.

- PCNB: Fungicida; pentachloranitrobenzeno; en tierra es activo contra muchos hongos pero no Oomycetes.
- Hymexazol: Fungicida; 3-hidroxy-5-methyl isoxazole; tóxico a muchos pero no a especies de *Pythiumun* y a muchas especies de *Mortierella.*; no tóxico (25-50 mg/Lt) a muchas especies de *Phytophthora.*

La identificación del patógeno se hizo mediante características del cultivo y su respectiva morfología. Para verificar que los aislamientos pertenecían a *P. cinnamomi* Rands se observó que los esporangios fueran ovoides, piriformes con un engrosamiento apical, cónico o redondeado en la base y en el ápice del mismo. Los esporangios y las Clamidosporas observadas se presentaban en abundancia sobre el medio de cultivo PDA. Las hifas del oomicete eran del tipo globoso y con paredes delgadas. Los tamaños de los esporangios se encuentran en una media de 46.1 micras de largo y de 31.3 micras de diámetro, pudiéndolos encontrar en la parte terminal del micelio.

Para la obtención de los esporangios se colocaron 50 gr. de suelo en un earlenmayer de 1000 ml y se dejó reposar por 24 horas. Transcurridas estas 24 horas se procedió a extraer 50 ml de solución de suelo el cual fue diluido en 950 ml de agua destilada para ser autoclaveado por 15 min a 125 °C. posteriormente fueron agregados aproximadamente 30 ml de solución de suelo en una caja petri para introducir las semillas de manzana cubiertas con micelio durante un período de 24 a 36 horas a temperatura ambiente, para observar las respectivas estructuras del hongo y que pudieran así ser debidamente identificadas, observando periódicamente el crecimiento del micelio dentro de la solución de suelo, del cual se realizaban montajes para poder observar los esporangios y poder así las mediciones morfométricas de dichas estructuras reproductivas con el uso del miscroscopio. Ver Fig. 9-12



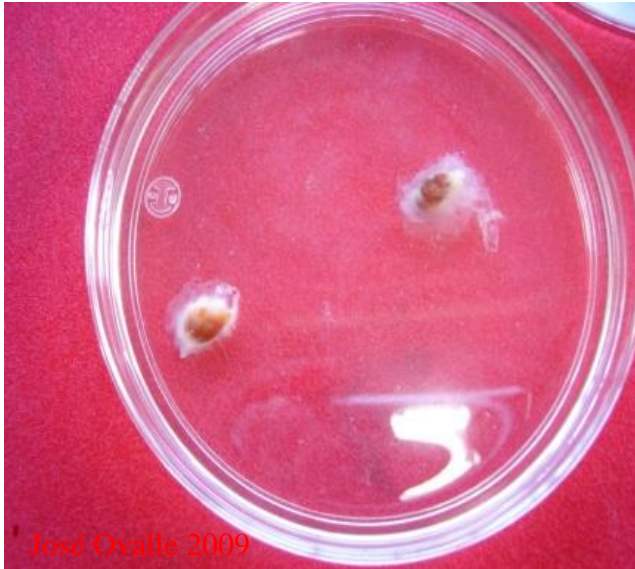


Figura 9: Semillas de manzana con micelio de *Phytophthora cinnamomi* Rands en solución de suelo para la esporulación.

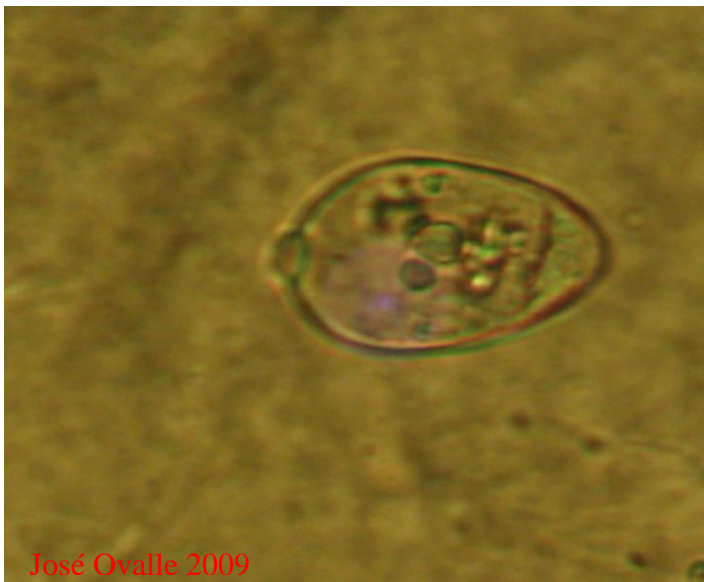


Figura 10: Esporangio de *Phytophthora cinammomi* Rands en medio de solución de suelo.

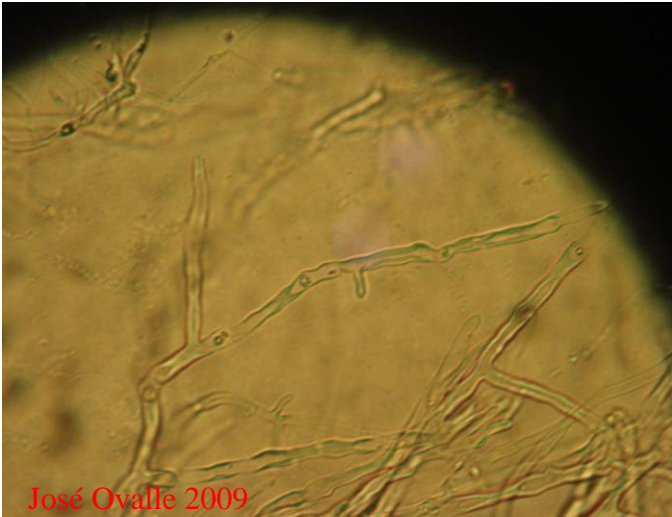


Figura 11: Micelio globoso de *Phytophthora cinammomi* Rands en medio de cultivo de PDA



Figura 12: Esporangio de *Phytophthora cinammomi* Rands en medio de cultivo de solución de suelo



Figura 13: Crecimiento roceteado de *Phytophthora cinammomi* Rands en medio de cultivo PDA.

### C. Prueba de patogenicidad

Para este estudio preliminar se utilizaron plantas de aguacate de la variedad Hass, esto con el fin de poder corroborar si esta planta era afectada por este tipo de Oomiceto; en donde 100 semillas de aguacate Hass se colocaron a germinar en bolsas con peat-moss, de las cuales posteriormente 83 semillas germinaron, seleccionando de todas estas 60 plantas que tuvieran las primeras 2 hojas verdaderas para poder ser inoculadas por dicho patógeno para corroborar si era o no patogénico hacia esta variedad de cultivo, por lo que se hizo uso del medio de cultivo agar Vómito, elaborado de avena, carbonato de calcio, agar y de jugo V8 para poder obtener la esporulación de dicho patógeno; obteniéndose al cabo de 25 a 45 días después de la inoculación plantas afectadas por dicho oomicete causante de la enfermedad tristeza del aguacate, para poder estar realmente seguros de que se trataba de dicho patógeno se realizó nuevamente la siembra en cultivo trampa de las partes afectadas de las raíces y posteriormente su purificación de la cepa en PDA, concluyéndose al final que las cepas afectaban a las plantas de aguacate de variedad Hass, lográndose observar además que las cepas que provenían de Cerro Alto Chimaltenango eran mas agresivas en la afección de las plantas de variedad Hass debido a que estas cepas presentaron síntomas más rápido a las plantas de aguacate después de haber sido inoculadas. Ver Fig. 16 a 19

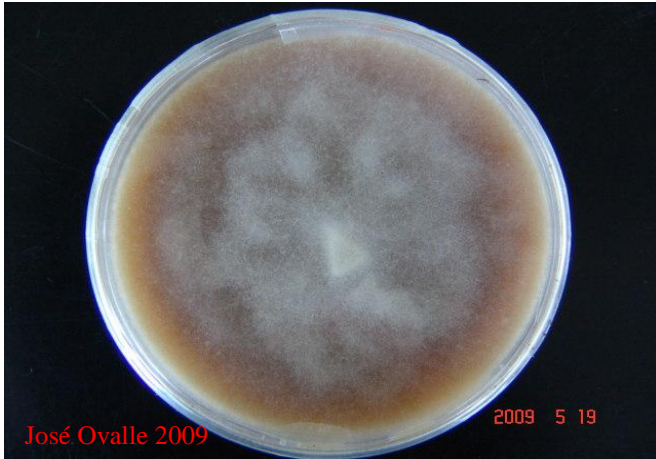


Figura 14: Esporulaci3n de *Phytophthora cinnamomi* Rands en medio de cultivo Agar V3mito listo para ser inoculado en las plantas de aguacate.



Figura 15: Planta de aguacate lista para inocularla con *Phytophthora cinnamomi* Rands con medio de cultivo Agar V3mito.



Figura 16: Planta de aguacate Hass. A) Dañada por *Phytophthora cinnamomi* Rands y B) Planta de aguacate Hass no afectadas por *P. cinnamomi* Rands



Figura 17: Raíces de aguacate dañada por *Phytophthora cinnamomi* Rands

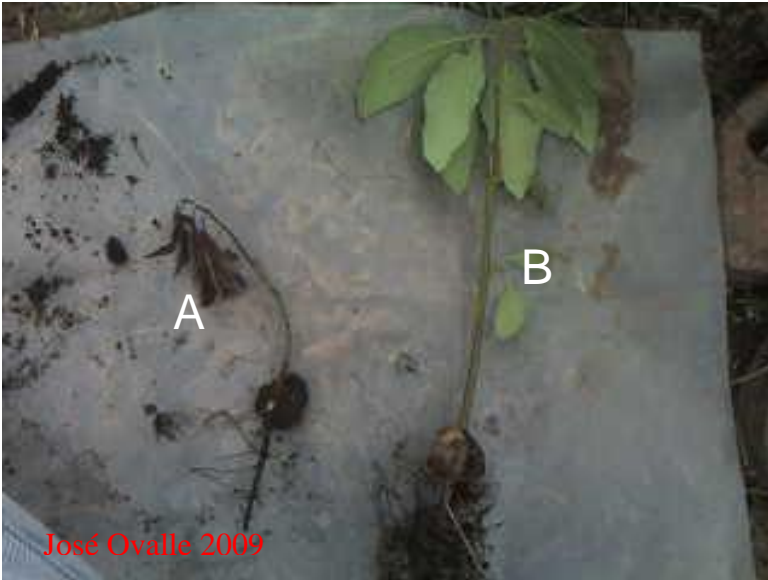


Figura 18: Plantas de Aguacate después de 45 días de la inoculación del patógeno. A) Planta dañada por *P. cinnamomi* Rands; B) Planta de aguacate sana.

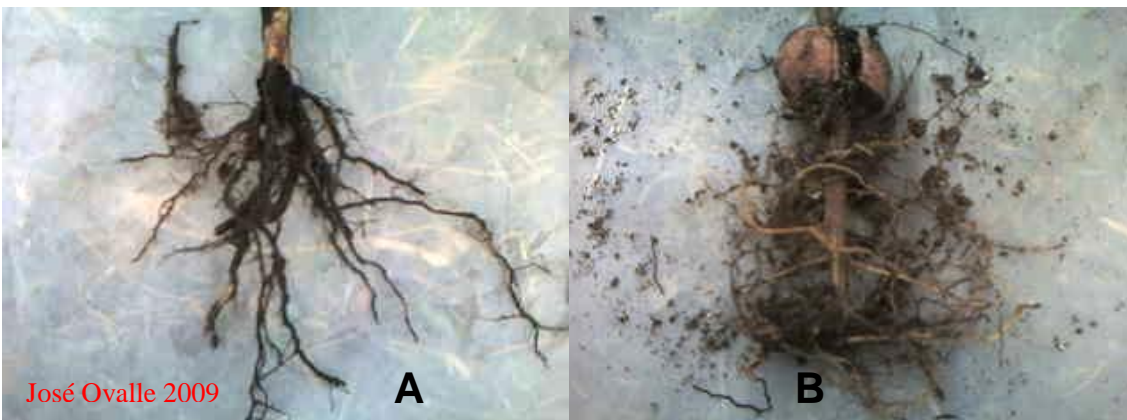


Figura 19: Sistema radicular de Aguacate Hass después de 45 días de la inoculación del patógeno. A) Raíces afectadas por *P. cinnamomi* Rands; B) Raíces normales no afectadas por *P. cinnamomi* Rands

## 8.2. Caracterización Molecular

Para medir la diversidad genética en los 30 aislados de *Phytophthora cinnamomi* Rands provenientes de distintos viveros de aguacate situados en las tierras altas volcánicas de Guatemala se hizo uso de 5 distintos primers los cuales son secuencias cortas de nucleótidos, pudiendo ser estos los utilizados en la técnica de microsatélites: (CA)<sub>7</sub>, (CGA)<sub>5</sub>, (GT)<sub>7</sub>, (GTG)<sub>5</sub>, (TCG)<sub>5</sub>; estos primers fueron utilizados en el proceso de PCR sobre el ADN correspondiente a cada una de las cepas de dicho hongo, dando al final las bandas que abajo pueden observar en las figuras 18-23, pudiendo observar también la gráfica de sedimentación que se encuentra en la figura 24 y el dendrograma generado por el programa SSPS en la figura 25.

En el cuadro 7 se encuentran los datos de pasaporte de los materiales caracterizados. Al inicio del renglón se encuentra el número que se le asignó a cada material para su identificación. La numeración se encuentra correlativa del 1-30.

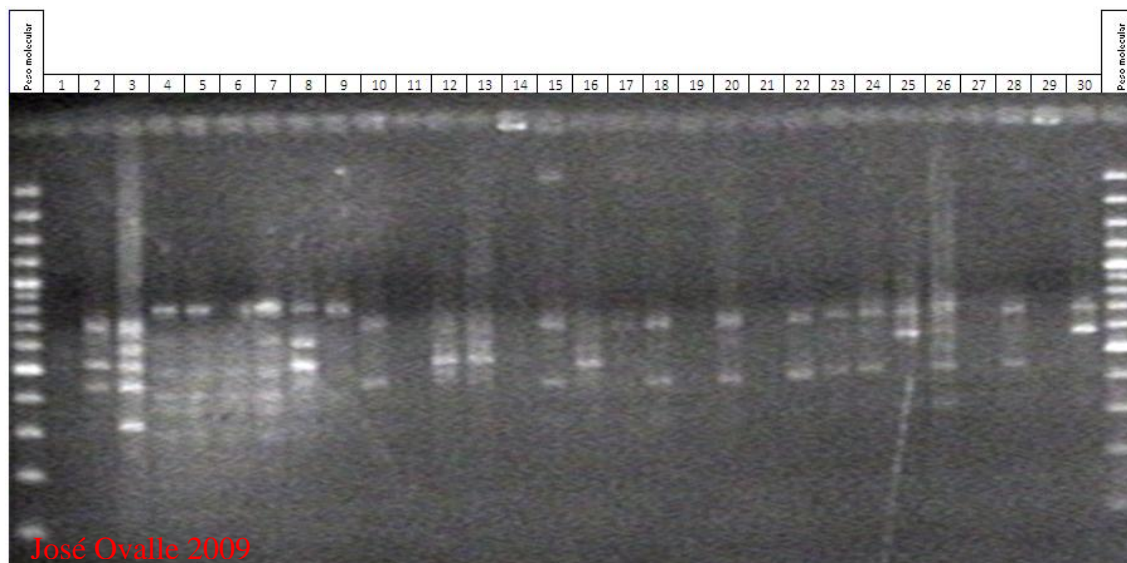


Figura 20: Fotografía de la corrida en gel de agarosa donde muestra las bandas obtenidas en el proceso de PCR utilizando el Primer (CA)<sub>7</sub>.

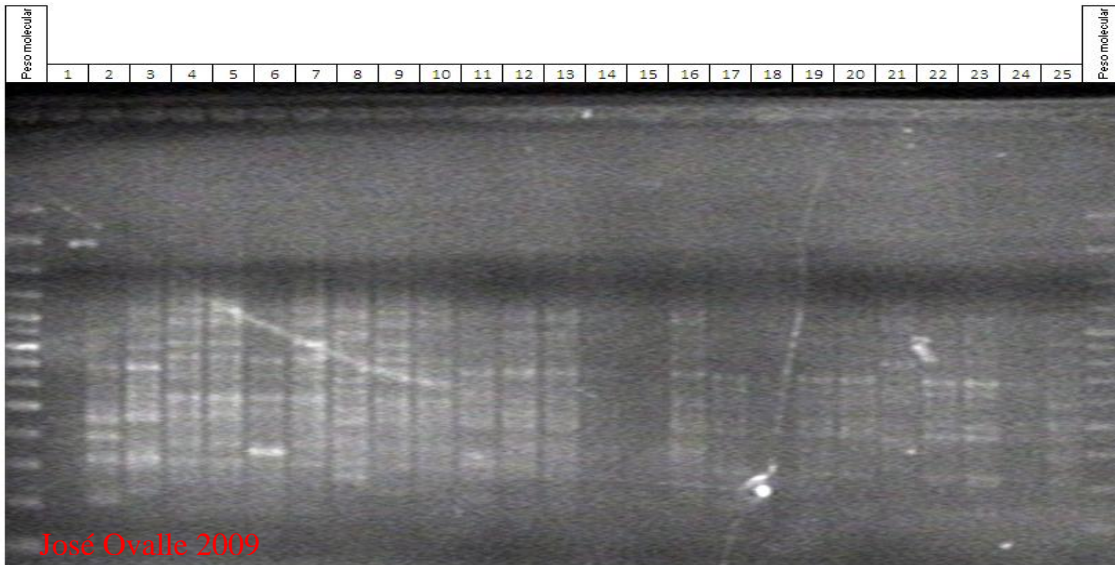


Figura 21: Fotografía de la corrida en gel de agarosa mostrando las bandas obtenidas en el proceso de PCR del ADN molde mediante el uso del Primer (CGA)5.

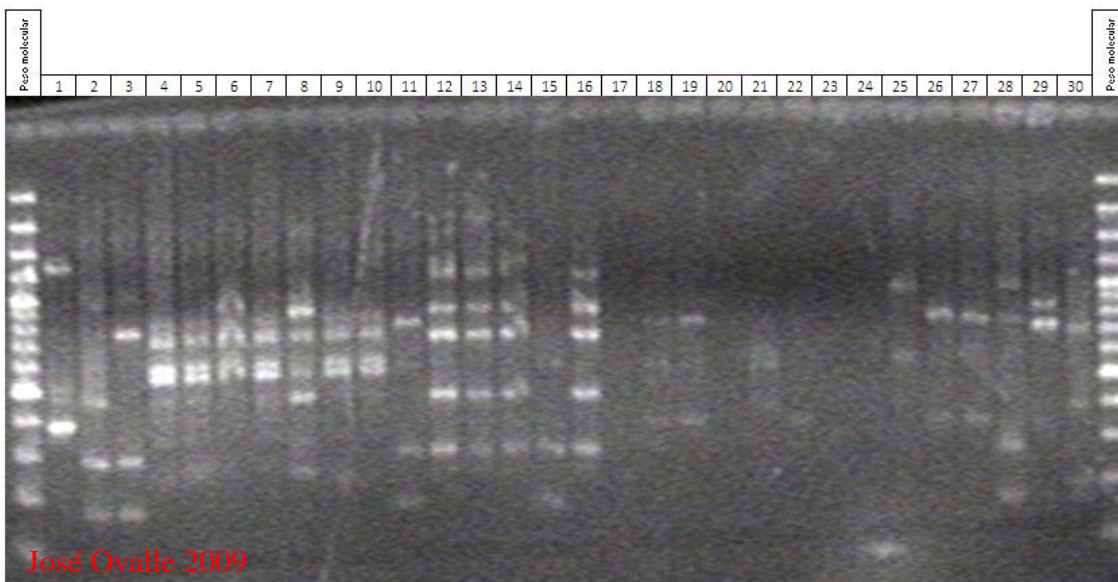


Figura 22: Fotografía mostrando en la corrida del gel de agarosa las bandas obtenidas en el proceso de PCR del ADN molde mediante el Primer (GT)7.



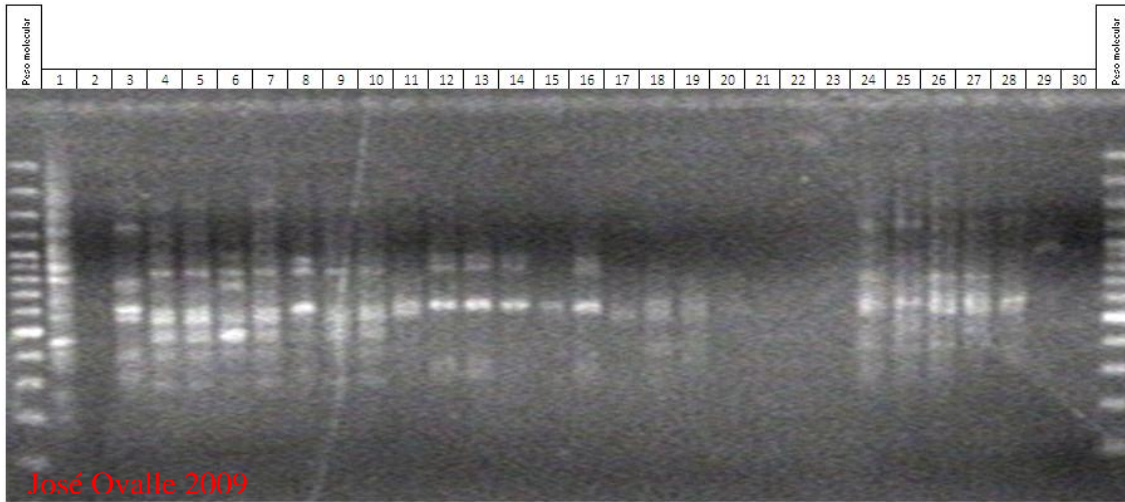


Figura 23: Fotografía de la Corrida en gel de agarosa mostrando las bandas obtenidas del PCR del ADN molde utilizando el Primer (GTG)5.

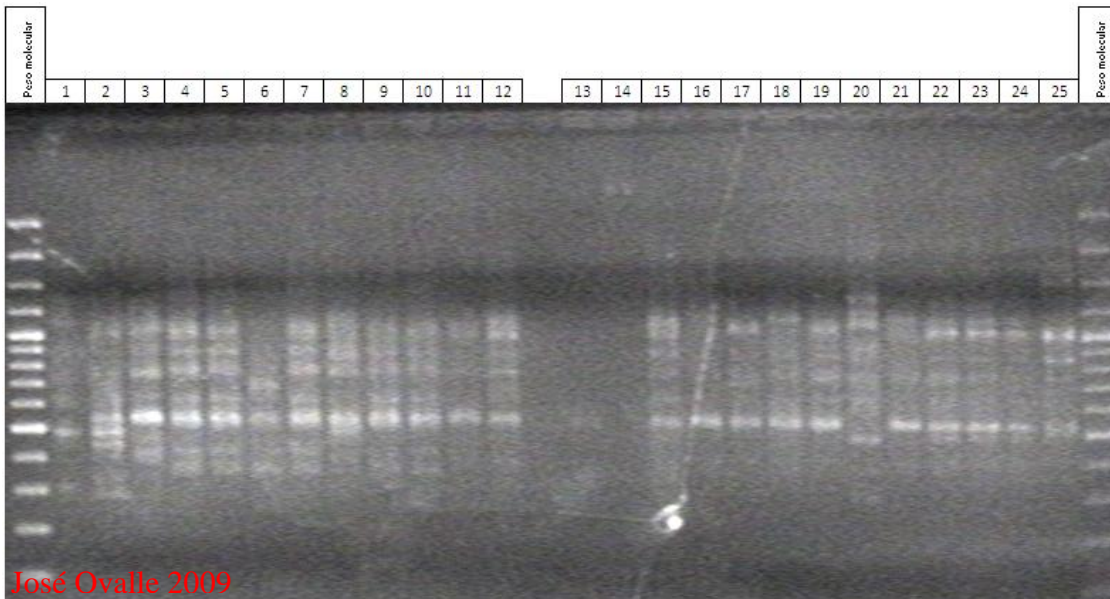


Figura 24: Fotografía de corrida en gel de agarosa donde se observa las bandas obtenidas en el proceso de PCR del ADN molde utilizando el Primer (TCG)5.

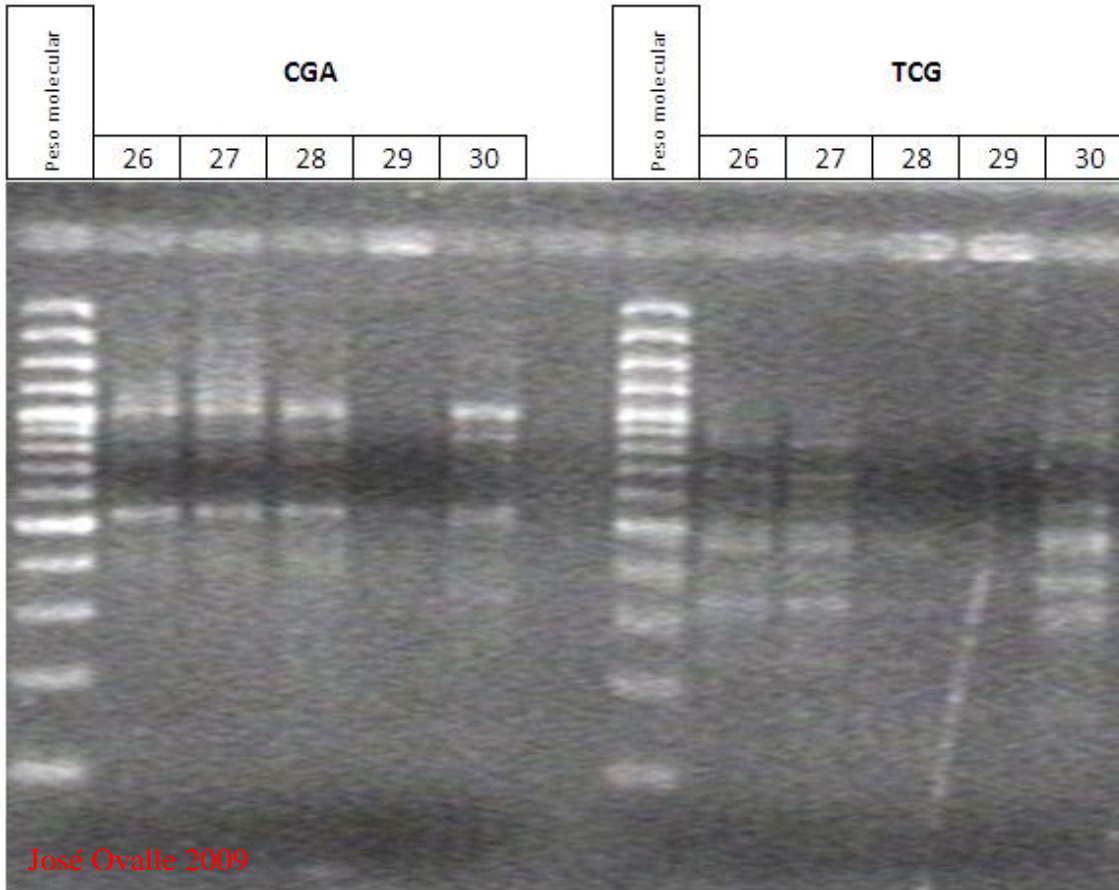


Figura 25: Fotografía donde muestra las bandas obtenidas en la corrida en gel de agarosa mediante el proceso de PCR de ADN molde utilizando el Primer (CGA)5 y (TCG)5.

Con el objeto de obtener bandas de amplificación específica y comparable, el protocolo diseñado, lleva la temperatura correspondiente de desnaturalización de 96°C por un tiempo de 5 minutos, seguido de una segunda temperatura de desnaturalización correspondiente a 94°C por un tiempo de 30 segundos, una temperatura de hibridación de cada primer, siendo la temperatura correspondiente de hibridación de 61°C para los primers (TCG)5 y (CGA)5, una temperatura de hibridación de 56°C utilizando los nucleotidos (GTG)5 y (GT)7 y una temperatura de hibridación de 41°C para el primer (CA)7 cada una con un tiempo de 30 segundos, finalizando el ciclo con una temperatura de extensión correspondiente para todos los primers a 72°C con una duración de 30 segundos; y así se seguían realizando 36 ciclos de PCR iniciando los siguientes ciclos desde los 94°C. En total se obtuvieron 85 bandas de amplificación las cuales serían utilizadas para poder realizar el análisis de dendrograma.

Con el programa SPSS se realizó un análisis de componentes principales por medio del cual se determinó el porcentaje de contribución que cada una de las bandas aporta para explicar la varianza observada. En la

figura 26 se observa el gráfico de sedimentación elaborado por el programa SPSS, en donde en el eje “X” se encuentran numeradas las bandas (85 en total) y en el eje “Y” la varianza acumulada no explicada, se observa que conforme se van agregando bandas, la varianza no explicada disminuye asintóticamente hasta que llega a cero, esto ocurre con la banda número 28. Dado que se obtuvieron 85 bandas (57 mas de las necesarias), se puede afirmar que la caracterización molecular con microsatélites, con 5 primer como iniciadores es suficiente para poder estimar la diversidad genética de los materiales de *Phytophthora cinnamomi* Rands de las Tierras Altas Volcánicas de Guatemala. Se puede confiar en que los modelos elaborados son representativos de la dispersión observada. En el cuadro 8A (anexo) se encuentra la tabla generada por el programa SPSS para indicar con qué porcentaje de la varianza contribuye cada banda. De lo anterior se puede concluir que los marcadores microsatélites son adecuados para la caracterización molecular de materiales de *Phytophthora cinnamomi* Rands porque producen abundantes bandas polimórficas con pocos iniciadores.

**Gráfico de sedimentación**

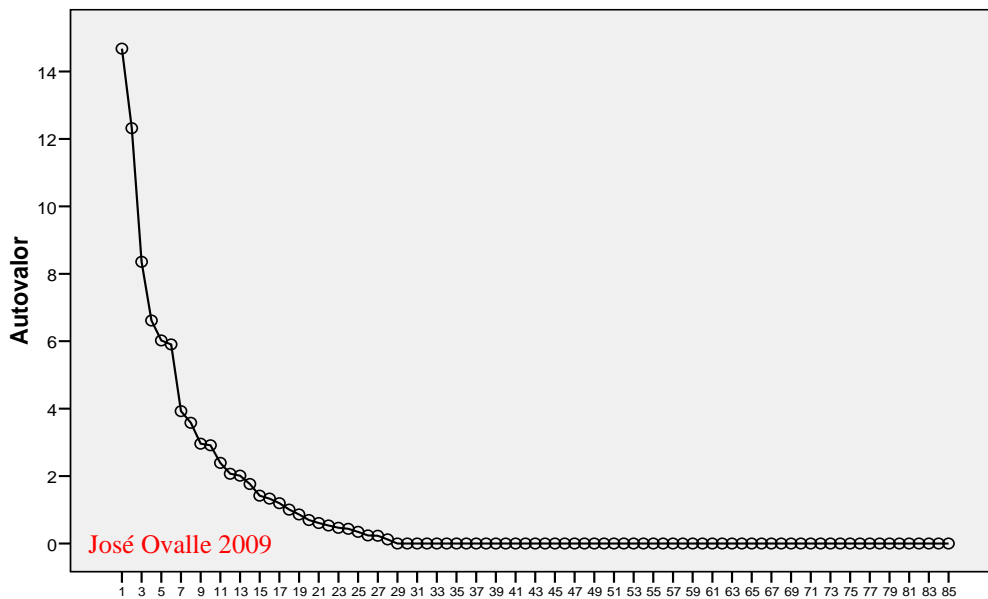


Figura 26: Grafico de Sedimentación.

En donde en el eje “X” se distribuyen las bandas y en el eje “Y” la dispersión acumulada no explicada. En la figura anterior se puede observar que la curva se estabiliza cuando se alcanza una cantidad de 29 bandas que fueron extraídas en el proceso de PCR con los distintos microsatélites empleados.

Cuadro 7: Código de las Cepas de *Phytophthora cinnamomi* Randos y sitio de colecta.

MUESTRA	CÓDIGO	MUNICIPIO	DEPARTAMENTO	COORDENADAS GEOGRAFICAS
1	EFA M4 (c)	San Marcos	San Marcos	14° 55'44.34"N 91° 55'11.91"O
2	Ag Semillero	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
3	Ag V9	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
4	Ag V11	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
5	Ag V12	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
6	Ag V10	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
7	Ag V2	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
8	Ag V4	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
9	Ag V5	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
10	Suelo Árbol	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
11	Ag 2.b	San Vicente Pacaya	Escuintla	14° 24'42.16"N 90° 38'20.91"O
12	Ag 2.a	San Vicente Pacaya	Escuintla	14° 24'42.16"N 90° 38'20.91"O
13	Ag 2.f	San Vicente Pacaya	Escuintla	14° 24'42.16"N 90° 38'20.91"O
14	Ag 1.c	San Vicente Pacaya	Escuintla	14° 24'42.16"N 90° 38'20.91"O
15	Ag 2.e	San Vicente Pacaya	Escuintla	14° 24'42.16"N 90° 38'20.91"O
16	Ag 2.d	San Vicente Pacaya	Escuintla	14° 24'42.16"N 90° 38'20.91"O
17	Llano Grande	Llano Grande	San Marcos	15° 19'59.35"N 91° 43'47.24"O
18	ENCA 1 Ag	Villa Nueva	Guatemala	14° 32'16.18"N 90° 36'45.49"O
19	Ag Sololá 4(b)	Atitlán	Sololá	14° 37'50.93"N 91° 13'55.07"O
20	Ag Sololá 4(a)	Atitlán	Sololá	14° 37'50.93"N 91° 13'55.07"O
21	EFA M4 (d)	San Marcos	San Marcos	14° 55'44.34"N 91° 55'11.91"O
22	Ag V6	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O
23	Sololá 1 (a)	Atitlán	Sololá	14° 37'50.93"N 91° 13'55.07"O
24	Sololá 1 (b)	Atitlán	Sololá	14° 37'50.93"N 91° 13'55.07"O
25	Xena 1 (c)	Santo Domingo Xenacoj	Sacatepéquez	14° 40'53.91"N 90° 42'01.97"O
26	Xena 1 (a)	Santo Domingo Xenacoj	Sacatepéquez	14° 40'53.91"N 90° 42'01.97"O
27	Xena 1 (b)	Santo Domingo Xenacoj	Sacatepéquez	14° 40'53.91"N 90° 42'01.97"O
28	Ag Bárcenas (a)	Villa Nueva	Guatemala	14° 32'16.18"N 90° 36'45.49"O
29	Ag Bárcenas (b)	Villa Nueva	Guatemala	14° 32'16.18"N 90° 36'45.49"O
30	Ag V7	Chimaltenango	Chimaltenango	14° 42'37.5"N 90° 48'31.34"O

### 8.2.1. Análisis de Grupos y Ordenamiento de los materiales

El dendrograma fue elaborado con el programa SPSS calculando la matriz primaria de similitud por medio de un coeficiente de distancia (distancia euclídea) y el método del conglomerado del vecino más próximo.

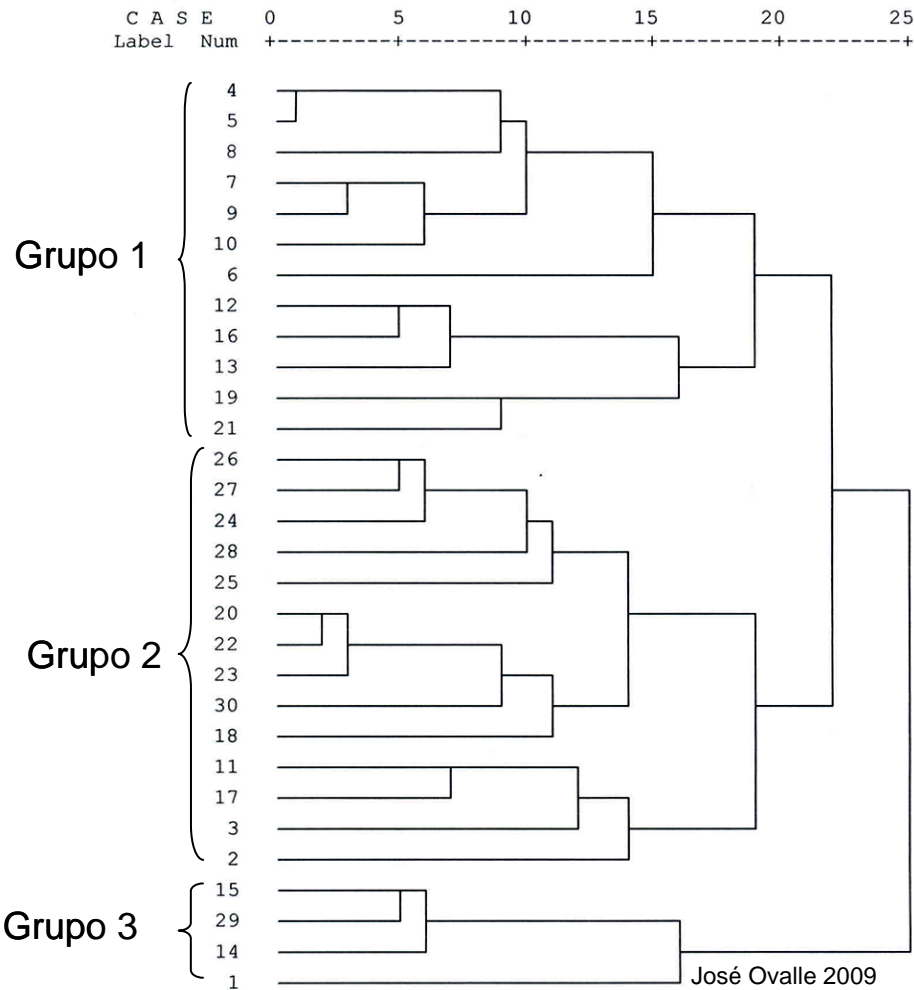


Figura 27: Análisis jerárquico usando el método de conglomerado del vecino más lejano, mediante el sistema Bloque.

En la gráfica anterior se puede observar el dendrograma formado por los resultados del programa SSPS acerca de las bandas desarrolladas por los microsatélites en las pruebas de PCR sobre los 30 aislados de *Phytophthora cinnamomi* Rands recolectados en viveros de aguacate situados en las tierras altas volcánicas de Guatemala.

Como referencia para la discusión de resultados se presenta en el cuadro 7 los sitios en donde fueron colectados los materiales de *Phytophthora cinnamomi* Rands. La ubicación geográfica de las cepas colectadas en las tierras altas volcánicas se cuenta con datos del departamento y municipio de colecta. La

colecta de materiales se focalizó en sitios de la siguiente manera: en San Martín Jilotepeque, Chimaltenango 13 muestras de las cuales 11 materiales fueron positivos; Santo Domingo Xenacoj, Chimaltenango 4 muestras de las cuales 3 fueron positivas; 9 muestras fueron obtenidas en San Vicente Pacaya en donde 6 eran únicamente positivas; 4 muestras fueron obtenidas en Villa Nueva de las cuales 3 eran positivas; en el municipio de San Marcos, San Marcos fueron colectados 6 muestras de las cuales 2 resultaron positivos y 3 en la aldea Llano Grande en el departamento de San Marcos en donde 1 fue positiva; en el municipio de Atitlán, Sololá fueron colectadas 6 muestras de las cuales resultaron positivas 4. Teniendo al final del trabajo un total de 30 cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands para poder realizar la caracterización molecular de dichas. Todos los materiales colectados fueron entre los 14° y 15°15' de latitud norte dentro de la provincia latitudinal que va de los 1000 msnm los 2000 msnm; ecológicamente los materiales colectados se distribuyen en 6 zonas de vida vegetal desde el bosque seco subtropical, Bosque húmedo Subtropical templado, Bosque húmedo montano bajo, Bosque muy húmedo montano y Bosque muy húmedo montano bajo.

El dendrograma muestra una figura escalonada que muestra dos extremos y muchas formas intermedias que cambian en un continuo de grupos y materiales aislados en donde no es posible establecer límites definitivos, por lo que se puede deducir que no existe ningún grupo bien definido y que los materiales de *Phytophthora cinnamomi* Rands se mezclan entre sí.

En el dendrograma puede encontrarse un total de 3 grupos con un 20% de variación entre los individuos de las cepas de *Phytophthora cinnamomi* colectadas en distintos puntos de las tierras altas volcánicas de Guatemala. Por lo que pueden describirse los grupos siguientes:

- El primer grupo se encuentra en un extremo del dendrograma y aglomera a los primeros 12 materiales que se encuentran a menor distancia entre ellos mismos. De estos 12 materiales, 7 cepas son provenientes de la aldea Cerro Alto perteneciente al municipio de Chimaltenango, Chimaltenango, 3 cepas provienen del municipio de San Vicente Pacaya, Escuintla; 1 material proviene de Atitlán, Sololá; y otro material proveniente del municipio de San Marcos, San Marcos.
- El segundo grupo se encuentra conformado por 14 cepas, las cuales 3 provienen del municipio de Santo Domingo Xenacoj, Sacatepéquez; 2 cepas provienen de la aldea Bárcenas Villa Nueva, Guatemala; 3 cepas provienen del municipio de Atitlán, Sololá; 4 cepas fueron colectadas en la aldea Cerro Alto perteneciente al municipio de Chimaltenango, Chimaltenango; 1 cepa proviene del

municipio de San Vicente Pacaya, Escuintla y la otra cepa proviene de la aldea Llano grande del departamento de San Marcos.

- El tercer grupo se encuentra conformado por un total de 4 cepas; donde 1 cepa proviene de la aldea Bárcenas Villa Nueva, Guatemala, 2 cepas provienen del municipio de San Vicente Pacaya, Escuintla; y una última cepa proveniente de la aldea Caxaque perteneciente al municipio de San Marcos, San Marcos.

En las cepas colectadas se pudo observar la variabilidad genética que estas presentan, pudiéndose observar que las cepas en el municipio de Santo Domingo Xenacoj, Sacatepéquez presentan una leve diversidad genética, aunque las cepas se encuentran dentro del mismo grupo en el dendrograma; las cepas de la Aldea Cerro Alto del Municipio de Chimaltenango presentan poca diversidad ante las cepas que pertenecen a la aldea Bárcenas perteneciente al municipio de Villa Nueva, Guatemala; las cepas colectadas en Atitlan, Sololá presentan poca diversidad genética. Si se observa dentro del Dendrograma, las cepas que pertenecen a la aldea Caxaque del municipio de San Marcos, San Marcos estas se encuentran lejanas unas de otras, por lo que dichas cepas de *P. cinnamomi* Rands presentan variación genética ya que se encuentran separadas en dos grupos respectivamente.

Con un 20 % de variación genética entre las cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands puede observarse que se generan 3 grupos de individuos, dando a conocer que no existe gran variación dentro de la especie, pudiendo concluir que la poca variación genética existente puede deberse a que dicho microorganismo se encuentra mutando como así también que puede estarse dando el intercambio genómico por medio de la recombinación sexual dentro de la misma especie.

## 9. CONCLUSIONES

- En la realización de las pruebas de patogenicidad de las cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands colectadas en las Tierras Altas Volcánicas de Guatemala, las 30 cepas colectadas fueron inoculadas sobre las plantas de aguacate variedad Hass, al cabo de 25 días a 45 días después de la inoculación se podía observar a el ataque de dicho patógeno sobre las plantas de aguacate Hass, pudiendo tener en cuenta que las cepas de dicho hongo provenientes de la aldea Cerro Alto en Chimaltenango fueron las que afectaban de una forma más agresiva a las plantas de aguacate, esto pudo observarse debido a que los síntomas podían empezar a observarse transcurridos los primeros 25 días después de la respectiva inoculación del patógeno a las plantas de aguacate.

- En la realización de la caracterización molecular se pudo observar que con un 20 % de variación genética entre las cepas la conformación de 3 grupos respectivos, ubicando en el primer grupo a un total de 12 cepas, en el segundo grupo un total de 14 cepas y en el tercer grupo un total de 4 cepas de *P. cinnamomi* Rands. Por lo que al realizar el dendrograma se pudo observar que con un 20 % de similitud entre cepas no existe gran variación genética entre la misma especie recolectadas en las Tierras Altas Volcánicas de Guatemala.

## 10. RECOMENDACIONES

- Este estudio de caracterización molecular puede ser utilizado con fines de investigación a futuro para el mejoramiento de plantas de Aguacate como fuente de portainjertos para la resistencia de *P. cinnamomi* Rands, mejorando así las estrategias de control y/o manejo de la enfermedad dentro de los viveros como así dentro de las plantaciones de dicho cultivo.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguacate. 2007. Programa de apoyo a los agronegocios, ministerio de agricultura, ganadería y alimentación. 2007. 27 Pág.
2. Alltmann, J., S. Alberts, T. Coote, J. Dubach, E. Geffen y S. A. Haines. 1996. Behaviour predicts genetic structure in a wild primate group. *Proceeding National Academy Sciences (USA)* 93: 791-801.
3. Anacafé. 2004. Cultivo de Aguacate. Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera. 25 p.
4. Blouin, M. S., M. Parson, V. Lacaille y S. Lotz. 1996. Use of microsatellite *loci* to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
5. Boccas, B., y Laville, E. 1976. Les maladies a *Phytophthora* desagrumes. IRFA. Francia. Editions SETCO. 162 p.
6. Bourke, A. F. G., H. A. A. Green y M. W. Bruford. 1997. Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analyzed with microsatellites. *Proceeding Royal Society London* 264: 277-283.
7. Chakraborty, R., T. Meagher y P. E. Smouse. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* 118: 527-536.
8. Ciclo de vida de *Phytophthora*. 2003. (En línea). Consultado el 15 de octubre del 2009. Disponible en:  
<http://www.belizecitrus.org/cga/index.php?option=articles&task=viewarticle&artid=20&topid=2&Itemid=1>
9. Coffey, M.D., and Bower, L.A. 1984. "In vitro" variability among isolates of six *Phytophthora* species in response to Metalaxyl. *Phytopathology* (74): 502-506.
10. Coffey, M.D., Klune, L.J., and Bower, L.A. 1984. Variability in sensitivity to Metalaxyl of isolates of *P. cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology* (74): 417-422.
11. de Vicente, M.C., López, C. and Fulton, T. (eds.). 2004. Genetic Diversity Analysis with Molecular Marker Data: Learning Module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.
12. Eckert, J.W., and Tsao, P.H. 1962. A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plants roots. *Phytopathology* (52): 771- 777.
13. Erwin, D.C., Bartnicki- García, S., and Tsao, P.H., eds. 1983. *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
14. Estoup, A. y B. Anger. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. En: *Advances in Molecular Ecology*. G. R. Carvalho (ed.): 51-86. IOS Press. Amsterdam.

15. Feld, S.J., Menge, J.A., and Pehrson, J.E. 1979. Brow rot of citrus. A review of the diseases. The Magazine of the Citrus Industry Citrograph (64), No 5.
16. Fernández, N.V.J., y Martínez, B.R. 1987. Control químico de *P. cinnamomi* Rands (tristeza del aguacatero) en la región de Tingambato, Michoacan. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología realizado en Morelia, Michoacan, Mexico del 15-17 Julio.
17. Gabor, B.K., and Coffey, M.D. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. Plant Dis (75): 118-129.
18. Gallo, L.L.L. 1984. Resistencia, patogenicidad y control “in vivo” e “in vitro” de *Phytophthora cinnamomi* Rands, parasito del aguacate. III Congreso de Fitopatología. Consejería de Agricultura y Pesca. Gobierno de Canarias. p-96.
19. Gallo, L.L.L. 1990. Search for resistance to *Phytophthora* root rot in West Indian avocado rootstock in the Canary Islands. EPPO Bulletin (20): 95-99.
20. Gallo, L.L.L., Hdez Hdez, J., y Vega, J. S.A. Enfermedades del aguacate presentes en Canarias con especial referencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands (Podredumbre de la raíz). II Congreso de Fitopatología. Departamento de Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. 7-19.
21. Grente, J. 1961. Lá maladie de l' encre du chataignier. Annles Epiphyt (12): 1 – 59.
22. J. 1995. Protocolo para Marcadores
23. Kosman, E. and K. J. Leonard. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. Molecular Ecology 14, 415–424.
24. Litt, M. y J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics* 44: 397-401.
25. Mohammadi, S. A. and B. M. Prasanna. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Sci.* 43:1235–1248.
26. Muestreo no probabilístico. 2009. (En línea). Consultado el 10 de Enero del 2009. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/course/view.php?id=322>.
27. Pegg, K.G., and Forsberg, L.I. 1982. Avocado root rot. *Queensland Agricultural Journal*: 162-168.
28. Posso Duque D., y T. Ghneim Herrera (2006) Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. Manual de laboratorio. Caracas, Venezuela.
29. Queller, D. C., J. E. Strassmann y C. R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Evolution and Ecology* 8: 285-288.
30. Reif J.C., A.E. Melchinger, and M. Frisch. 2005. Genetical and Mathematical Properties of Similarity and Dissimilarity Coefficients Applied in Plant Breeding and Seed Bank Management. *Crop Sci.* 45:1-7.

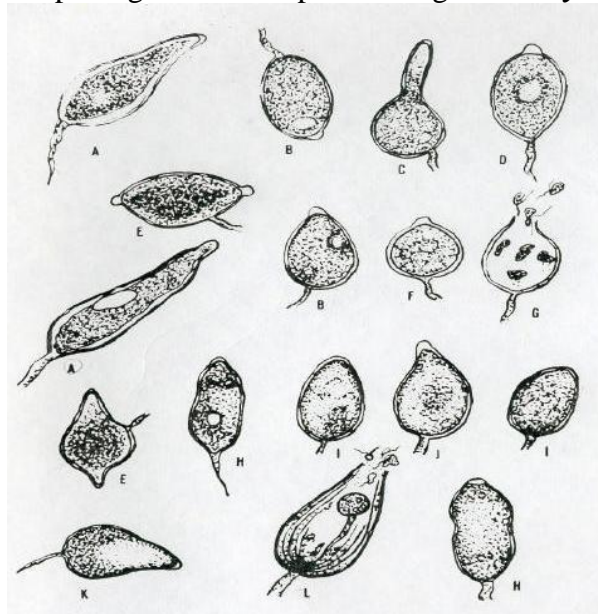
31. Ristaino, J.B., and Gumpertz, M.L. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Ann. Rev. Phytopathol* (38): 541-576.
32. Schnabel, A. 1998. Parentage analysis in plants: mating systems, gene flow and relative fertilities. En: *Advances in Molecular Ecology*. G. R. Carvalho (ed.): 173-189. IOS Press. Amsterdam.
33. Sitko, S.E., Timmer, L.W., and Sandler, H.A. 1991. Isolation of *Phytophthora palmivora* pathogenic to citrus in Florida. *Plant Dis* (75): 532-535.
34. Tautz, D. 1989. Hypervariability of single sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471.
35. Tautz, D. y M. Renz. 1984. Simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
36. Tuset, B.J.J. 1977. Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* de Bary en España. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INICA)*. No 7.
37. Valenzuela, J.G., Teliz, D.O., García, R., y Salazar, S. 1985. Manejo integrado de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) del aguacatero en Atlixco, Pue. *Revista Mexicana de Fitopatología* (3), No 1.
38. Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*. No 92.
39. Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>. (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphism. *Genomics* 7: 524-530. Weber, J. L. y P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal Human Genetics* 44:388-396.
40. WINBOOT : En este link encuentra el programa y el manual:  
<http://www.irri.org/science/software/winboot.asp>
41. Zentmyer, G.A., and Erwin, D.C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora* . *Phytopathology* (60): 1120 – 1127.
42. Zentmyer, G.A., and Mitchell, D.J. 1986. *Phytophthora* diseases of fruit trees in the tropics. *Rev Trop Pl Path* (2): 287 – 309.

## 12. ANEXOS

**Figura 28A:** Típico crecimiento de una colonia de *P. cinnamomi* Rands en PDA.



**Figura 29A:** Diferentes tipos de esporangios de las especies del género *Phytophthora*.



- A. Irregular papilado
- B. Limoniforme
- C. Piriforme
- D. Trasovado
- E. Irregular con dos papilas
- F. Globoso

- G. Descargando las zoosporas
- H. Elíptico
- I. Ovalado sin papilas
- J. Ovalado con papilas
- K. Cuerpo esférico y ápice agudo
- L. Múltiple

**Cuadro 8A:** Temperaturas cardinales de crecimiento de algunas especies del género *Phytophthora*.

Especie	Temp. mínima	Temp. óptima	Temp. máxima
<i>P. parasitica</i>	10 °C	30-32 °C	37 °C
<i>P. citrophthora</i>	5 °C	26-27 °C	32 °C
<i>P. palmivora</i>	11 °C	28-29 °C	35 °C
<i>P. citricola</i>	3 °C	25-28 °C	31 °C
<i>P. syringae</i>	5 °C	20 °C	23 °C
<i>P. hibernalis</i>	5 °C	20 °C	23 °C
<i>P. magasperma</i>	2 °C	25 °C	30 °C
<i>P. cinnamomi</i>	5 °C	24-28 °C	32-34 °C
<i>P. drechsleri</i>	5 °C	28-31 °C	36-37 °C

**Cuadro 9A:** Representación numérica del gráfico de Sedimentación

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	14.678	17.268	17.268	14.678	17.268	17.268
2	12.318	14.492	31.76	12.318	14.492	31.76
3	8.354	9.829	41.588	8.354	9.829	41.588
4	6.614	7.781	49.37			
5	6.023	7.085	56.455			
6	5.905	6.948	63.403			
7	3.927	4.62	68.023			
8	3.58	4.212	72.235			
9	2.961	3.483	75.718			
10	2.913	3.427	79.145			
11	2.39	2.812	81.957			
12	2.07	2.435	84.392			
13	2.012	2.368	86.76			
14	1.765	2.077	88.837			
15	1.418	1.669	90.505			
16	1.332	1.567	92.072			
17	1.196	1.407	93.479			
18	1.006	1.183	94.662			
19	0.861	1.013	95.676			
20	0.696	0.819	96.495			
21	0.608	0.715	97.21			
22	0.533	0.627	97.837			
23	0.466	0.549	98.386			
24	0.436	0.513	98.899			
25	0.345	0.406	99.304			
26	0.24	0.282	99.586			
27	0.23	0.271	99.857			

28	0.121	0.143	100
29	0	0	100
30	7.90E-16	9.30E-16	100
31	7.49E-16	8.81E-16	100
32	7.15E-16	8.41E-16	100
33	6.40E-16	7.53E-16	100
34	5.88E-16	6.92E-16	100
35	5.67E-16	6.67E-16	100
36	5.53E-16	6.50E-16	100
37	5.32E-16	6.26E-16	100
38	4.52E-16	5.32E-16	100
39	4.21E-16	4.95E-16	100
40	3.76E-16	4.42E-16	100
41	3.56E-16	4.19E-16	100
42	2.81E-16	3.31E-16	100
43	2.59E-16	3.05E-16	100
44	2.13E-16	2.50E-16	100
45	2.08E-16	2.45E-16	100
46	1.67E-16	1.96E-16	100
47	1.33E-16	1.57E-16	100
48	1.11E-16	1.31E-16	100
49	9.87E-17	1.16E-16	100
50	7.31E-17	8.60E-17	100
51	6.00E-17	7.06E-17	100
52	1.69E-17	1.99E-17	100
53	7.27E-18	8.56E-18	100
54	3.63E-18	4.27E-18	100
55	8.93E-33	1.05E-32	100
56	7.55E-33	8.88E-33	100
57	2.01E-33	2.37E-33	100
58	-1.29E-18	-1.52E-18	100
59	-4.76E-18	-5.60E-18	100
60	-2.05E-17	-2.41E-17	100
61	-3.13E-17	-3.68E-17	100
62	-3.93E-17	-4.62E-17	100
63	-6.08E-17	-7.16E-17	100
64	-8.37E-17	-9.85E-17	100
65	-9.04E-17	-1.06E-16	100
66	-1.57E-16	-1.85E-16	100
67	-1.62E-16	-1.90E-16	100
68	-1.79E-16	-2.11E-16	100
69	-2.18E-16	-2.56E-16	100
70	-2.36E-16	-2.78E-16	100
71	-2.46E-16	-2.89E-16	100

72	-2.89E-16	-3.40E-16	100		
73	-3.57E-16	-4.20E-16	100		
74	-3.86E-16	-4.54E-16	100		
75	-4.11E-16	-4.83E-16	100		
76	-4.83E-16	-5.68E-16	100		
77	-4.88E-16	-5.74E-16	100		
78	-5.54E-16	-6.52E-16	100		
79	-6.26E-16	-7.37E-16	100		
80	-6.42E-16	-7.55E-16	100		
81	-7.09E-16	-8.34E-16	100		
82	-7.21E-16	-8.48E-16	100		
83	-7.51E-16	-8.84E-16	100		
84	-9.86E-16	-1.16E-15	100		
85	-3.97E-15	-4.67E-15	100		

**Varianza total explicada**

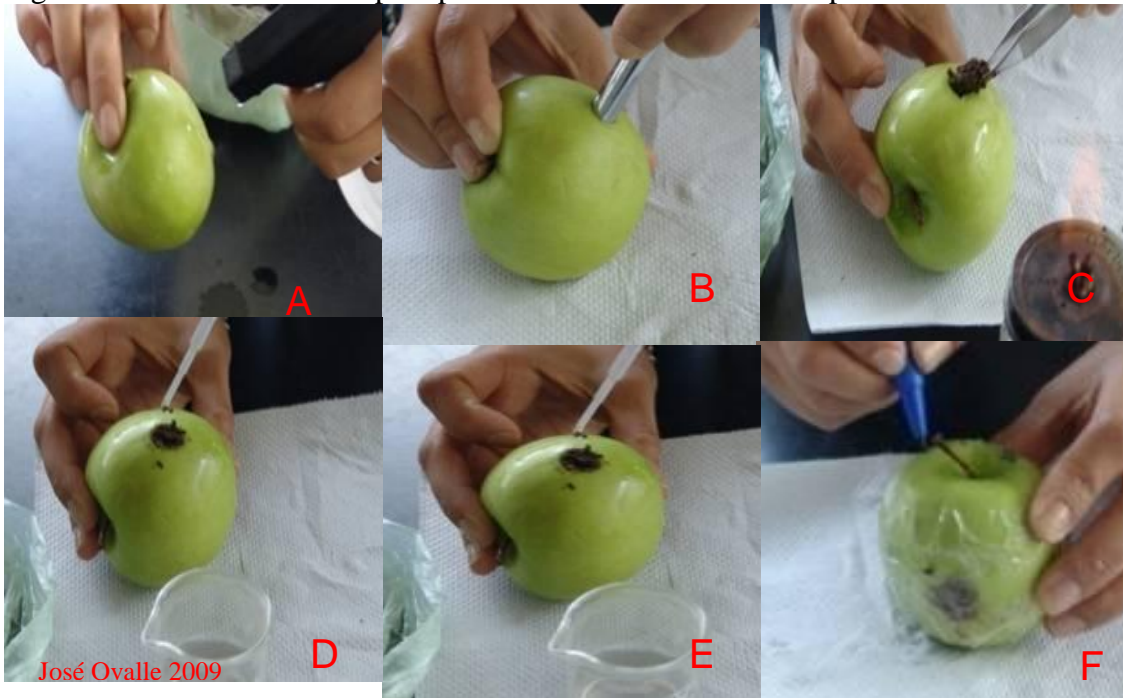
Fuente: Elaboración del autor 2009.

Figura 30A: Manzanas verdes utilizadas como cultivos trampa para la obtención de *Phytophthora*.



José Ovalle 2009

Figura 31A: Pasos a realizar para poder realizar un cultivo Trampa



A) Desinfección de la manzana; B) Perforación de la manzana; C) Inoculación de la manzana con suelo infestado de *P. cinnamomi* Rands; D y E) Saturación del suelo dentro de la manzana; F) Identificación de la manzana.

Figura 32A: Medios de Cultivos de Agar Vómito listos para realizar la prueba de patogenicidad





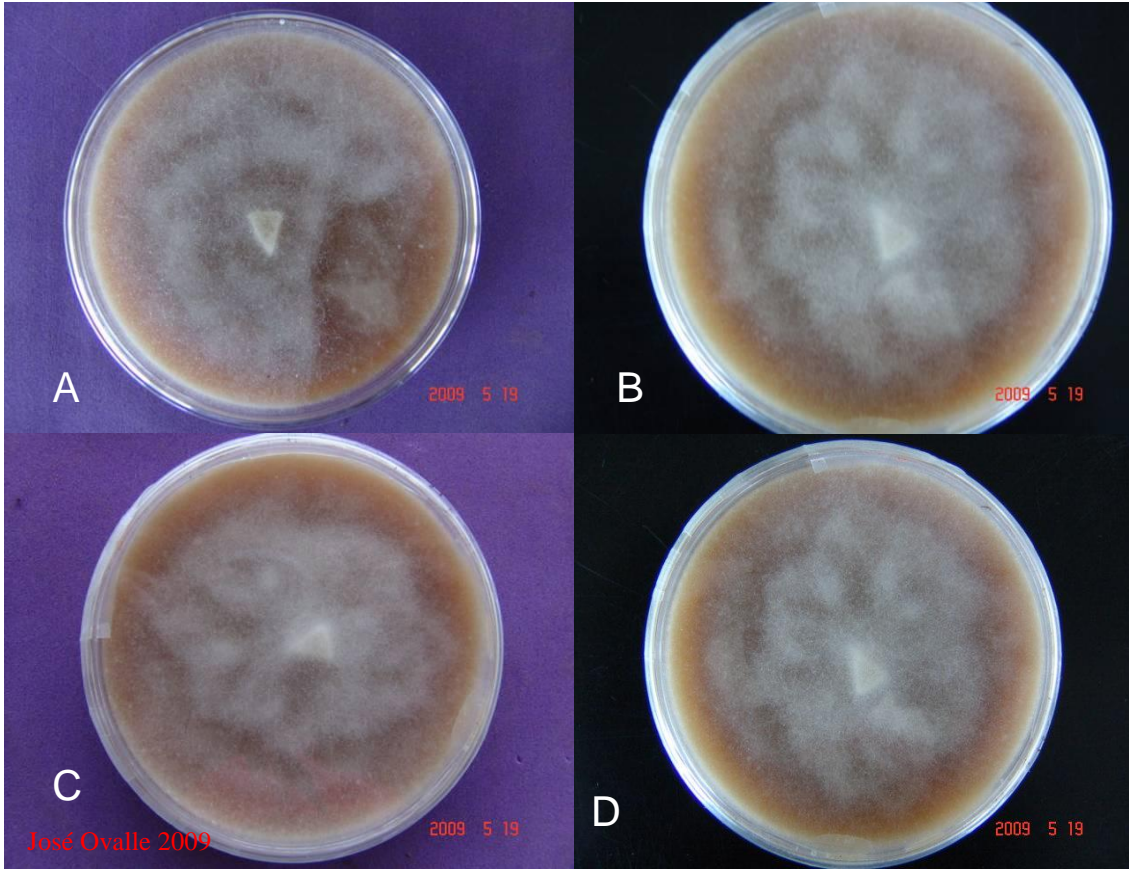


Figura 33A: Cepas de *P. cinnamomi* Rands esporuladas en agar vómito. A) Cepa de Cerro alto Chimaltenango; B y D) Cepa de San Vicente Pacaya, Escuintla; C) Cepa de Bárcenas, Villa Nueva.