



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Caracterización de microorganismos asociados a
la pudrición de raíces de *Persea
americana* Mill en viveros del Valle del Cauca,
Colombia**

Lizeth Paola Palacios Joya

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2021

Caracterización de microorganismos asociados a la pudrición de raíces de *Aguacate Persea americana* Mill en viveros del Valle del Cauca, Colombia

Lizeth Paola Palacios Joya

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencia Agrarias

Directores:

Ms.C. Mauricio Fernando Martínez

Codirector:

Ph.D. Eyder Daniel Gómez

Línea de Investigación:

Protección de cultivos

Grupo de Investigación:

AGROSAVIA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2021

Dedicado a mis padres y hermana, por su apoyo incondicional y por ser el más grande ejemplo de disciplina y perseverancia.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) por financiar y apoyar la Investigación enmarcada en el proyecto “Estrategias de prevención y manejo de enfermedades limitantes en la producción de Aguacate en las principales zonas productoras”. A mi director de tesis el Ingeniero agrónomo y Msc. Mauricio Fernando Martínez, y la doctora Nubia Murcia por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, apoyar la ejecución de este proyecto y dirigir la redacción de este documento.

A la Universidad Nacional de Colombia y en especial a mi codirector de tesis el doctor Eyder Daniel Gómez, por la orientación y el apoyo brindados a mi proyecto de tesis de maestría.

Al grupo de trabajo del laboratorio de fitopatología y biología molecular de Agrosavia del Centro de investigación Palmira. A la investigadora Máster Diana Rodríguez Mora y al ingeniero agrónomo Kevin Rodríguez Arevalo, por el acompañamiento, la paciencia y los conocimientos brindados para el desarrollo de los análisis filogenéticos. Al ingeniero Yeison López y la asistente de investigación Juliana Moncada por su tiempo y por estar siempre dispuestos a colaborar.

A mis compañeros y amigos la Sra. Luz Marina Acosta Torres, Luz Natalia Martínez, Diego Morales, Camilo Rincón y Hover Beltrán por su apoyo incondicional y por su buen humor.

Por último, pero no menos importante a toda mi familia, en especial a mis padres y hermana por apoyarme y compartir mis alegrías y frustraciones. Finalmente, extendiendo mi agradecimiento a todas las personas que hubiesen participado y apoyado mi proceso y que tal vez por descuido olvide mencionar.

Resumen

Caracterización de microorganismos asociados a la pudrición de raíces de Aguacate *Persea americana* Mill en viveros del Valle del Cauca, Colombia.

Colombia es el tercer país con mayor área cosechada de aguacate, participando con el 6% del área mundial y una producción de 596.814 toneladas. Esta participación en el mercado internacional se debe principalmente al crecimiento en el área cultivada con aguacate Hass, del cual se han establecido más de 20.000 hectáreas en los últimos cinco años. Pese a este crecimiento, la cadena productora se ve afectada por la baja disponibilidad de material de siembra con calidad genética, fisiológica y fitosanitaria requeridos para las condiciones de producción del país. Donde una de las principales limitantes fitosanitarias es la pudrición de raíces, las cuales contribuyen a una pérdida comercial significativa durante la fase de establecimiento de huertos productivos. El propósito de este trabajo fue caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente hongos Nectriaceos asociados a la pudrición de raíces del aguacate en viveros del Valle del Cauca. Se realizaron visitas a 16 viveros de aguacate, colectando muestras de suelos y raíces de 89 plantas con síntomas de marchitez, clorosis y necrosis. Se obtuvieron 83 aislamientos y una frecuencia de aparición de hongos de la familia Nectriaceae del 61%, siendo *Cylindrocladiella* el de mayor frecuencia (24%), seguido de *Fusarium* (17%), *Gliocladiopsis* (10%), *Calonectria* (4%), *Campylocarpon* (4%) e *Ilyonectria* (2%). Oomicetos como *Phytophthora* mostraron una frecuencia del 12%. La identificación de los aislamientos se realizó mediante claves taxonómicas y amplificación de la región ITS obteniendo porcentajes de identidad y cobertura entre el 99-100%, logrando la identificación de especies de importancia como *Phytophthora cinnamomi*, *P. heveae*, *Calonectria* sp., *Cylindrocladiella peruviana*, *Ilyonectria destructans*, *Pleiocarpon algariense*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. keratoplasticum* y *Campylocarpon pseudofasciculare*. El estudio permitió identificar y caracterizar patógenos causantes de

marchitez del aguacate presentes en viveros del Valle del Cauca, lo cual es un importante precedente para el estatus fitosanitario del cultivo en el país.

Palabras clave: aguacate, pudrición negra de raíz, Nectriaceae, caracterización, hongos fitopatógenos.

Abstract

Characterization of microorganisms associated with root rot of Avocado *Persea americana* Mill in nurseries in Valle del Cauca, Colombia.

Colombia is the third country with the largest area harvested for avocado, participating with 6% of the world area and a production of 596,814 tons. This participation in the international market is mainly due to the growth in the area cultivated with Hass avocado, of which more than 20,000 hectares have been established in the last five years. Despite this growth, the production chain is affected by the low availability of planting material with genetic, physiological, and phytosanitary quality required for the country's production conditions. Where one of the main phytosanitary limitations is root rot, which contributes to a significant commercial loss during the establishment phase of productive orchards. The purpose of this work was to characterize morphologically, molecularly, and pathogenically Nectriaceous fungi associated with avocado root rot in Valle del Cauca nurseries. Visits were made to 16 avocado nurseries, collecting soil and root samples from 89 plants with symptoms of wilting, chlorosis, and necrosis. 83 isolates were obtained and a frequency of appearance of fungi of the Nectriaceae family of 61%, being *Cylindrocladiella* the most frequent (24%), followed by *Fusarium* (17%), *Gliocladiopsis* (10%), *Calonectria* (4%), *Campylocarpon* (4%) and *Ilyonectria* (2%). Oomycetes like *Phytophthora* showed a frequency of 12%. The identification of the isolates was carried out using taxonomic keys and amplification of the ITS region, obtaining identity and coverage percentages between 99-100%, achieving the identification of important species such as *Phytophthora cinnamomi*, *P. heveae*, *Calonectria* sp., *Cylindrocladiella peruviana*, *Ilyonectria destructans*, *Pleiocarpon algariense*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. keratoplasticum* and *Campylocarpon pseudofasciculare*. The study allowed to identify and characterize

pathogens that cause avocado wilt present in nurseries of Valle del Cauca, which is an important precedent for the phytosanitary status of the crop in the country.

Keywords: avocado, black root rot, Nectriaceae, characterization, phytopathogenic fungi.

Contenido

Pág.

Resumen	VII
Abstract.....	IX
Lista de Figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVIII
Introducción	1
Objetivos.....	3
1. Capítulo 1: Marco Teórico y Revisión de Literatura.....	5
1.1 El cultivo de aguacate	5
1.1.1 Centro de origen del aguacate.....	5
1.1.2 Taxonomía del aguacate	6
1.1.3 Principales razas de aguacate.....	6
1.1.4 Caracterización morfológica del aguacate	7
1.1.5 Importancia económica del aguacate.....	9
1.1.6 Limitantes del cultivo de aguacate en etapa de vivero	10
1.2 Generalidades de los hongos Nectriaceos	10
1.2.1 Nectriaceos asociados al cultivo de aguacate.....	11
1.3 <i>Calonectria (Cylindrocladium)</i>	13
1.3.1 Taxonomía de <i>Calonectria</i>	15
1.3.2 Características morfofisiológicas de <i>Calonectria</i>	15
1.3.3 Ciclo de enfermedad de <i>Calonectria</i>	16
1.4 <i>Ilyonectria (Cylindrocarpon, Neonectria)</i>	18
1.4.1 Taxonomía de <i>Ilyonectria</i>	19
1.4.2 Características morfofisiológicas de <i>Ilyonectria</i>	20
1.4.3 Ciclo de enfermedad de <i>Ilyonectria</i>	21
1.5 <i>Cylindrocladiella</i>	22
1.5.1 Taxonomía de <i>Cylindrocladiella</i>	23
1.5.2 Características morfofisiológicas de <i>Cylindrocladiella</i>	23
1.6 <i>Gliocladiopsis</i>	24
1.6.1 Taxonomía de <i>Gliocladiopsis</i>	25
1.6.2 Características morfofisiológicas de <i>Gliocladiopsis</i>	25
1.7 <i>Fusarium</i>	26
1.7.1 Taxonomía de <i>Fusarium</i>	27

1.7.2	Características morfofisiológicas de <i>Fusarium</i>	27
1.7.3	Ciclo de vida de <i>Fusarium</i>	28
1.8	Síntomas ocasionados por Nectriaceos patógenicos en plantas de aguacate ..	28
1.9	Identificación molecular de hongos Nectriaceos	29
2.	Capítulo 2: Frecuencia de hongos Nectriaceos causantes de la pudrición de la raíz y prácticas de manejo utilizadas, en viveros de aguacate del Valle del Cauca.	31
2.1	Resumen	31
2.2	Materiales y métodos.....	32
2.2.1	Muestreo y localización	32
2.2.2	Obtención de aislamientos.....	33
2.2.3	Obtención de cultivos monóspóricos	34
2.2.4	Identificación morfológica de los aislados.....	34
2.2.5	Análisis estadístico.....	35
2.3	Resultados y discusión	35
2.3.1	Muestreo y obtención de aislamientos.....	35
2.3.2	Identificación morfológica de los aislados.....	38
2.3.3	Frecuencia de microorganismos aislados de plantas con pudrición de raíces en viveros del Valle del Cauca, Colombia.	48
2.3.4	Métodos de desinfección y componentes del sustrato utilizados con mayor frecuencia, para la producción de plántulas de aguacate, en viveros del Valle del Cauca.	50
3.	Capítulo 3: Caracterización morfológica y molecular de hongos Nectriaceos asociados a la pudrición radical en plántulas de aguacate de viveros del Valle del Cauca.	59
3.1	Resumen	59
3.2	Materiales y métodos.....	60
3.2.1	Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados en tres medios de cultivo diferentes.....	60
3.2.2	Caracterización morfológica de los aislados.....	61
3.2.3	Identificación molecular de cepas.....	62
3.2.4	Extracción de ADN	62
3.2.5	Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	62
3.2.6	Secuenciación y análisis filogenético.....	63
3.2.7	Análisis estadístico.....	64
3.3	Resultados y Discusión.....	64
3.3.1	Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados en dos medios de cultivo diferentes.....	64
3.3.2	Caracterización morfológica	69
3.3.3	Extracción y amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de hongos Nectriaceos	74
3.3.4	Secuenciación y análisis filogenético de hongos Nectriaceos.....	75
3.3.5	Extracción y amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Oomycetos.....	81
3.3.6	Análisis filogenético de Oomycetos	81
4.	Capítulo 4: Variabilidad patogénica de cepas aisladas de plantas con síntomas de pudrición de raíces	85
4.1	Resumen	85

4.2	Materiales y Métodos	86
4.2.1	Preselección de aislamientos para pruebas de patogenicidad	86
4.2.2	Multiplicación de plantas para pruebas de infección en tallos	87
4.2.3	Pruebas de patogenicidad en tallos de plantas de aguacate.....	88
4.2.4	Pruebas de patogenicidad en semillas de aguacate Hass	89
4.2.5	Análisis estadístico	90
4.3	Resultados y discusión.....	90
4.3.1	Preselección de aislamientos para pruebas de patogenicidad	90
4.3.2	Pruebas de patogenicidad en tallos de plantas de aguacate.....	95
4.3.3	Pruebas de patogenicidad en semillas de aguacate Hass	100
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	105
5.1	Conclusiones.....	105
5.2	Recomendaciones.....	106
A.	Anexo: Medios selectivos usados en la investigación.....	107
B.	Anexo: Tasa de crecimiento de aislados de <i>Phytophthora</i>.....	109
C.	Anexo: Características morfológicas de los géneros de hongos Nectriaceos aislados.....	110
D.	Anexo: Número de GenBank de secuencias parciales del espaciador transcrito interno ITS, usadas para el análisis filogenético de Nectriaceos.	114
E.	Anexo: Número de GenBank de secuencias parciales del espaciador transcrito interno ITS, usadas para el análisis filogenético de <i>Phytophthora</i>.	116
F.	Anexo: Condiciones ambientales de las pruebas de patogenicidad realizadas en casa de malla negra antiáfido.....	117
6.	Referencias bibliográficas.....	119

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1-1: Árbol concenso de la familia Nectriaceae ¹	12
Figura 1-2: Ciclo de enfermedad de <i>C. scoparium</i> en viveros de Eucalipto.....	18
Figura 2-1: Viveros de aguacate del departamento del Valle del Cauca muestreados. ..	32
Figura 2-2: Síntomas observados en plantas de viveros de aguacate del Valle del Cauca..	35
Figura 2-3: Síntoma de marchitez en aguacate Antillano procedente del departamento del Valle del Cauca.....	36
Figura 2-4: Síntoma de marchitez en aguacate Hass procedente del departamento del Valle del Cauca.....	36
Figura 2-5: Sintomatología más frecuente observada en viveros de aguacate del Valle del Cauca.	38
Figura 2-6: Morfología de microorganismos aislados en viveros del Valle del Cauca, creciendo en medio de cultivo PDA.....	40
Figura 2-7: Estructuras de <i>Cylindrocladiella</i> sp.(40x).....	41
Figura 2-8: Estructuras de <i>Gliocladiopsis</i> sp.(40x).	42
Figura 2-9: Estructuras de <i>Calonectria</i> sp. (40x).	42
Figura 2-10: Estructuras de <i>Ilyonectria</i> sp. (40x).	43
Figura 2-11: Estructuras de <i>Fusarium</i> sp. (40x)..	44
Figura 2-12: Macroconidios de <i>Campylocarpon</i> sp. (40x).....	44
Figura 2-13: Conidios cilíndricas de <i>Colletotrichum</i> sp (40x).	45
Figura 2-14: Estructuras de <i>Pestalotiopsis</i> sp. (40x).....	45
Figura 2-15: Estructuras de <i>Lasiodiplodia</i> sp. (40x).....	46
Figura 2-16: Conidióforo y conidios de <i>Trichoderma</i> sp. (10x).....	46
Figura 2-17: Conidióforo de <i>Paecilomyces</i> sp. con microconidios ovales en cadena (10x).	47
Figura 2-18: Estructuras de <i>Phytophthora</i> sp. (40x).	47
Figura 2-19: Frecuencia de microorganismos aislados de plantas con síntomas de marchitez en viveros del Valle del Cauca.....	48
Figura 2-20: Métodos de desinfección del sustrato utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.....	50
Figura 2-21: Métodos de desinfección de yemas, utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.....	52

Figura 2-22: Métodos de desinfección de semillas, utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.	53
Figura 2-23: Componentes del sustrato utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.....	54
Figura 2-24: Dendograma de viveros del Valle del Cauca, agrupados de acuerdo con sus principales características.	56
Figura 3-1: Evolución temporal del diámetro de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas en medio GA y SNAY.....	67
Figura 3-2: Evolución temporal del diámetro de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas en medio PDA.	67
Figura 3-3: Dendograma obtenido por el método de Ward para las características morfológicas de hongos aislados de plantas de aguacate con síntomas de marchitez en viveros del Valle del Cauca.	72
Figura 3-4: Electroforesis en gel de agarosa al 1,4% de productos de PCR de 9 aislados de raíces de plantas de aguacate, amplificados con los cebadores ITS1 e ITS4.....	74
Figura 3-5: Diversidad genética de 55 hongos Nectriaceos aislados de plantas de aguacate, inferidos de ITS. Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando Kimura dos parámetros con distribución gamma como modelo de sustitución de bases.	77
Figura 3-6: Diversidad genética de ocho Oomycetos aislados de plantas de aguacate, inferidos de la región ITS. Árbol filogenético de máxima verosimilitud, utilizando el modelo evolutivo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con distribución gamma en todos los sitios.	83
Figura 4-1: Proceso de inoculación de hongos Nectriaceos en frutos de aguacate Hass.	87
Figura 4-2: Necrosis en mesocarpio y exocarpio de frutos de aguacate inoculados con cepas aisladas de viveros..	90
Figura 4-3: Crecimiento de micelio sobre el exocarpio de aguacate Hass inoculado con cepas de viveros.	91
Figura 4-4: Diagrama de cajas de lesión necróticas observadas en plantas de aguacate Hass inoculadas en tallo con 20 cepas.....	96
Figura 4-5: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass de 3 meses de edad, inoculadas con <i>Phytophthora cinnamomi</i> en tallo.	97
Figura 4-6: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, inoculadas con <i>Phytophthora heveae</i> en tallo.	98
Figura 4-7: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, inoculadas con <i>Calonectria</i> sp. en tallo.	99
Figura 4-8: Porcentaje de inhibición de la germinación en semillas de aguacate Hass inoculadas con cepas aisladas de viveros del Valle del Cauca.....	101
Figura 4-9: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass inoculadas con <i>P. cinnamomi</i>	102
Figura 4-10: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass inoculadas con <i>Calonectria</i> sp..	103

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Taxonomía del aguacate <i>Persea americana</i> Mill.	6
Tabla 1-2: Principales características de las diferentes razas de aguacate <i>P. americana</i> Mill.	7
Tabla 1-3: Área, producción y rendimiento total de aguacate en Colombia entre 2014-2019.....	9
Tabla 1-4: Clasificación taxonómica de <i>Calonectria</i>	15
Tabla 1-5: Clasificación taxonómica de <i>Ilyonectria</i>	20
Tabla 1-6: Clasificación taxonómica de <i>Cylindrocladiella</i>	23
Tabla 1-7: Clasificación taxonómica de <i>Gliocladiopsis</i>	25
Tabla 1-8: Clasificación taxonómica de <i>Fusarium</i>	27
Tabla 2-1: Código y localización de los viveros muestreados.	33
Tabla 2-2: Valores de inercia y contribuciones parciales a inercia para los puntos de columna ²	55
Tabla 3-1: Análisis de varianza de la tasa de crecimiento de 50 aislados evaluados.....	65
Tabla 3-2: Prueba de Scheffé y agrupamiento de medios usando la variable tasa de crecimiento.	65
Tabla 3-3: Modelo de regresión seleccionado para la evaluación del crecimiento de Nectriaceos en dos medios de cultivo diferentes.....	66
Tabla 3-4: Tasa de crecimiento de microorganismos evaluados en dos medios de cultivo diferentes.	68
Tabla 3-5: Historial de clúster con coeficientes de conglomerados combinados.....	70
Tabla 3-6: Porcentaje de cobertura e identidad de 55 hongos aislados y comparados con secuencias de la base de datos del GenBank (BLAST), inferidos de la región ITS.	80
Tabla 3-7: Porcentaje de cobertura e identidad de ocho asilamientos de <i>Phytophthora</i> comparadas con secuencias de la base de datos del GenBank (BLAST).	83
Tabla 4-1: Análisis de varianza de pruebas de infección con 64 cepas, en frutos de aguacate Hass.	92
Tabla 4-2: Agrupamiento de Tukey (0,05) para 64 cepas evaluadas con base en el diámetro promedio de las lesión necrótica ocasionada en frutos de aguacate Hass 9 ddi.	93
Tabla 4-3: Análisis de varianza de las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas de aguacate Hass a 20 cepas aisladas de viveros del Valle del Cauca.	95

Tabla 4-4: Agrupamiento de Tukey de acuerdo con el área promedio de lesión obtenida en plantas de aguacate Hass inoculadas en tallo con 20 cepas.	97
---	----

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ANOVA	Análisis de Varianza
BI	Inferencia Bayesiana
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
bp	Pares de bases
BS	Bootstrap
Ca.	<i>Calonectria</i>
Cyl.	<i>Cylindrocladiella</i>
CLA	Agar hoja de clavel
cv.	Cultivar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ddi	Días después de inoculación
Ddt	Días después de trasplante
h or hr	Hora o horas
<i>his3</i> o <i>HIS3</i>	Histona H3
ITS	Espaciador transcrito interno
LSU	Subunidad larga
Min	Minuto o minutos
ML	Máxima verosimilitud
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
rRNA or nrRNA	nuclear ribosomal RNA
<i>tef1</i>	Factor de elongación transcricional 1- α
<i>tub2</i> o <i>TUB2</i>	β -tubulina

Introducción

El aguacate es una de las frutas de mayor antigüedad del continente americano. Se distribuye naturalmente desde México hasta Perú, pasando por Centro América, Colombia, Venezuela y Ecuador (Téliz, 2000). Este frutal tropical pertenece a la familia de las lauráceas y posee un gran potencial para la exportación (Ramírez & Morales, 2013); donde la variedad de aguacate Hass cuenta con mayor aceptación debido a la alta calidad de su pulpa, mayor productividad y una madurez tardía. (Newett, Crane, & Balerdi, 2007).

Según los lineamientos del Plan frutícola Nacional, el aguacate es el segundo frutal de mayor importancia económica en Colombia, tanto en área cultivada como en producción e ingresos al agricultor. El cultivo está presente en los departamentos de Tolima, Antioquia, Caldas, Santander, Bolívar, Cesar, Valle del Cauca, y Quindío los cuales representan el 86% del área total sembrada en el país (Minagricultura, 2019). A nivel mundial, Colombia ocupa el cuarto lugar como productor de aguacate y el tercer lugar en área sembrada, participando con 596.814 toneladas y con 84.587 hectáreas plantadas respectivamente, de las cuales 20.182 ha corresponden a aguacate Hass (Minagricultura, 2019).

La apuesta del sector aguacatero en Colombia es posicionar el aguacate del país, como un competidor importante en el mercado internacional mediante el establecimiento de 200.000 ha que son demandadas por mercados importadores como Estados Unidos, la Unión Europea, Emiratos Árabes, Bahrein, Singapur y Corea del Sur (Procolombia, 2019). No obstante, el incremento desmedido de las áreas para siembra de aguacate de exportación puede afectar el cumplimiento de los requisitos fitosanitarios exigidos por los mercados exportadores. Lo cual conlleva a una serie de desafíos tecnológicos respecto al manejo sanitario de las plantaciones para garantizar la sostenibilidad del cultivo. (Ramírez & Morales, 2013).

Actualmente, el rendimiento y la productividad del cultivo son afectados por la baja disponibilidad de material de propagación con calidad genética, fisiológica y fitosanitaria (Ramírez, 2018). Por otra parte, los viveros ofrecen condiciones como, espaciamiento reducido, riego regular, alta humedad y uso indiscriminado de fertilizantes, lo cual favorece el desarrollo de epidemias causadas por agentes bióticos y/o abióticos (Alfenas, Edival, Valverde, Gonçalves, & Assis, 2009). Adicionalmente, la cadena productiva presenta limitantes de tipo técnico como el desconocimiento de métodos de desinfección para semillas, semilleros, sustratos, y yemas; desconocimiento de las frecuencias de riego y manejo de enfermedades más importantes, lo cual conduce a la producción de plantas de baja calidad que representan un alto riesgo para el sector aguacatero, ya que pueden ser la vía de diseminación de problemas fitosanitarios (Duque, 2011; Ramírez, 2013).

Una de las mayores limitantes fitosanitarias en la producción y rendimiento del cultivo lo constituyen las enfermedades asociadas a la marchitez de la planta por pudrición de raíces, cuyos principales agentes causales han sido identificados como: *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora heveae* Tompson, *Phytophthora citricola* Sawada, *Verticillium* sp., *Armillaria mellea* Kumm, *Fusarium solani* Sacc, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. Senu Gordon, *Rhizoctonia* sp., *Cylindrocladiella* sp., *Pythium* sp., *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten y *Cylindrocladium* sp. este último organismo es el más frecuente y severo en viveros de aguacate de los departamentos de Risaralda y Valle del Cauca (Buriticá, 1999; Ramírez, 2018; Ramírez & Morales, 2013; Saltarén, Varón, & Marmolejo, 1999; Tamayo, 2007). Investigaciones realizadas en Antioquia Colombia, sobre la marchitez del cultivo de aguacate en viveros, mostraron una incidencia y mortalidad promedio entre 28 y 60%, respectivamente. Las pérdidas económicas causadas por la enfermedad estuvieron entre 325-356 USD por vivero por ciclo de producción (Ramírez, Gilchrist, & Morales, 2017).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente especies de hongos Nectriaceos causantes de la pudrición de raíces de aguacate *Persea americana* Mill en viveros del Valle del Cauca, contribuyendo de esta manera a la generación de un registro de las especies presentes en el país, dato de importancia para diseñar estrategias de manejo de patógenos reportados hace algunos años en el cultivo y cuya sintomatología es similar a la ocasionada por *Phytophthora cinnamomi*.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente hongos Nectriaceos causantes de la pudrición de raíces de aguacate *Persea americana* Mill en viveros del Valle del Cauca, Colombia.

Objetivos específicos

Determinar la frecuencia de hongos Nectriaceos causantes de la pudrición de la raíz de plantas de aguacate en viveros del Valle del Cauca.

Identificar morfológica y molecularmente, géneros y especies de hongos Nectriaceos asociados a la pudrición radical en plantas de aguacate en viveros del Valle del Cauca.

Estudiar la variabilidad morfológica y patogénica de los hongos Nectriaceos aislados e identificados.

1.Capítulo 1: Marco Teórico y Revisión de Literatura

1.1 El cultivo de aguacate

El aguacate es el segundo frutal tropical con mayor volumen de exportación a nivel mundial (FAO, 2020). Actualmente, el cultivo de aguacate se siembra desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm (Mejía, 2015) y se produce en los cinco continentes. Sin embargo, los países con mayores hectáreas sembradas y mayor producción se ubican en el continente americano. Los países destacados por mayor área para siembra del cultivo son México, República Dominicana, Perú, Indonesia y Colombia. Siendo México el mayor productor de este fruto con 2.184.663 Toneladas (T), seguido de Republica Dominicana con una producción de 644.306 T, Perú con 504.517 toneladas y Colombia ocupa el cuarto lugar en producción con 326.666 T (FAOSTAT, 2018).

1.1.1 Centro de origen del aguacate

El origen del aguacate tuvo lugar en Mesoamérica, zona que comprende las partes altas del Centro y Oriente de México y Guatemala, además es el área donde se considera que se dio la domesticación de este frutal (Williams, 1977).

Investigaciones arqueológicas realizadas en México, señalan que el uso y la selección del aguacate comenzó hace unos 10.000 años. La prueba más antigua del consumo de este frutal fue localizada en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México, entre los años 8.000-7.000 a.C. (C. E. Smith, 1966); lugar donde se encontraron semillas de aguacate de un tamaño mayor a las encontradas en excavaciones previas, lo cual demuestra que, durante ese tiempo se produjo una selección progresiva en busca de un mayor crecimiento del fruto, entre otras cualidades.

El aguacate fue domesticado por los Aztecas y posteriormente se dispersó desde México hasta el Perú en el periodo precolombino (Téliz, 2000), fue llevado a España en 1600 y rápidamente comenzó su distribución a nivel mundial (Barrientos & López, 2002; C. E. Smith, 1966).

1.1.2 Taxonomía del aguacate

El aguacate pertenece a la familia de las Lauráceas y al género *Persea* (Tabla 1-1). Género formado por 150 especies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. Los árboles de este género se caracterizan por presentar hojas coriáceas y aromáticas; inflorescencias axilares o subterminales, dispuestas en panículas racimosas; flores pediceladas o sésiles, hermafroditas, con ovario globoso y subgloboso, estilo delgado, estigma triangular; frutos en bayas globosas o elípticas (Vargas, 2002).

Tabla 1-1: Taxonomía del aguacate *Persea americana* Mill.

Reino:	Vegetal
División:	Spermatophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledoneae
Subclase:	Dialypetalae
Orden:	Ranales
Familia:	Lauraceae
Género:	<i>Persea</i>
Especie:	<i>Persea americana</i> Mill

Fuente: Tomado de Cipriano *et al.*, (2014)

1.1.3 Principales razas de aguacate

Del subgénero *Persea* al cual pertenece el aguacate (Scora, Wolstenholme, & Lavi, 2007) se reconocen tres especies: *Persea schiedeana* Nees, *Persea parvifolia* Williams y *Persea americana* Mill., y esta última a su vez está constituida por varios taxones separados, que pueden ser descritos como razas “hortícolas”. Dentro de este grupo están las variedades de aguacate que se comercializan actualmente, *P. americana* var. *americana* Mill., que corresponde al

aguacate Antillano o de tierras bajas (Scora & Bergh, 1992), *P. americana* var. *drymifolia* (Schlect y Cham) Blake, que corresponde al aguacate mexicano o de tierras altas y *P. americana* var. *guatemalensis* Williams, perteneciente a los aguacates guatemaltecos (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Principales características de las diferentes razas de aguacate *P. americana* Mill

Raza	Altura	Temperatura	Altitud	Peso	Contenido de grasa	% azúcar	Variedad
Antillana	Menor a 1000 msnm	Entre 18°C y 26°C	Entre 75 mm y 250 mm	Entre 250g y 2500g	Entre 5% y 15%	5%	Lorena, Peterson, Wilson, Catalina, Criollo
Guatemalteca	Entre 1000 y 2000 msnm	Entre 4°C y 19°C	Entre 75 mm y 250 mm	Entre 120g y 1500g	Entre 5% y 15%	5%	Choquete, Hass, Simpsom, Guatemala, Linda, Reed, Itzama, Fujikawa, Hall
Mexicana	De más de 1700 msnm	Hasta 22°C	Entre 30 mm y 80 mm	Entre 80g y 250g	Hasta el 30%	2%	Azteca, Fuerte, Nabal, Ettinger, Bacon, Duke, Wurtz

Fuente: Tomado de (Barrientos & López, 2002; Yabrudy, 2012).

El aguacate tienen un genoma de aproximadamente 907 Mbp y se considera una especie alógama, debido a la producción de dos grupos de floración complementarios, lo cual aumenta la probabilidad de que ocurra polinización cruzada con facilidad generando híbridos, algunos con ventajas de adaptación climática u otras características agronómicas (Degani *et al.*, 2003; Scora & Bergh, 1992). Un ejemplo de esto son las variedades: Fuerte, Ettinger, Collin v-33, Booth 8, Choquette, Collison, Hall y Santana (Yabrudy, 2012).

1.1.4 Caracterización morfológica del aguacate

En condiciones naturales un árbol adulto de aguacate puede llegar a superar los 10 m de altura, y 25 m de diámetro en la copa. En cultivos establecidos por los agricultores para fines comerciales, los árboles son podados para mantener alturas entre los 7-8 m de altura, que facilitan las labores de cosecha y manejo fitosanitario (Diaz *et al.*, 2014).

El sistema radical del aguacate es superficial (Bergh, 1992), pivotante, ramificado y de distribución radial. Las raicillas son insuberizadas y se localizan en los primeros 60 cm del suelo, aunque la raíz principal puede superar 1,0 m de profundidad y carece de pelos radicales (Whiley, Saranah, Cull, & Pegg, 1988).

El tallo es un tronco cilíndrico, erecto, leñoso, ramificado, con una corteza áspera y a veces surcada longitudinalmente. La copa, es de ramas extendidas, de forma globosa yacampanada (IPGRI, 1995). Las hojas del aguacate son pecioladas, alternas; y dependiendo de la especie la forma de la hoja puede variar, se han observado formas como ovada, obovadaangosta, obovada, oval, redondeada, cordiforme, lanceolada, oblonga y oblongo-lanceolada. El margen puede ser entero u ondulado; la base puede ser aguda, obtusa y truncada; y la forma del ápice puede ser muy agudo, agudo intermedio, obtuso y muy obtuso (IPGRI, 1995).

Las inflorescencias son multiramificadas y se forman a partir de brotes terminales o subterminales (Scora *et al.*, 2007). Las flores del aguacate son pequeñas, miden entre 3-7 mm de longitud y aproximadamente 10 mm de diámetro, poseen órganos sexuales masculinos, (estambres) y femeninos (pistilos); son trímeras, agrupadas en una panícula, pubescentes y con pedicelos cortos (Diaz *et al.*, 2014).

El cáliz tiene tres sépalos y una corola tripetala, con 12 estambres, nueve funcionales y tres estaminoides; tienen un pistilo con un solo carpelo y el ovario con un solo ovulo. Es una especie que muestra dicogamia y protoginia, es decir, que las flores abren dos veces, actuando primero como flores femeninas y posteriormente, como masculinas (Gazit & Degani, 2007).

La fructificación puede presentar frutos solitarios o en racimo (IPGRI, 1995). El fruto contiene una sola semilla y su forma varia, según la raza, así: oblata, esferoide, esferoide alto, elipsoide, obovado-angosto, obovado, piriforme, claviforme, romboidal. El color de la cascara cuando este está maduro puede ser verde, verde claro, verde oscuro, amarillo, rojo, purpura, negro y la mezcla de los anteriores. El color de la pulpa puede ser amarillo, amarillo claro, amarillo intenso, verde claro, verde y otros. La cascara del fruto del aguacate puede ser muy delgada, intermedia o muy gruesa y su textura lisa, ligeramente papilada, papilada, muy papilada, ligeramente ahuecada, ahuecada, muy ahuecada, lustrosa, opaca, estriada, lobulada, rugosa, surcada o abollada. El peso de un fruto puede variar entre los 100 a los 3.000 gramos (IPGRI, 1995).

En los frutos jóvenes, los estomas son prominentes. En los frutos viejos, se pueden degenerar debido a la formación de lenticelas, produciendo manchas blancas o grises sobre la superficie de la cascara (Scora *et al.*, 2007).

1.1.5 Importancia económica del aguacate

El aguacate es el segundo frutal de mayor importancia económica en Colombia, tanto en área cultivada, como en ingresos al agricultor. En los últimos años el cultivo viene experimentando un acelerado incremento de las áreas de siembra, pasando de 49.056 ha a 85.714 ha entre 2014 y 2019 respectivamente (DANE, 2019), como se observa en la Tabla 1-3. El incremento acelerado de las áreas de siembra en Colombia se dio para aumentar la competitividad del país como exportador de aguacate Hass, esto ha incentivado el desarrollo del sector aguacatero, involucrando asociatividad y cultura exportadora en una cadena productiva que busca posicionar el aguacate del país en mercados internacionales (Minagricultura, 2019).

Tabla 1-3: Área, producción y rendimiento total de aguacate en Colombia entre 2014-2019

Variable	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Área (Ha)	49.056	52.782	59.705	68.661	73.986	85.714
Producción (Ton)	288.739	309.852	343.295	375.906	403.184	596.814
Rendimiento (Ton/Ha)	9	8	9	9	10	12

Fuente: EVA, 2018; DANE, 2019

El incremento de las áreas para siembra del cultivo se ha enfocado principalmente en el cultivar Hass. Este cultivar presenta una alta demanda en mercados internacionales como Estados Unidos, Francia, Alemania y España, debido principalmente a sus cualidades nutricionales, de sabor, usos industriales, farmacéuticos y cosméticos. Los principales destinos de exportación en los que Colombia tiene admisibilidad sanitaria de la producción de aguacate son, Arabia Saudita, Barhein, Corea del Sur, Estados Unidos, Japón, Países bajos-Holanda, España, Francia y Reino Unido (Corpohass, 2020).

Actualmente, el cultivo de aguacate Hass corresponde al 23% del total del área sembrada con aguacate en el país, esto equivale a 20.182 ha con una producción de 148.429 ton (Minagricultura, 2019). La exportación de aguacate cv. Hass ha aumentado significativamente pasando de 1.760 ton en 2014 a 38.581 ton en 2019 (Corpohass, 2020). El rendimiento en toneladas por hectárea del cultivo (12 ton/ha) aún se encuentra por debajo de los rendimientos mundiales debido, a que las nuevas áreas sembradas aún no se encuentran en producción y también, a causa de los problemas fitosanitarios presentes en el cultivo.

1.1.6 Limitantes del cultivo de aguacate en etapa de vivero

Una de las principales limitantes del cultivo está asociada a la marchitez de plantas de aguacate, enfermedad que afecta directamente las raíces, el sistema vascular y el tallo de las plantas. La marchitez ha sido constantemente asociada a *Phytophthora cinnamomi*, razón por la cual siempre se ha enfocado el control de la enfermedad en la aplicación de productos que afecten la fisiología y reproducción de este patógeno en específico (Hernández, 2016; Ramírez, Castañeda, & Morales, 2014). Por otra parte, durante los últimos años algunos autores han reportado otros patógenos causantes de esta sintomatología. Entre los que se encuentran un grupo de hongos llamados Nectriaceos, cuyas especies más conocidas son *Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* (Aiello, Gusella, Vitale, Guarnaccia, & Polizzi, 2020; Dann *et al.*, 2011; Parkinson, 2017; A. Vitale *et al.*, 2012). Surgiendo así la importancia de conocer la diversidad y la patogenicidad relativa de los hongos nectriaceos para realizar diagnósticos y estrategias de manejo precisos para la enfermedad.

1.2 Generalidades de los hongos Nectriaceos

Los hongos de la familia Nectriaceae son organismos de distribución mundial y son habitantes naturales de regiones tropicales y subtropicales. Son patógenos de muchos cultivos agrícolas y forestales de todo el mundo (Chaverri, Salgado, Hirooka, Rossman, & Samuels, 2011; Crous, 2002; Lombard, Crous, Wingfield, & Wingfield, 2010), llegando a causar varios síntomas como: podredumbre radical, lesiones necróticas en tallo, “damping-off”, chancros en ramas y corona, tizón en hojas y brotes; y enfermedad en frutos (Crous, 2002).

En el año 2011 los hongos Nectriaceos experimentaron cambios en su nomenclatura, prescindiendo de la doble nomenclatura en las especies de hongos cuyos nombres científicos eran diferentes para morfologías sexuales y asexuales (anamorfo y teleomorfo), lo cual generaba confusión a la hora de realizar una correcta identificación de los microorganismos (Lombard, van der Merwe, Groenewald, & Crous, 2015; Rossman *et al.*, 2013). La propuesta del uso de un solo nombre para un hongo adoptadas formalmente bajo normas del Código Internacional de Nomenclatura y Botánica (ICBN) (Hawksworth, 2011, 2012) y el surgimiento de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), técnicas de secuenciación, microarrays de oligonucleótidos y análisis filogenéticos permiten aclarar las relaciones entre morfos sexuales y asexuales (Parkinson, 2017).

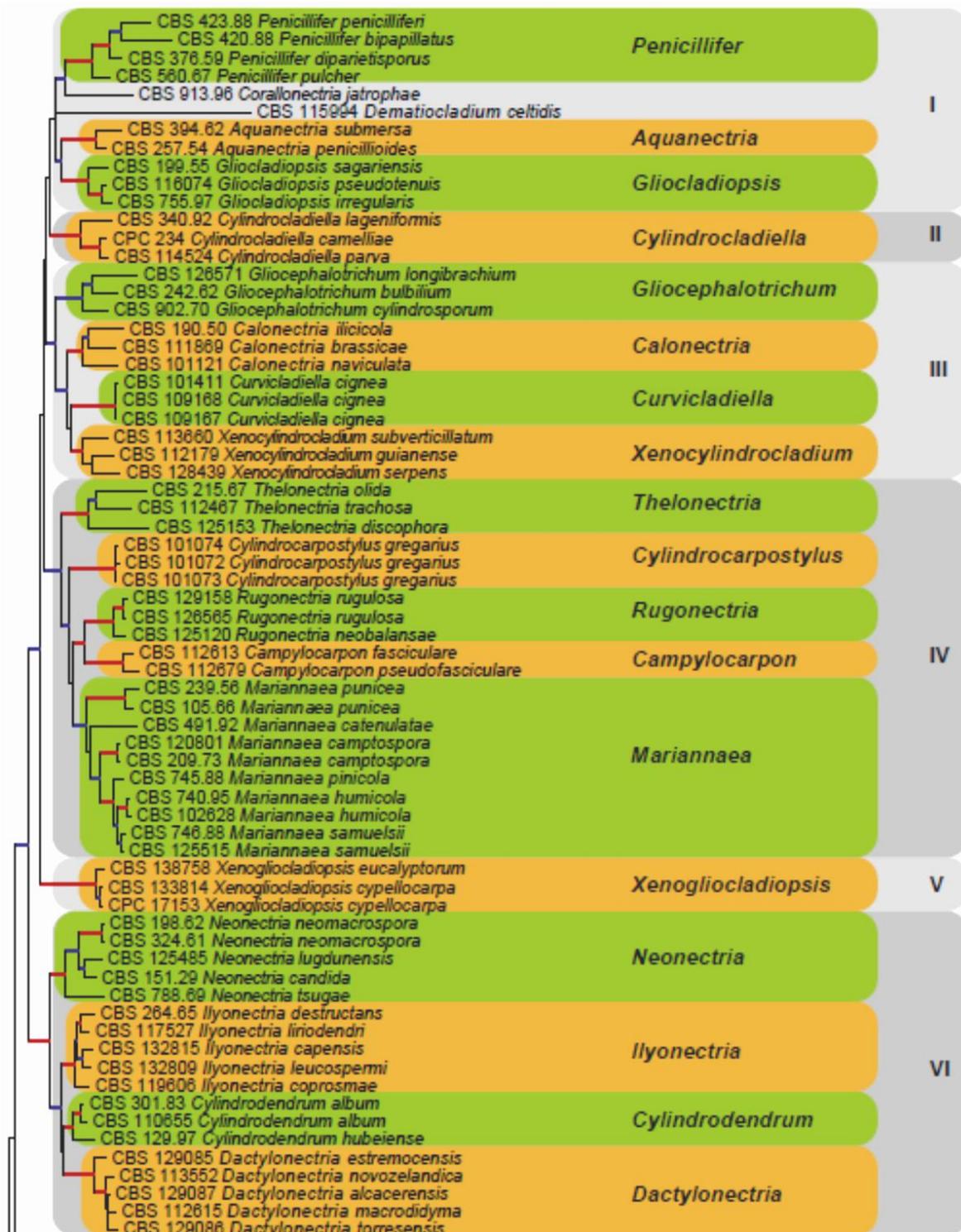
Estudios filogenéticos moleculares han determinado que los hongos similares a los cilindrocarpones, clasificados en la literatura antigua como especies de *Neonectria* e *Ilyonectria* (Chaverri *et al.*, 2011), pertenecen a cuatro géneros estrechamente relacionados, *Neonectria*, *Ilyonectria*, *Cylindrodendrum* y *Dactylonectria* que tienen morfos asexuales similares a los cilindrocarpones (Lombard, van der Merwe, Groenewald, & Crous, 2014; Lombard *et al.*, 2015) y su nomenclatura ha sido objeto de cambios constantes a medida que los estudios filogenéticos progresivos se van actualizando. Por ejemplo, el nombre *Neonectria liriodendri* prevaleció sobre su morfo asexual, *Cylindrocarpon liriodendri* (Halleen, Schroers, *et al.*, 2006; Weckert *et al.*, 2007), pero luego fue reclasificado como *Ilyonectria liriodendri*, un hongo similar a la *Neonectria* (Chaverri *et al.*, 2011). Otro ejemplo de esto es *Cylindrocarpon destructans* la forma asexual de *Neonectria radicícola* (Halleen, Schroers, Groenewald, & Crous, 2004; Zilberstein *et al.*, 2007) cuyo nombre actual es *Ilyonectria destructans* (Lombard *et al.*, 2015).

Es importante asignar adecuadamente los nombres de hongos Nectriaceos, considerando que el nombre *Cylindrocladium* fue sustituido por *Calonectria*; *Nectricladiella* ahora se denomina *Cylindrocladiella*; *Glionectria* se modificó por *Gliocladiopsis*; y *Neonectria* fue cambiado a *Cylindrocarpon* (Parkinson, 2017).

1.2.1 Nectriaceos asociados al cultivo de aguacate

La familia Nectriaceae contiene 18 clados filogenéticos y 48 géneros. Los géneros asociados con la pudrición de la raíz del aguacate son *Gliocladiopsis*, *Cylindrocladiella*, *Calonectria*, *Ilyonectria* y *Dactylonectria* estos se encuentran dentro de cuatro clados principales como se muestra en la Figura 1-1 (Lombard *et al.*, 2015).

Las principales características morfológicas de los géneros *Gliocladiopsis*, *Cylindrocladiella*, *Calonectria*, *Ilyonectria* y *Dactylonectria* son los conidios y conidióforos, además todos los géneros producen macroconidios cilíndricos, las diferencias taxonómicas importantes están en el tamaño y el número de septos, así como en la presencia o ausencia de microconidios (Parkinson, 2017). Asexualmente se caracterizan por presentar estructuras filidicas que producen conidios no septados (amerosporos) a multi-septados (fragmosporas), (Lombard *et al.*, 2015).

Figura 1-1: Árbol concenso de la familia Nectriaceae¹

¹Obtenido con método de máxima verosimilitud (ML), que muestra los clados 1-6 de la familia Nectriaceae reproducidos por Lombard *et al.*, (2015). Los géneros aceptados se indican en bloques de colores, con los números de clado mostrados a la derecha de los bloques.

En Israel, Colombia y Chile se ha descrito a *Ilyonectria destructans* como causante de necrosis en raíces de árboles jóvenes de aguacate, en invernaderos (Besoain & Piontelli, 1999; Ramírez, 2013; Zilberstein *et al.*, 2007). La muerte de árboles ocasionada por esta especie en Chile, alcanzó la cifra de 22.000 árboles en dos años (Besoain & Piontelli, 1999). También se identificó en España un *Cylindrocarpon sp* (*Ilyonectria*) asociado con la muerte de árboles de aguacate (C. López & Melero, 1992).

En Australia, se aislaron e identificaron molecularmente mediante secuencias de genes parciales de β -tubulina, Histona H3 e ITS las especies *Cylindrocladium parasiticum* (*Calonectria ilicicola*), *Cylindrocarpon liriodendri* (*Neonectria liriodendri*) y una especie de *Cylindrocladiella* asociados a raíces de árboles jóvenes de aguacate trasplantados al campo (E. Dann *et al.*, 2011; E. K. Dann *et al.*, 2012).

En Sudáfrica Darvas, (1978) aisló *Ilyonectria destructans* (*Cylindrocarpon destructans*), *Cylindrocladiella parva* (*Cylindrocladium parvum*) y *Calonectria morganii* (*Cylindrocladium scoparium*) y determinó que *I. destructans* y *Cy. parva* se encuentran con frecuencia en las raíces de aguacate y el suelo que rodea las raíces, mientras que *Ca. morganii* se encuentra con menos frecuencia en las raíces de aguacate. Años más tarde se demostró que la presencia de *Calonectria morganii* estaba restringida a Brasil, Europa y América del Norte, mientras que los aislados de Sudáfrica y Australia eran de *Calonectria pauciramosa* (Crous, 2002; Dann *et al.*, 2012; Lombard *et al.*, 2010).

1.3 *Calonectria* (*Cylindrocladium*)

El género *Calonectria* (*Ca. daldiniana*) fue descrito por primera vez en 1867, por el italiano Giuseppe De Notaris, basado en aislados de hojas muertas de *Magnolia grandiflora* en Locarno (Suiza). En 1979, Rossman sugirió el cambio de *Ca. daldiniana* bajo el sinónimo de *Ca. pyrochroa* y definió este hongo como un Nectriaceo debido a la presencia de ascocarpos de pared gruesa y color brillante que cambian a rojo en solución de KOH al 3% (Lombard *et al.*, 2010). Años más tarde en 1983 (Rossman), señala que *Ca. pyrochroa* podría estar relacionada con el morfotipo asexual *Cylindrocladium ilicicola* (Hawley) en base a aislamientos obtenidos de *Pittosporum undulatum* recolectados en Madeira (Portugal insular). Su anamorfo *Cylindrocladium* fue descrito por primera vez por Morgan (1892), quien lo aisló de una vaina de *Gleditsia triacanthos* e identificó como *Cy. Scoparium*.

Inicialmente el género *Calonectria* fue considerado como saprofita, debido a la ausencia de síntomas de enfermedad al inocular en huéspedes sospechosos (Graves, 1915). En 1917, Massey suministró la primera prueba de patogenicidad de este hongo, seguido de Anderson (1918), quien demostró la patogenicidad de *Ca. morganii* (como *Cy. scoparium*). Posteriormente, las especies de *Calonectria* fueron asociadas a una amplia gama de síntomas de enfermedad en un gran número de huéspedes (Crous, 2002).

La cantidad de familias de plantas afectadas por el hongo son alrededor de 100 y aproximadamente 335 especies hospedantes de plantas (Lombard *et al.*, 2010). Los hospederos mayormente reportados como susceptibles a enfermedades causadas por especies de *Calonectria* incluyen cinco familias de plantas de las cuales las más importantes están asociadas con Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.), Pinaceae (*Pinus* spp.) (Crous, 2002; Crous, Phillips, & Wingfield, 1991; Lombard *et al.*, 2010; Lombard, Rodas, Wingfield, & Wingfield, 2009), Fabaceae (*Acacia* spp., *Glycine max*, *Arachis hipogea*) (Hollowell, Shew, Beute, & Abad, 1998; Kim, Russin, & Snow, 1998) y Solanaceae (*Solanum tuberosum*) (Bolkan, Dianese, Ribeiro, & Almeida O. C., 1980; Bolkan, Ribeiro, & C., 1981). Se han reportado como causantes de síntomas de podredumbre radical, cáncer en el tronco, “damping-off” y lesiones foliares (Brown & Ferreira, 2000; Cox, 1953; Crous, 2002; Hodges & Cardoso, 1972; Lombard, Rodas, Wingfield, & Wingfield, 2009; Sharma & Mohanan, 1982; Taniguchi, Tanaka, Tamai, Yamanaka, & Futai, 2008).

En cultivos de aguacate el género *Cylindrocladium*, ha sido reportado desde los años 70s en países como Sudáfrica, Israel, España, Chile y Australia; donde se han aislado de árboles adultos y de plantas en invernadero. En Australia, se han aislado e identificado molecularmente las especies *Cylindrocladium parasiticum* (*Calonectria illicicola*), aislados de las raíces de árboles jóvenes de aguacate trasplantados al campo (Dann *et al.*, 2012, 2011; Parkinson, 2017; Parkinson, Le, Shivas, & Dann, 2019). En Colombia, *Cylindrocladium* ha sido reportado por (Saltarén, Varón de Agudelo, & Marmolejo, 1998) como el aislado más frecuente (65%) en viveros comerciales del Valle, Cauca, Risaralda y Caldas.

1.3.1 Taxonomía de *Calonectria*

El género *Calonectria* ha sido objeto de numerosos estudios taxonómicos desde 1990 (Crous, 2002; Crous & Wingfield, 1994; Lombard *et al.*, 2010). Estos estudios han resultado en el reconocimiento de 116 especies, de las cuales 114 se complementan con ADN barcoding (Crous, 2002; Lombard *et al.*, 2010). *Calonectria* pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Nectriaceae como se observa en la Tabla 1-4.

Tabla 1-4: Clasificación taxonómica de *Calonectria*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Calonectria</i>

Fuente: Lombard *et al.*, (2015)

Durante varios años, este microorganismo fue conocido bajo el nombre de su morfotipo asexual *Cylindrocladium* (Crous, 2002; Lombard *et al.*, 2010). Sin embargo, siguiendo la convención de usar un solo nombre científico para una especie de hongo (Hawksworth, 2011, 2012), *Calonectria* ha sido elegido por la comunidad científica y académica para designar este hongo (Rossman *et al.*, 2013).

1.3.2 Características morfofisiológicas de *Calonectria*

Morfológicamente el anamorfo de *Calonectria* conocido como *Cylindrocladium*, ha sido de gran importancia para la identificación taxonómica del hongo. Barnett & Hunter, 1998 describieron al género *Cylindrocladium* como un hongo de conidióforos peniciliados en posición vertical, hialinos, dicotómicamente o tricotómicamente ramificados, cada uno de los cuales termina en dos o tres fiálides, típicamente con una rama estéril alargada delgada que termina en una inflamación globosa o elipsoidal; los conidios (fialosporas) son hialinos y segmentados, de 2 o más células, cilíndricos, soportados individualmente, pero mantenidos juntos en haces por mucílago; producen pequeños esclerocios de color amarillo-marrón.

Los conidióforos, peritecios y microesclerocios (EM) se producen por separado o en combinación en cultivo o en tejido huésped. Los peritecios de solo unas pocas especies ocurren en el cultivo porque necesitan requisitos de formación precisos. Los conidios largos y cilíndricos y los microesclerocios suelen estar presentes en los cultivos de la mayoría de las especies. Los conidios y las vesículas del conidióforo son las estructuras primarias utilizadas para clasificar e identificar las especies del género, mientras que los microesclerocios distintivos verifican el taxón genérico (Booth & Murray, 1960).

Las características de los anamorfos que se emplean ampliamente en las identificaciones incluyen la forma de la vesícula, la longitud y extensión del estípite, dimensión y cantidad de septos de las macroconidias (Boesewinkel, 1982b; Crous, 2002; Crous & Wingfield, 1994; Peerally, 1991). Las características morfológicas del teleomorfo más importantes para la identificación son dimensión y septación de las ascosporas, número de ascosporas dentro de las ascas y color del peritecio. No obstante, los peritecios de las especies de *Calonectria* son morfológicamente muy similares, razón por la cual estos no son útiles en la identificación (Crous, 2002; Crous & Wingfield, 1994).

La temperatura óptima de crecimiento se ha determinado en agar con extracto de malta al 2% (MEA), en oscuridad. La mayoría de *Calonectria* spp. son euritermales, es decir que crecen a temperaturas mínimas de 10°C, máximas por encima de 30 °C; algunas especies con estas características son, *Ca. morganii*, *Ca. Pauciramosa* y *Ca. Polizzii*. Otras especies como *Ca. mexicana*, *Ca. spathiphylli* y *Ca. ilicicola*, crecen bien a temperaturas entre 10 y 30 °C, mientras que *Ca. pseudonaviculata* crece bien a baja temperatura (mínimo por encima de 5 °C) (Crous, 2002).

1.3.3 Ciclo de enfermedad de *Calonectria*

Las epidemias de enfermedades de *Calonectria* se clasifican como policíclicas. La literatura sobre la patogenicidad de hongos del género *Calonectria* enfocada a especies que afectan los cultivos de aguacate es limitada, sin embargo, se ha propuesto un ciclo de enfermedad para *C. scoparium* en viveros afectando plantas de Eucalipto, como se observa en la Figura 1-2 (Crous *et al.*, 1991; Ferreira, 1989). En este ciclo la enfermedad generalmente se ve favorecida por la capacidad de retención de humedad en suelo entre el 50 y 75%, además del excesivo sombrero

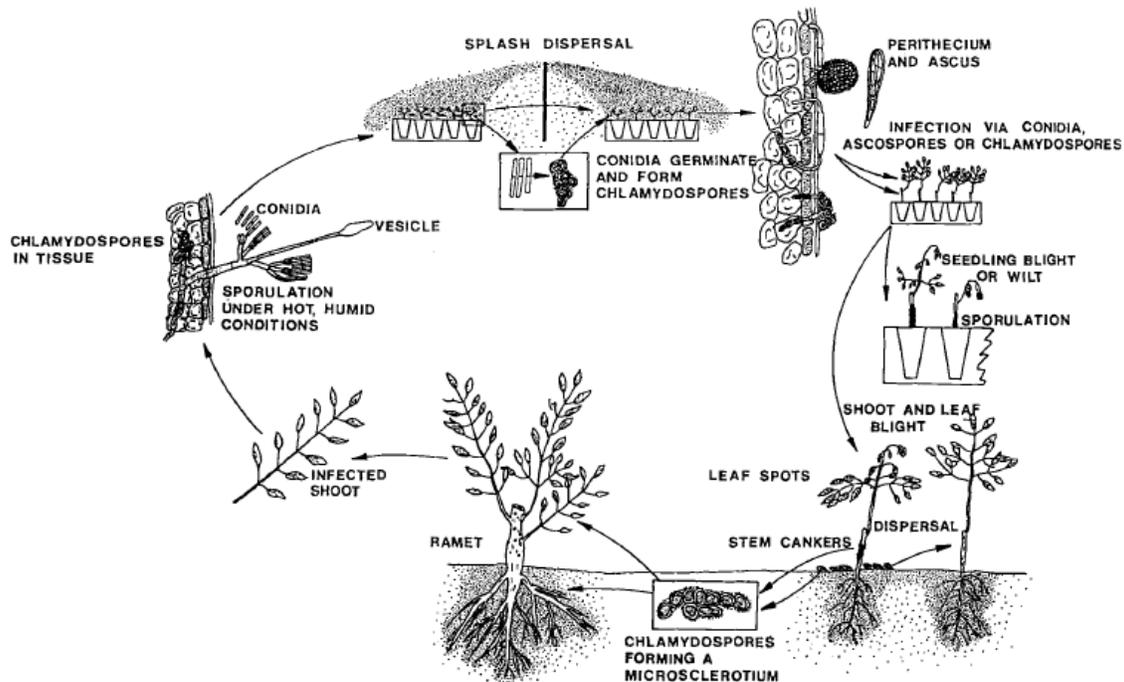
y la alta densidad de plántulas dispuestas en un mismo área (Mohanani, Sharma, Nair, Kedharnath, & Kondas, 1986).

El microorganismo se caracteriza por ser un habitante natural del suelo y restos de plantas, el cual genera como inóculo primario grupos de clamidosporas denominadas microesclerocios que tienen la capacidad de penetrar las raíces y en algunos casos generan infección también en las hojas (Bugbee & Anderson, 1963; R. G. Linderman, 1973). Cuando los tejidos infectados se desintegran, los microesclerocios se liberan al suelo y pueden sobrevivir durante períodos prolongados en ausencia de un huésped (Mohanani *et al.*, 1986). Según, Sobers & Littrell, (1974) los microesclerocios pueden sobrevivir en los suelos hasta nueve años. Almeida & Bolkan, (1981) señalaron que los microesclerocios pueden sobrevivir al menos 150 días en ausencia de residuos de plantas y en algunos casos los hospedadores alternativos desempeñan un papel importante en la supervivencia a largo plazo de *Calonectria* en viveros (Mohanani *et al.*, 1986; Sobers & Littrell, 1974).

En los viveros, el inóculo (conidios y ascosporas) se disemina principalmente a través del movimiento del agua, o aire (Crous, 2002). La infección ocurre cuando el agua salpica los conidios que se originan del microesclerocio o el tejido infectado del hospedador, en mezclas de macetas y plantas (Crous, 2002).

Investigaciones realizadas por Pataky & Beute, (1983); Taylor, Griffin, & Garren, (1981) sugieren como principal estrategia de manejo, la reducción del inóculo inicial mediante condiciones de sequía severa y bajas temperaturas en suelo (Phipps & Beute, 1979; Roth, Griffin, & Graham, 1979) lo que conduce a una disminución en el número de microesclerocios viables.

Figura 1-2: Ciclo de enfermedad de *C. scoparium* en viveros de Eucalipto.



Fuente: (P. W. Crous *et al.*, 1991 adaptado de Ferreira, 1989).

1.4 *Ilyonectria* (*Cylindrocarpon*, *Neonectria*)

En 1913, Wollenweber utilizó el nombre *Cylindrocarpon* para designar a los anamorfos de la sección *Willkommiales* de *Nectria*, sin clamidosporas. Años más tarde Wollenweber (1917) amplió la definición de *Cylindrocarpon* incluyendo especies que formaban clamidosporas en el micelio, como *Cylindrocarpon destructans* (Brayford, 1993).

Las especies de *Cylindrocarpon* Wollenw., son comunes y pueden aislarse como habitantes naturales del suelo, saprofitos, patógenos de raíz, o patógenos débiles de plantas pertenecientes a los géneros: *Abies*, *Aster*, *Beta*, *Fragaria*, *Ginseng*, *Juglans*, *Lilium*, *Malus*, *Narcissus*, *Pinus*, *Prunus*, *Rhododendrum*, *Solanum*, *Vitis*, entre otras (Brayford, 1993; Coyier & Roane, 1988; Daughtrey, Wick, & Peterson, 1994; Domsch, Gams, & Anderson, 1981; Grasso, 1984; Matuo & Miyazawa, 1984; Montecchio, 1995). *Cylindrocarpon destructans* (Zinns.) Scholten., sinónimo de *Neonectria radicularis* (Gerlach y L. Nilsson) Mantiri & Samuels, 2001] y *C. obtusisporum* Wollenw. han sido frecuentemente descritos como agentes de las pudriciones de las raíces de varios huéspedes (Booth, 1966; Seifert, McMullen, Yee, Reeleder, & Dobinson, 2003).

Un estudio realizado en España identificó a *Cylindrocarpon* como el aislado de mayor incidencia en raíces de aguacate con necrosis con un 51%. Este microorganismo reduce el vigor de los árboles y predispone a la infección de otros patógenos fúngicos u Oomycetos (C. López & Melero, 1992). Por otro lado, estudios realizados en viveros de aguacate en Israel, permitieron observar la pudrición severa de raíces y muerte de árboles jóvenes (2 a 5 años después del establecimiento del huerto), ocasionada por *Neonectria radicola* (anamorfo *Cylindrocarpon destructans*) y aislada con una frecuencia entre el 10-100% (Zilberstein *et al.*, 2007).

Históricamente *Cylindrocarpon destructans* ha experimentado varios cambios taxonómicos y de nomenclatura, referenciándose en la literatura de patología vegetal bajo los sinónimos, *Neonectria radicola* e *Ilyonectria radicola* (Chaverri *et al.*, 2011). Sin embargo, el nombre actual de esta especie es *Ilyonectria destructans* (Lombard *et al.*, 2015).

Ilyonectria destructans produjo durante los años de 1994 y 1995 la muerte de 22.000 plantas de aguacate producidas a nivel comercial en viveros de Quillota, Región de Valparaíso (Chile). La enfermedad fue inicialmente confundida con la tristeza del aguacate causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands., debido a los síntomas iniciales de marchitez y decaimiento de la parte aérea de la planta. Sin embargo, se descartó su relación con la enfermedad porque los síntomas aéreos difieren, ya que se produce: clorosis, disminución del tamaño foliar y un decaimiento más lento en plantas afectadas a nivel de vivero (Besoain & Piontelli, 1999).

Vitale *et al.*, (2012) identificó en Italia una especie conocida como *Ilyonectria macrodidyma*, capaz de generar pudrición negra de la raíz y retraso en el crecimiento de plantas de aguacate. En Colombia, Ramirez & Morales, (2013) reportaron por primera vez a *Ilyonectria (Cylindrocarpon)* como el causante de la pudrición negra en raíces de aguacate, en el departamento de Antioquia cuyas plantas manifestaban síntomas típicos de marchitez y amarillamiento foliar, causando rápidamente la muerte de las plantas.

1.4.1 Taxonomía de *Ilyonectria*

El grupo *N. radicola*, en adelante *Ilyonectria* gen. nov. hace parte de uno de los cinco linajes del grupo *Neonectria/Cylindrocarpon* (Booth, 1966), los otros cuatro linajes son conocidos como: (1) *Neonectria / Cylindrocarpon* sensu stricto (grupo *N. coccinea*); (2) *N. rugulosa*-group, en

adelante *Rugonectria* gen. nov.; (3) *N. mammoidea* / grupo veillotiana, en adelante *Thelonectria* gen. nov. y (4) *Campylocarpon*. Cada uno de los linajes puede interpretarse como géneros independientes que generalmente no se pueden distinguir en función de un solo carácter morfológico o ecológico (Chaverri *et al.*, 2011). Además, *Cylindrodendrum* y *Dactylonectria* se han segregado de *Ilyonectria* (Lombard *et al.*, 2014, 2015). Todos estos géneros se conocen colectivamente como hongos similares a los cilindrocarpones, pero se clasifican formalmente en géneros separados, *Neonectria*, *Ilyonectria* y *Dactylonectria* (Lombard *et al.*, 2014, 2015).

La mayoría de las especies de *Ilyonectria* se encuentran como habitantes del suelo razón por la cual estos organismos toman su nombre del prefijo "ilyo" = griego para "barro" o "tierra". Los microorganismos pertenecientes al género *Ilyonectria* hacen parte de la familia *Nectriaceae*, como se describe en la Tabla 1-5.

Tabla 1-5: Clasificación taxonómica de *Ilyonectria*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Ilyonectria</i>

Fuente: Chaverri *et al.*, (2011)

1.4.2 Características morfofisiológicas de *Ilyonectria*

Su morfología asexual se caracteriza por producción de abundantes microconidios y clamidosporas parduzcas que son intercalares, globosas y simples o encadenadas (Chaverri *et al.*, 2011). Los macro y microconidios son hialinos y tienen hifa (basal) (cicatrización visible en el punto de unión al conidióforo) (Chaverri *et al.*, 2011; Ulloa & Hanlin, 2000). Los macroconidios son cilíndricos (Lombard *et al.*, 2015) y 1–3 septados (generalmente de 25–55 µm de longitud); y los microconidios son elipsoidales a ovoides y aseptados ó 1-septados (generalmente de 3 a 15 µm de longitud) (Chaverri *et al.*, 2011). Los macro y microconidios se producen a partir del mismo conidióforo. Los conidióforos son simples, no ramificados o escasamente ramificados ó ramificado verticalmente (Chaverri *et al.*, 2011).

Los morfos sexuales de *Ilyonectria* tienen peritecio de globoso a subgloboso de color rojo (Lombard *et al.*, 2014) y textura escamosa (Chaverri *et al.*, 2011). El ápice del peritecio contiene papila (pequeñas elevaciones redondeadas cónicas) (Ulloa & Hanlin, 2000) y las ascosporas son elipsoidales, 1-septadas, lisas y hialinas (Chaverri *et al.*, 2011).

1.4.3 Ciclo de enfermedad de *Ilyonectria*

El ciclo de enfermedad de la pudrición negra de la raíz en el aguacate aún no ha sido estudiado. Sin embargo, el microorganismo se caracteriza por ser un habitante normal del suelo con capacidad para infectar en cualquier etapa de desarrollo de la planta y sobrevivir a temporadas de invierno o en ausencia del cultivo (Agustí-Brisach, Gramaje, García-Jiménez, & Armengol, 2013; Halleen, Fourie, & Crous, 2006; Pathrose, 2012; Petit, Barriault, Baumgartner, Wilcox, & Rolshausen, 2011; Probst, 2011).

Ilyonectria spp. es muy frecuente en los suelos de viveros (Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Bleach, Jones, Ridgway, & Jaspers, 2013) lo cual conduce a que la pudrición negra de la raíz generalmente ocurra en etapas tempranas del desarrollo de la planta. Está enfermedad tiende a matar rápidamente los árboles jóvenes, debido a que bloquea el tejido del xilema (Outram, 2013). También, pueden verse afectados árboles de aguacate más viejos si las condiciones cambian y las clamidosporas latentes comienzan a germinar en suelos infectados (Outram, 2013; Probst, 2011). Se ha descrito que especies como *Ilyonectria destructans* presentan una mayor incidencia en suelos ácidos (pH 5) que en suelos alcalinos (Rahman & Punja, 2005).

Ilyonectria spp se dispersa a través del agua por salpicadura de los conidios, por lluvia o riego provocando la infección de las partes inferiores del tronco (Jaspers, 2013; Probst, 2011). También se pueden dispersar a través de actividades humanas como el uso de herramientas y maquinaria infectadas (Agusti & Armengol, 2012; Outram, 2013; Probst, 2011). Mover el suelo contaminado y el agua del suelo a áreas no infectadas también dispersará a los patógenos de la pudrición de la raíz negra (Jaspers, 2013). Además, estos patógenos se favorecen ante condiciones de estrés como los sistemas de drenaje deficiente, la baja nutrición y la alta compactación del suelo (Halleen *et al.*, 2004). Las clamidosporas en el suelo permanecen latentes hasta que los exudados de las plantas inician la germinación o se descomponen por otros microorganismos (Probst, 2011).

1.5 *Cylindrocladiella*

Boesewinkel, (1982a) estableció el género *Cylindrocladiella* para agrupar cinco especies de hongos que comúnmente eran confundidos con *Calonectria* por su parecido en su forma asexual (Crous, 2002). Las especies de *Cylindrocladiella* se pueden distinguir de *Calonectria* spp. por sus extensiones de estípite aseptadas, conidióforos simétricamente ramificados que pueden ser penicilados y/o subverticilados y sus pequeños conidios cilíndricos de un septo (<20 µm de longitud) (Boesewinkel, 1982a; Crous & Wingfield, 1993; C. L. Schoch, Crous, Wingfield, & Wingfield, 2000).

Los estados genéricos de *Cylindrocladiella* fueron cuestionados por varios autores debido su gran parentesco con *Calonectria* (Peerally, 1991; Sharma & Mohanan, 1991). Sin embargo, evaluaciones y comparaciones de Crous & Wingfield, (1993), confirmaron el estado genérico de este género, que luego fue respaldado por datos moleculares utilizando RFLP (C. L. Schoch *et al.*, 2000; Victor *et al.*, 1998). Más adelante la inferencia filogenética del gen ITS y de la región parcial de la β tubulina (C. L. Schoch *et al.*, 2000) permitió la descripción y delimitación de un número grande de especies (Lombard, Cheewangkoon, & Crous, 2017; Lombard, Shivas, To-Anun, & Crous, 2012; Schoch *et al.*, 2000; Van Coller, Denman, Groenewald, Lamprecht, & Crous, 2005). Actualmente, *Cylindrocladiella* tiene 35 especies (Crous, 2002; Inderbitzin, Bostock, & Subbarao, 2012; Lombard *et al.*, 2017; Van Coller *et al.*, 2005). Cinco especies de *Cylindrocladiella* han sido reportadas como patógenos y saprofitos de varios hospederos, entre ellas *Cylindrocladiella camelliae* ha sido reportada como causante de podredumbre en *Eucalyptus* spp., *Cy. elegans* ha sido asociada a pudriciones en raíces de *Arachis hypogaea* L. y en hojarasca de *Eucalyptus*, *Cy. lageniformis* se ha aislado de suelo y raíces de *Vitis vinífera*, *Cy. parva* se ha aislado de suelo de *Eucalyptus*, raíces de *Fragaria* sp., *Persea americana* Mill., *Pinus* spp., *Prunus* sp. y *V. vinífera*; y *Cy. peruviana* asociada a podredumbre de raíces en *Acacia mearnsii*, *Eucalyptus* spp., *Protea* sp., *V. vinífera* y *Persea americana* (Aiello *et al.*, 2020; Crous, 2002; Crous & Wingfield, 1993; Van Coller *et al.*, 2005; Victor *et al.*, 1998).

Cylindrocladiella parva fue asociada con pudrición de raíces y esquejes de aguacate en Sudáfrica (Crous *et al.*, 1991; Darvas, 1978; Van Coller *et al.*, 2005). Además, en la década de 1980 se asoció a la muerte de árboles aguacate de 3 años en Woombye, Australia (Dann *et al.*, 2012). No obstante, la patogenicidad de *Cy. parva* no se ha logrado comprobar (Parkinson, 2017).

Cylindrocladiella pseudoinfestans ha sido aislada de raíces de aguacate con síntomas de marchitez. Sin embargo, su patogenicidad no ha sido demostrada en raíces (Parkinson, 2017). Estos hongos generalmente no se consideran patógenos primarios, aunque es probable que se subestime su papel para causar enfermedades de las plantas. El hecho de que se aislen usando cebo con tejido vegetal vivo similar al enfoque de *Calonectria* spp. (Crous, 2002), sugiere cierto nivel de patogenicidad (Pham *et al.*, 2018).

1.5.1 Taxonomía de *Cylindrocladiella*

Los hongos pertenecientes al género *Cylindrocladiella* son habitantes normales del suelo considerados patógenos y/o saprofitos de varios huéspedes y sustratos de plantas. Se encuentran distribuidos a nivel mundial (Farr & Rossman, 2020) principalmente en Sudáfrica, Australia, Indonesia, Nueva Zelanda, Vietnam y Malasia (Pham *et al.*, 2018). Han sido asociados con una variedad de síntomas entre los que destacan pudriciones de raíces, tallos y esquejes de cultivos agrícolas, forestales y hortícolas (Crous, 2002; Crous *et al.*, 1991; Crous & Wingfield, 1993; Peerally, 1991; Scattolin & Montecchio, 2007; Van Coller *et al.*, 2005; Victor *et al.*, 1998). Los microorganismos pertenecientes al género *Cylindrocladiella* hacen parte de la familia Nectriaceae, como se describe en la Tabla 1-6.

Tabla 1-6: Clasificación taxonómica de *Cylindrocladiella*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Cylindrocladiella</i>

Fuente: Rossman *et al.*, (2013)

1.5.2 Características morfofisiológicas de *Cylindrocladiella*

El género *Cylindrocladiella* incluye hongos similares a *Calonectria* con conidióforos subverticilados o penicilados con las ramas generalmente dispuestas alrededor de un estípite central, separado de una célula basal con un tabique. La vesícula es terminal, de pared delgada y con la edad puede llegar a desarrollar un tabique en su ápice (Lombard *et al.*, 2015). Los

conidióforos terminan en dos a cuatro fiálides que producen haces asimétricos de pequeños conidios cilíndricos (típicamente <30 µm de longitud) con hasta un tabique (Crous, 2002; Lombard *et al.*, 2012). Los conidióforos de *Cylindrocladiella* spp. no tienen microconidios, a diferencia de *Calonectria*. En algunas especies de *Cylindrocladiella* spp., las paredes periteciales son lisas y colapsan lateralmente cuando están secas (Crous, 2002; Lombard *et al.*, 2012). Las ascosporas hialinas están dispuestas en una sola fila, y su forma va de elipsoide a fusoide con extremos obtusos, lisos, de un septo (Lombard *et al.*, 2015). Las clamidosporas se agrupan cadenas con mayor frecuencia (y no en grupos), son marrones y de paredes gruesas (Boesewinkel, 1982a; Lombard *et al.*, 2015).

1.6 *Gliocladiopsis*

El género *Gliocladiopsis* fue introducido por Saksena (1954), quien lo uso para incluir un aislamiento fúngico del suelo con conidióforo penicilado, similar a *Penicillium* y *Gliocladium*. El hongo descrito por Saksena se denominó *G. sagariensis* y se caracterizó por presentar conidios cilíndricos similares a los de *Calonectria* (*Cylindrocladium*), se diferenció de hongos como *Penicillium* y *Gliocladium* basándose en las características morfológica del conidio, aparato conidiógeno, y la aparente falta de formación de clamidosporas en el cultivo. No obstante, Agnihothru (1959), basándose en la formación de clamidosporas en el cultivo y en la similitud morfológica, denominó a *G. sagariensis* bajo el sinónimo de *Cylindrocarpon tenue* (Bugnicourt & Guilliermond, 1939). En 1968, Barron consideró a *Gliocladiopsis* como un sinónimo de *Calonectria* (*Cylindrocladium*).

Crous & Wingfield (1993), utilizaron el género *Gliocladiopsis* para incluir especies con conidióforos densos y penicilados, que a diferencia de *Cylindrocladiella* y *Calonectria*, carecían de extensiones de estipe estériles. Además, reacomodaron a *C. tenue* en *Gliocladiopsis*, teniendo en cuenta que las características de los conidióforos no correspondían a las del género *Cylindrocarpon*. por lo tanto, conservo su nombre *G. sagariensis* como sinónimo.

Todas las especies de *Gliocladiopsis* están asociadas con síntomas de raíces necróticas en plantas enfermas, hojarasca o suelo (F. Liu & Cai, 2013; Lombard & Crous, 2012). En una investigación realizada en Australia, sobre organismos causales de la pudrición de la raíz de aguacate, se obtuvieron 19 aislamientos de *Gliocladiopsis* a partir de lesiones necróticas de las raíces de aguacate, las cuales se identificaron por su morfología y comparación de secuencias

de ADN determinando la presencia de especies como, *G. forsbergii*, *G. peggii* and *G. whileyi*. Sin embargo, este estudio no logro la reproducción de síntomas asociados a la enfermedad (Parkinson, 2017; Parkinson, Shivas, & Dann, 2016).

1.6.1 Taxonomía de *Gliocladiopsis*

Gliocladiopsis es un género de hongos habitantes del suelo, se encuentran especialmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Lombard & Crous, 2012). Según Crous, (2002), las especies de *Gliocladiopsis* son consideradas como patógenos o saprofitos secundarios de plantas.

Tabla 1-7: Clasificación taxonómica de *Gliocladiopsis*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Gliocladiopsis</i>

Fuente: Rossman *et al.*, (2013)

1.6.2 Características morfofisiológicas de *Gliocladiopsis*

Gliocladiopsis presenta características morfológicas similares a las de *Cylindrocladiella*. Las especies de ambos géneros muestran arreglos de esporas similares y ninguno de los géneros produce microconidios (Crous, 2002). *Gliocladiopsis* posee densos conidióforos penicilados, que producen pequeños conidios cilíndricos rectos aseptados o con un septo (Rossman *et al.*, 2013), típicamente <30 µm de longitud (Crous, 2002; Lombard & Crous, 2012). *Gliocladiopsis* produce clamidosporas marrones que se agrupan en cadenas globulosas (Lombard & Crous, 2012).

La diferencia entre *Cylindrocladiella* y *Gliocladiopsis* es que esta última tiene conidióforos con varias series de ramas a diferencia de *Cylindrocladiella* que solo tiene una serie de ramas en los conidióforos (Crous, 2002). Los peritecios de *Gliocladiopsis* son obovoides o ampliamente obpiriforme.

1.7 *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, para agrupar especies de hongos de conidios fusiformes (citado por Booth, 1971). En 1935, Wollenweber & Reinking, describieron 65 especies, 55 variedades y 22 formas en un documento titulado "Die Fusarien". Mas adelante, Snyder & Hansen, (1945) redujeron el número de especies de *Fusarium* a nueve, mientras otros micólogos continuaron con el desarrollo de la taxonomía para *Fusarium* sin lograr un acuerdo global para distinguir las especies morfológicamente (Snyder & Hansen, 1945).

En la década de 1990, se identificaron especies de acuerdo con su filogenia mediante secuenciación de ADN, dando como resultado la introducción de nuevas especies de *Fusarium* que no se pueden distinguir morfológicamente. En 2006 Leslie & Summerell, publicaron The *Fusarium* Laboratory Manual y describieron características morfológicas, biológicas y filogénicas de 70 especies de *Fusarium*. El manual es ampliamente utilizado por micólogos y fitopatólogos para identificar aislados de *Fusarium*. Sin embargo, aún se sugiere el uso de caracteres morfológicos combinados con datos moleculares a la hora de realizar identificación de especies de *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

El género *Fusarium* es uno de los más extendidos por el mundo, "varias de sus especies son fitopatógenas e infectan a una amplia gama de cultivos, incluyendo maíz (*Zea mays* L.) trigo (*Triticum* spp.), avena (*Avena sativa* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.)" (Nicolaisen *et al.*, 2009). Además, algunas de sus especies se caracterizan por producir una amplia variedad de micotoxinas, que incluyen zearalenona, fumonisina, moniliformina y tricotecenos, que causan diversos trastornos, incluido el cáncer, en animales y humanos (Munkvold, 2017).

Estudios realizados en el centro de investigación de Horticultura El-Kanater, en Egipto, evaluaron cepas de *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. semitectum* previamente aisladas de raíces de plántulas de vivero y reprodujeron síntomas de marchitamiento o "damping off" en plantas de aguacate en diferentes grados de patogenicidad. Señalando a *Fusarium solani* como el hongo más patógeno, seguido por *F. moniliforme* de acuerdo con su incidencia en condiciones de invernadero (Radwan & Hassan, 2018). *Fusarium* spp. también fue reaislado frecuentemente de raíces necróticas en estudios realizados en España y en Colombia (C. López & Melero, 1992; Salterén *et al.*, 1998).

1.7.1 Taxonomía de *Fusarium*

Fusarium es uno de los hongos con mayor número de especies causantes de enfermedades en plantas. Se han reportado especies patógenas, parasitas y saprofitas; pudiendo estar presentes en todas las partes vegetativas de la planta (Agrios, 1995; Nelson, 1981). Además, de tener una distribución cosmopolita con una dispersión casi mundial (Agrios, 1995). Este género pertenece al filo Ascomycota, como se describe en la Tabla 1-8.

Tabla 1-8: Clasificación taxonómica de *Fusarium*.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>

Fuente: (Rossman *et al.*, 2013)

1.7.2 Características morfofisiológicas de *Fusarium*

Las hifas del hongo son septadas, hialinas, delgadas y producen abundantes microconidios principalmente unicelulares, sin septos, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; estas se forman sobre conidióforos cortos y poco ramificados. El tamaño de los microconidios va de cinco a doce μm de largo, por 2,5-3,5 μm de ancho (Nelson, 1981). El microorganismo también produce macroconidios, fusiformes, curvados en forma de hoz, largos, de pared delgada, con varias células y de tres a cinco septos transversales; los macroconidios tienen un tamaño de 27 a 46 μm de largo por 3,0 a 4,5 μm de ancho. Las clamidosporas se agrupan en pares terminales o intercalares y poseen un tamaño de 5 a 11 μm de diámetro (Nelson, 1981).

Fusarium se desarrolla adecuadamente en temperaturas entre 25 y 30°C, tolera temperaturas mínimas de 5°C y máximas de 37°C. Se elimina en suelos con temperaturas entre 57,7 y 60 °C durante 30 minutos. Su temperatura ideal para esporulación está entre 20 y 25°C, con periodos alternados de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Este patógeno no presenta grandes cambios por el pH, pues se desarrolla en pH desde 2,2 hasta 9,0, siendo 7,7 el óptimo (Fletcher & Martin, 1972; Nelson, 1981; Tramier, Pionnat, & Metay, 1983).

1.7.3 Ciclo de vida de *Fusarium*

El patógeno se dispersa en forma de micelio o esporas, por salpicadura del agua, herramientas agrícolas, injertos o el viento (Agrios, 1995). Este patógeno es un habitante del suelo que puede usar los sustratos para crecer saprofiticamente, por esta razón, otra de las fuentes de diseminación es el suelo contaminado en donde el hongo puede sobrevivir durante muchos años mediante las clamidosporas (Sarasola & Rocca M., 1975).

El proceso de infección inicia con la adhesión y germinación de esporas, micelio o clamidosporas presentes en la superficie externa de la planta. Las hifas del hongo penetran la epidermis de raíces jóvenes de la planta o ingresan a través de heridas, hechas mecánicamente o por insectos (Gallardo, 2004). Después de que el hongo logra entrar en la planta, se dirige hacia los vasos del xilema, se desarrolla e invade los vasos conductores de las raíces y del tallo (Nelson, 1981), limitando el movimiento del agua, ya que produce sustancias como goma, derivadas de la degradación celular (Agrios, 1995). Este proceso continúa hasta que la planta se marchita por completo, detiene su crecimiento y finalmente muere (Agrios, 1995). El patógeno llega a la superficie de los tejidos muertos y esporula excesivamente, para garantizar que sus esporas sean diseminadas hacia nuevas plantas por acción del viento, agua u otros elementos (Agrios, 1995).

1.8 Síntomas ocasionados por Nectriaceos patógenicos en plantas de aguacate

Entre los síntomas más comunes ocasionados por los hongos Nectriaceos destacan la pudrición negra de la raíz, como su nombre lo indica las raíces toman una tonalidad parda, indicio de pudrición que conduce a la reducción de la biomasa (Parkinson, 2017). La enfermedad generalmente aparece como un área de color marrón oscuro en la punta de la raíz y se extiende con el tiempo hacia arriba, llegando hasta la corona de la raíz (Parkinson, 2017). Esta pudrición causa atrofia en la planta debido a que se impide la absorción de nutrientes, lo cual conduce a la generación de otros síntomas como clorosis, defoliación y finalmente la marchitez o muerte de la planta en casos severos (Dann *et al.*, 2012).

Otros investigadores designan esta enfermedad como complejo de la marchitez del aguacate, la cual es causada por hongos Nectriaceos y Oomycetos del género *Phytophthora* y *Pythium*. Los

síntomas más característicos de la marchitez del aguacate son el amarillamiento foliar, flacidez del tejido, retraso del crecimiento, floración excesiva y fructificación de baja calidad en árboles adultos (Ramírez *et al.*, 2017). En la etapa avanzada, esto puede causar defoliación total, muerte regresiva y muerte de la planta. En las raíces, los síntomas están asociados con la pudrición de la raíz primaria, secundaria y terciaria (Ramírez *et al.*, 2017).

1.9 Identificación molecular de hongos Nectriaceos

La identificación molecular de hongos ha permitido aclarar la taxonomía de las especies Nectriaceas, mediante la comparación de secuencias de ADN y análisis filogenéticos asociados (Lombard *et al.*, 2010, 2015). En la técnica de identificación molecular una vez extraído el ADN del hongo, se realiza la amplificación por PCR de loci de genes elegidos y posteriormente la secuenciación del material amplificado. La identidad de los hongos se establece realizando alineamientos de las secuencias amplificadas por PCR, mediante la herramienta de alineación local básica (BLAST). BLAST alinea la secuencia de genes, con secuencias de interés disponibles en GenBank (base de datos de secuencias de NCBI), lo cual permite una identificación de taxones de interés en base a la similitud de sus secuencias (Parkinson, 2017).

Los tres genes ribosomales nucleares más utilizados en la identificación de hongos son la subunidad grande (nrLSU-26S o 28S), la subunidad pequeña (nrSSU-18S), y toda la región espaciadora transcrita interna (ITS1, 5.8S, ITS2). Siendo esta última, la más útil para la identificación de hongos a nivel de especie, ya que es una porción de RNAr de evolución más rápida (Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017). La región ITS tiene un tamaño entre 600-800 pares de bases, que la hace ideal para condiciones de ciclado térmico por PCR (Parkinson, 2017). Esta región puede ser fácilmente amplificada con cebadores universales como ITS1, ITS2, ITS4 e ITS5 y su uso generalizado permitió que se seleccionara como el código de barras oficial para hongos (L. Schoch *et al.*, 2012). Estos genes se han utilizado ampliamente en importantes estudios de referencia en la sistemática fúngica, como Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL) (Hibbett *et al.*, 2007; James *et al.*, 2006). Por lo tanto, existe un gran número de secuencias de ADNr de ARNr fúngico en GenBank para la identificación de especies mediante códigos de barras y análisis filogenético (Raja *et al.*, 2017).

Varios estudios de taxonomía y caracterización de hongos Nectriaceos como *Calonectria*, *Cylindrocladiella*, *Ilyonectria* y *Gliocladiopsis* han usado ampliamente la región espaciadora

transcrita interna del nrRNA 5.8S (ITS), la cual permite la identificación molecular de hongos a nivel de género (Crous, Groenewald, Risède, Simoneau, & Nigél, 2004; Crous, Hawksworth, & Wingfield, 2015; Dann *et al.*, 2012; Lombard & Crous, 2012; C. L. Schoch *et al.*, 2000). Esta región junto a otras como la gran subunidad de la citrato liasa ATP (*acl1*), la α -actina (*act*), la calmodulina (*cmdA*), la histona H3 (*his3*), la subunidad grande 28S (LSU), la subunidad más grande de ARN polimerasa II (*rpb1*), la segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II (*rpb1*), el factor de elongación de traducción 1-alfa (*tef1*) y la β -tubulina (*tub2*), permiten una mejor identificación de hongos Nectriaceos a nivel de especie y son usados en análisis filogenéticos, por su especificidad y reducción de la incertidumbre asociada al análisis filogenético que se realiza con un solo locus (Lombard *et al.*, 2012, 2015; Parkinson, 2017; Parkinson *et al.*, 2016).

De la misma manera, en la caracterización molecular de especies de *Fusarium* se han utilizado los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y la secuencia del gen del factor de elongación de la traducción (TEF-1 α), esta última muestra un alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas, cuando se comparan con genes que codifican proteínas como la calmodulina, β tubulina y la histona H3 (Betancourth García, Salazar González, Lagos Mora, Díaz Rodríguez, & Mora Chaves, 2020; O'Donnell, Kistlerr, Cigelnik, & Ploetz, 1998).

Un enfoque molecular usado para caracterizar y realizar filogenia de especies relacionadas de *Fusarium* ha sido el uso de la región espaciadora intergénica (IGS), que separa las unidades de repetición de ADN_r, esta parece evolucionar más rápidamente que cualquier región en las unidades de repetición de ADN_r (Hillis & Dixon, 1991). Las especies estrechamente relacionadas pueden mostrar una divergencia considerable en la región IGS, lo que a menudo refleja variaciones de longitud y secuencia (Hillis & Dixon, 1991). Investigaciones realizadas con la región IGS en *Fusarium* mostraron mayor variación de esta secuencia en comparación con la región ITS (Yli-Mattila *et al.*, 2004). Siendo el análisis RFLP de la región IGS amplificada un ensayo molecular útil para la caracterización y el estudio filogenético de varias especies de *Fusarium* relacionadas (Konstantinova & Yli-Mattila, 2004).

2. Capítulo 2: Frecuencia de hongos Nectriaceos causantes de la pudrición de la raíz y prácticas de manejo utilizadas, en viveros de aguacate del Valle del Cauca.

2.1 Resumen

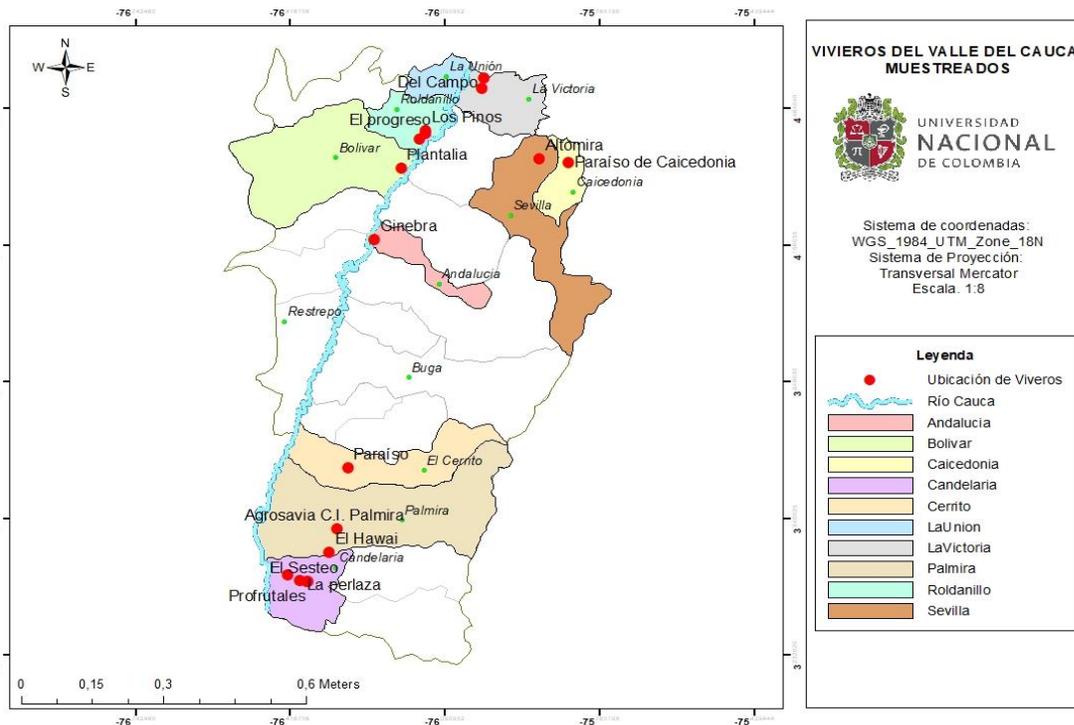
La pudrición de la raíz es una enfermedad devastadora en viveros de aguacate, que ha causado pérdidas comerciales significativas en Colombia (Ramirez & Morales, 2013) y otros países (Besoain & Piontelli, 1999; Boesewinkel, 1982b; Dann *et al.*, 2012; A. Vitale *et al.*, 2012; Zilberstein *et al.*, 2007). Hasta la fecha, no se ha realizado en Colombia un análisis exhaustivo de los géneros Nectriaceos asociados a la marchitez en plántulas de aguacate. En este capítulo se identificaron morfológicamente los hongos Nectriaceos asociados a la pudrición de la raíz de plántulas de aguacate, en viveros del Valle del Cauca, Colombia. Para esto se realizaron muestreos en 16 viveros de aguacate del Valle del Cauca, donde se colectaron muestras de suelos y raíces de 89 plantas con síntomas de flacidez, clorosis, marchitez, necrosis en tallos y raíces de las diferentes variedades de aguacate producidas en los viveros. Se logró la obtención e identificación de 83 aislamientos, determinando una incidencia del 61% de hongos de la familia Nectriaceae, siendo *Cylindrocladiella* el de mayor frecuencia (24%), seguido de *Fusarium* (17%), *Gliocladiopsis* (10%), *Calonectria* (4%), *Campylocarpon* (4%) e *Ilyonectria* (2%). Por otro lado, los Oomycetos mostraron una frecuencia del 13%, siendo *Phytophthora* la de mayor frecuencia con 12% y *Pythium* del 1%. Adicionalmente, se evidencio la importancia de la aplicación de métodos de desinfección que permitan eliminar patógenos que habitan naturalmente en componentes del sustrato como tierra negra, arena y materia orgánica.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Muestreo y localización

Se realizaron visitas a 16 viveros productores y distribuidores de material de propagación de aguacate, registrados ante el ICA, ubicados en diferentes municipios del departamento del Valle del Cauca, como se muestra en la Figura 2-1. En cada vivero se recolectó información de los métodos de desinfección usados para sustratos, semillas y yemas; y se indagó sobre las fuentes empleadas en la preparación de sustratos y su procedencia. Adicionalmente, se firmó un acuerdo de confidencialidad con los viveros, para no afectar su buen nombre al señalar la existencia de patógenos importantes en sus predios. De acuerdo con lo anterior, los viveros se identificaron con números del 1 al 16 (por acuerdo de confidencialidad) como se muestra en la Tabla 2-1, donde se describe la localización de cada uno de los viveros.

Figura 2-1: Viveros de aguacate del departamento del Valle del Cauca muestreados.



Elaborado por: sistema de coordenadas geográficas UNAL. Torres, S.

En cada vivero se recolectaron plantas individuales de diferentes edades con sintomatologías asociadas a flacidez, clorosis, marchitez y plantas asintomáticas. Al momento del muestreo se

realizó una descripción y registro fotográfico de los síntomas encontrados. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de fitopatología de Agrosavia centro de investigación Palmira para el procesamiento y posterior diagnóstico.

Tabla 2-1: Código y localización de los viveros muestreados.

Código	Municipio	Vereda
1	Palmira	No aplica
2	Sevilla	El Venado
3	La Unión	El Palmar
4	Palmira	El Bolo San Isidro
5	Roldanillo	No aplica
6	Candelaria	Villa Gorgona
7	Andalucía	El Salto
8	La Victoria	Holguín
9	Candelaria	Villa Gorgona
10	Roldanillo	Tierra blanca
11	Cerrito	No aplica
12	Caicedonia	No aplica
13	Bolívar	No aplica
14	Candelaria	Villa Gorgona
15	Candelaria	El Carmelo
16	Roldanillo	No aplica

2.2.2 Obtención de aislamientos.

La obtención de aislamientos se realizó a partir de muestras de tejido vegetal afectado y de sustratos de las plantas con síntomas de enfermedad empleando la metodología descrita por Besoain & Piontelli, (1999).

Para el aislamiento de microorganismos patógenos a partir de raíces, se seleccionaron plantas con síntomas de clorosis y marchitez. Se procesaron trozos de raíces de 0,5 cm de largo, con presencia de necrosis. Los trozos fueron desinfectados superficialmente mediante suspensión en hipoclorito al 1% durante 45 segundos, alcohol al 70% durante 1 minuto y 3 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se sembraron en cajas de Petri con agar papa dextrosa acidificado a pH 5,5 (APDA) y agar PDA suplementado con antibióticos y fungicidas (agar papa

dextrosa-PDA 39 g/L, ampicilina 5.000 µg/L, benlate 400 µg/L, rifampicina 200 µg/L, penicilina 8.000 µg/L, PCNB 4000 µg/L, hymexazol 5.000 µg/L, vancomicina 5000 µg /L, polimixina 5000 µg/L, Merteck 300 µl (Marulanda, 2017), como se observa en el anexo A); y se incubaron a 25°C hasta observar crecimiento.

En las plantas con síntomas de enfermedad en donde no se observó crecimiento del microorganismo a partir de la siembra de las raíces, se realizó el aislamiento desde el sustrato, mediante preparación y siembra de diluciones seriadas 1×10^{-3} y 1×10^{-4} ml/g de suelo en medios de cultivo APDA y PDA suplementado con antibióticos (Marulanda, 2017). Los cultivos fueron incubados a 25°C en oscuridad hasta observar crecimiento. Posteriormente, se procedió a aislar colonias individuales para la obtención, identificación y conservación de cultivos puros.

2.2.3 Obtención de cultivos monóspóricos

Con los aislados obtenidos se realizaron cultivos monospóricos, para esto se preparó una solución con Tween 80 al 0,5%; y tubos con agua destilada estéril (ADE) donde se adicionó un disco de 0,5 mm con unidades formadoras de colonia del hongo, de esta suspensión se prepararon diluciones (hasta reducir la concentración de esporas). Se tomaron 10 µl de la suspensión más diluida para siembra por duplicado mediante la técnica de agotamiento con asa de argolla sobre una caja de Petri con PDA más cloranfenicol ($0,01 \text{g.L}^{-1}$). Los cultivos fueron incubados a 25°C hasta germinación de una espora que fue transferida a una nueva caja con medio de cultivo PDA (French & Hebert, 1980).

2.2.4 Identificación morfológica de los aislados

La identificación y caracterización morfológica de los aislados se realizó en el laboratorio de Fitopatología de Agrosavia C.I. Palmira, a partir de cultivos monospóricos previamente obtenidos. La identificación morfológica de los aislamientos se basó en características macroscópicas (crecimiento y color de la colonia) y microscópicas (tipo de micelio y estructuras reproductivas) del cultivo en medio PDA. La identificación a nivel de género se realizó mediante la aplicación de claves taxonómicas de Barnett & Hunter, 1998; Crous, 2002; Drenth & Sendall, 2001.

2.2.5 Análisis estadístico

La información de los microorganismos aislados e identificados se usó junto a los datos de las encuestas para un análisis de frecuencias, donde se determinó microorganismos, síntomas, fuentes de sustratos y métodos de desinfección predominantes. La información registrada en cada vivero, también se usó para realizar un análisis multivariado de correspondencia múltiple (ACM) y Clúster en el programa SAS versión 9.3 (Analytical Software).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Muestreo y obtención de aislamientos

Las visitas realizadas a 16 viveros productores y distribuidores de material de siembra de aguacate, ubicados en el departamento del Valle del Cauca permitieron la colecta de 89 plantas de las variedades de aguacate Hass y Antillano, con síntomas como: flacidez (Figura 2-2 A), clorosis (Figura 2-2 B), marchitez (Figura 2-2 C) y necrosis de raíces (Figura 2-3 B; Figura 2-4 B) en los viveros muestreados.

Figura 2-2: Síntomas observados en plantas de viveros de aguacate del Valle del Cauca. A) Síntoma de flacidez. B) Síntoma de flacidez y clorosis. C y D) síntomas de marchitez y secamiento de hojas.

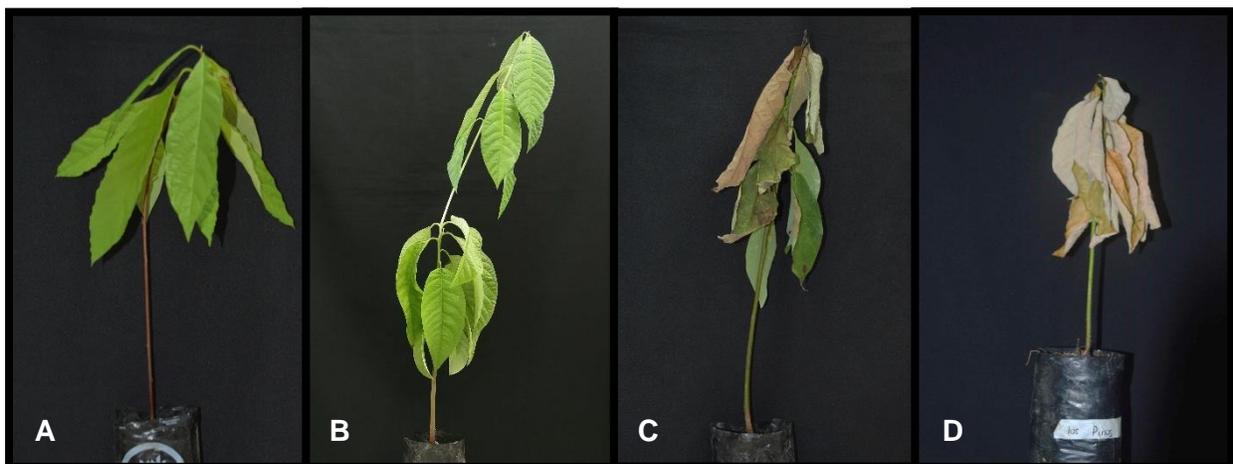
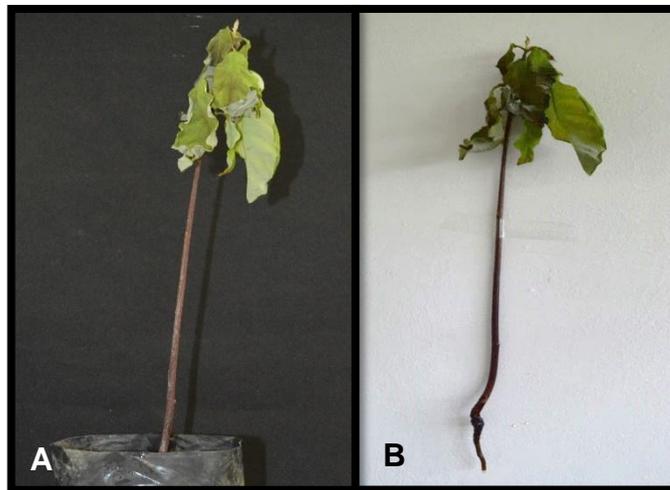


Figura 2-3: Síntoma de marchitez en aguacate Antillano procedente del departamento del Valle del Cauca. A) Síntomas aéreos de marchitez y clorosis general en planta. B) Volumen radical escaso y raíces secundarias necrosadas.



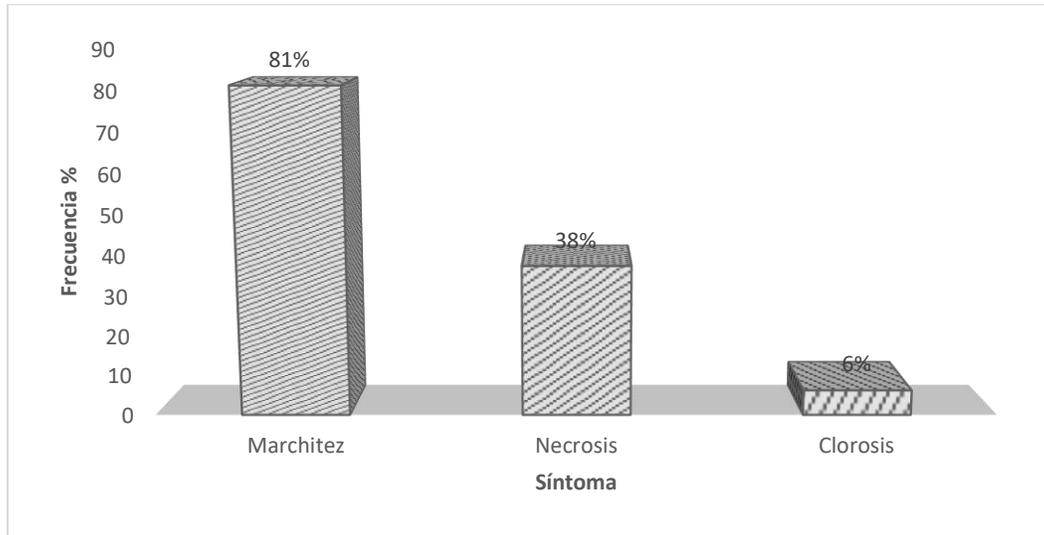
Figura 2-4: Síntoma de marchitez en aguacate Hass procedente del departamento del Valle del Cauca. A) Síntomas aéreos de clorosis, marchitez y secamiento de puntas de hojas. B) Volumen radical escaso y raíz principal necrosada.



El muestreo realizado en los viveros de aguacate corroboró que la marchitez es la sintomatología más frecuente en esta etapa del cultivo, con una frecuencia del 81% (Figura 2-5). Estos resultados son similares a los encontrados por Salтарén *et al.*, (1998), en un estudio realizado en los departamentos del Valle del Cauca, Cauca, Risaralda y Caldas. El proceso patológico de las plántulas afectadas por esta enfermedad es de carácter sistémico, desencadenando otras sintomatologías como, clorosis generalizada y necrosis en raíz, las cuales fueron observadas con frecuencias del 38% y 6% respectivamente, como se observa en la Figura 2-5.

El síntoma de marchitez en plantas de aguacate puede ser causado por múltiples factores, los cuales pueden tener un origen biótico o abiótico (Ciro, Rendón, Navarro, & Gaviria, 2006; Tamayo, 2007). Asimismo, este síntoma no obedece a un patrón que permita discriminar el microorganismo causante. Es decir, que la sintomatología de marchitez ocasionada por hongos Nectriaceos como *Calonectria*, *Ilyonectria* y *Cylindrocladiella* en plántulas de aguacate puede ser fácilmente confundida con la ocasionada por *Phytophthora*. Los microorganismos descritos anteriormente causan flacidez, pérdida de turgencia en hojas, clorosis y necrosis en raíces hasta llegar a ocasionar la muerte tal como se evidencio en los trabajos reportados Dann *et al.*, 2016. La diferencia entre estos dos grupos de microorganismos afectando plantas de vivero, radica en que el progreso de la enfermedad causada por microorganismos Nectriaceos es más lento. Es decir, su proceso infectivo tarda más en comparación con el de *Phytophthora*, premisa que también ha sido descrita por Besoain & Piontelli, (1999). Por lo tanto, es inapropiado hacer diagnósticos basados únicamente en observación de síntomas, lo cual puede conducir a la realización de una práctica costosa e inadecuada de manejo, debido a que los productos usados para el control de microorganismos Oomycetos son a base de mefenoxam, metalaxyl y cimoxanil los cuales no son efectivos en el control de hongos como *Ilyonectria* y otros Nectriaceos (Ramírez & Morales, 2013). Resaltando de esta manera, la importancia de realizar pruebas microbiológicas para identificar los agentes patogénicos que causan esta enfermedad y así realizar un control adecuado de la problemática.

Figura 2-5: Sintomatología más frecuente observada en viveros de aguacate del Valle del Cauca.



2.3.2 Identificación morfológica de los aislados

La colecta de material vegetal afectado por la enfermedad en los viveros del Valle del Cauca permitió la obtención de 83 aislamientos y la identificación de 13 géneros de microorganismos diferentes asociados a las plántulas de aguacate. Entre los géneros identificados se encuentran: *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis*, *Calonectria*, *Campylocarpon*, *Ilyonectria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Lasiodiplodia*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Phytophthora* y *Pythium*. La identificación morfológica de los aislamientos a nivel de género se realizó mediante claves taxonómicas de Barnett & Hunter, (1998); Crous, (2002); Drenth & Sendall, (2001).

Las diferencias morfológicas entre los aislamientos se hicieron evidentes en la caja de Petri, esto permitió distinguir entre los diferentes géneros aislados, como se observa en la Figura 2-6. Las colonias de los aislamientos pertenecientes al género *Cylindrocladiella*, se caracterizaron por presentar micelio blanco de textura afelpada (Figura 2-6 A), con pigmentos difusibles de color amarillo-café en el reverso de la caja. Los aislamientos del género *Gliocladiopsis* presentaron un color de micelio café-rojizo en el centro, amarillo pálido a medida que avanza y blanco hacia las zonas de crecimiento, su textura es afelpada, con bordes ondulados y ausencia de anillos y sectores como se muestra en la Figura 2-6 B. El aislamiento de la Figura 2-6 C pertenece al

género *Calonectria* y presentó una coloración café claro, acompañado de zonas de crecimiento blancas, textura algodonosa invasiva, bordes ondulados y ausencia de anillos y sectores.

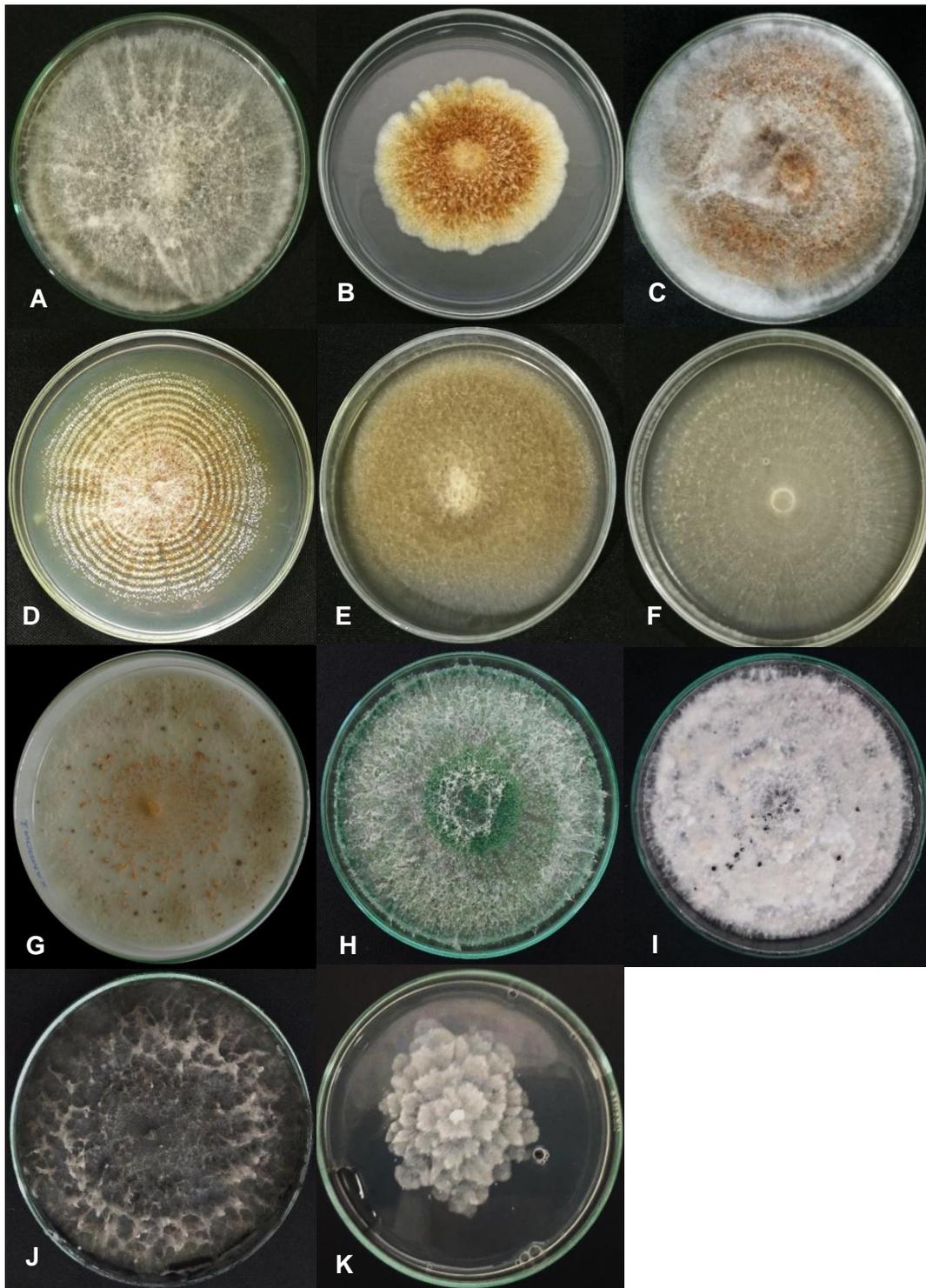
Las colonias del género *Ilyonectria*, mostraron una tonalidad marrón clara en la zona central y tonalidades blancas en su zona de crecimiento, su textura fue afelpada rastrera con presencia de anillos en toda la colonia, como se observa en la Figura 2-6 D. Los aislamientos de *Campylocarpon* sp. presentaron micelio de textura afelpada rastrera, con tonalidades entre el marrón claro y amarillo-oliva, como se muestra en la Figura 2-6 E.

Los aislamientos de *Fusarium* sp. mostraron varias tonalidades de colonia y texturas. En la Figura 2-6 F se muestra una colonia con micelio blanco-crema, textura afelpada rastrera, bordes filamentosos, presencia de anillos y ausencia de sectores. Otra morfología característica de estos aislados fueron las colonias de color blanco-lila, textura algodonosa y bordes filamentosos.

Las colonias de *Colletotrichum* sp. se caracterizaron por presentar un micelio blanco-gris algodonoso, con cuerpos fructíferos de color negro y naranja (Figura 2-6 G). Mientras que *Trichoderma* sp. presentó un micelio de textura algodonosa, inicialmente blanco y posteriormente verde, como consecuencia del proceso de esporulación (Figura 2-6 H).

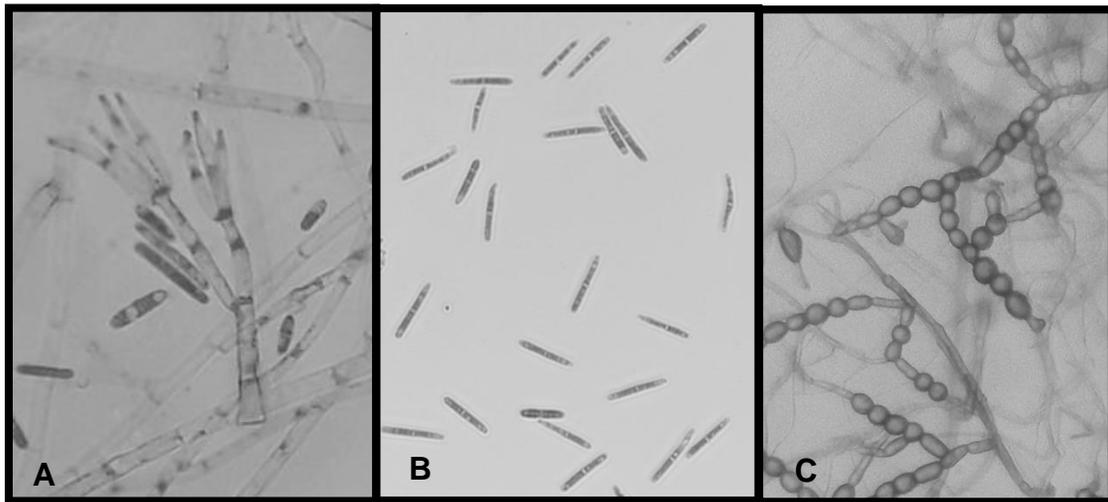
Pestalotiopsis sp. se caracterizó por presentar un micelio blanco de textura algodonosa-granular, con cuerpos fructíferos negros (acérvulos), como se observa en la Figura 2-6 I. Los aislamientos de *Lasiodiplodia* sp. mostraron un crecimiento micelial de tipo algodonoso aéreo y abundante, con colores inicialmente gris-oliva que se oscurece con el paso de los días hasta tornarse totalmente negro (Figura 2-6 J). El patrón de crecimiento observado en aislamientos de *Phytophthora* sp. mostró características morfológicas con colonias de color blanco, en forma de rosa y textura algodonosa (Figura 2-6 K).

Figura 2-6: Morfología de microorganismos aislados en viveros del Valle del Cauca, creciendo en medio de cultivo PDA. A) *Cylindrocladiella* sp. B) *Gliocladiopsis* sp. C) *Calonectria* sp. D) *Ilyonectria* sp. E) *Campylocarpon* sp. F) *Fusarium* sp. G) *Colletotrichum* sp. H) *Trichoderma* sp. I) *Pestalotiopsis* sp. J) *Lasiodiplodia* sp. K) *Phytophthora* sp.



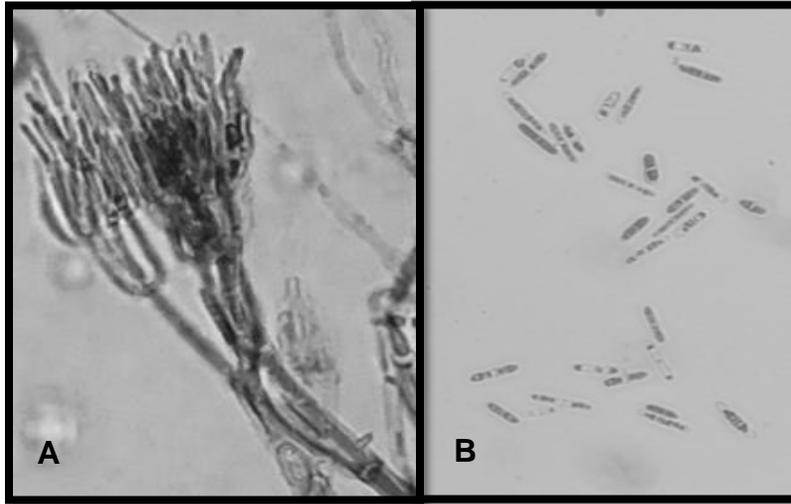
El género *Cylindrocladiella* se caracterizó por presentar conidióforos subverticilados, que terminan en 2 a 4 fiálides (Figura 2-7 A) y producen haces asimétricos de pequeños conidios cilíndricos, típicamente con un solo tabique como se observa en la Figura 2-7 B. Los conidióforos tienen una extensión de estípote aseptada de pared gruesa recta con un tabique basal y una vesícula terminal de pared delgada. Se observaron cadenas de clamidosporas marrones y de pared gruesa. Todas la características descritas son similares a las observadas por Crous, (2002); Lombard *et al.*, (2012) y Rossman *et al.*,(2013) en especies de *Cylindrocladiella*.

Figura 2-7: Estructuras de *Cylindrocladiella* sp.(40x). A) Conidióforo con fiálides. B) Conidios. C) Clamidosporas en cadena.



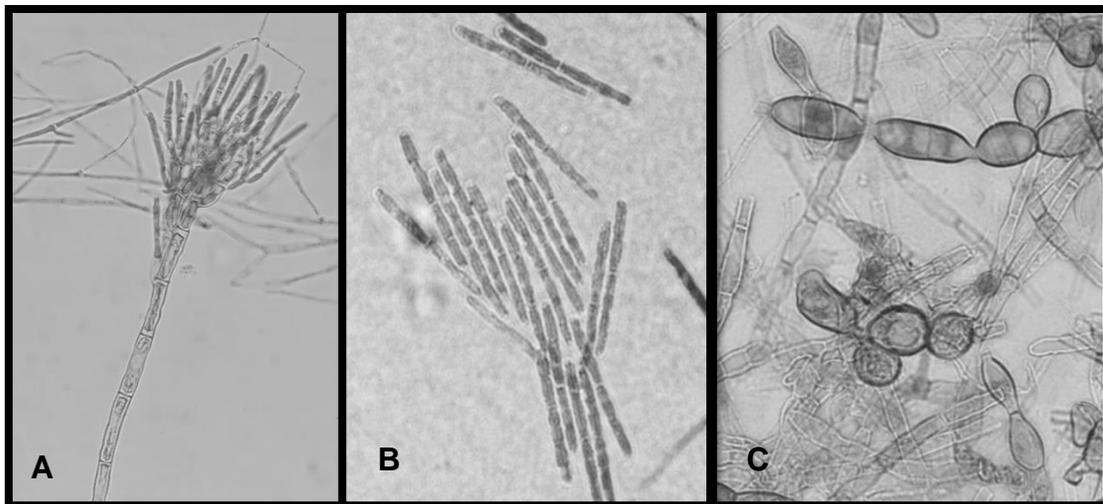
Según Crous, (2002) *Gliocladiopsis* y *Cylindrocladiella* presentan similitudes morfológicas, ya que ambos géneros tienen arreglos de esporas parecidos y ninguno produce microconidias. *Gliocladiopsis* se diferencia por sus densos conidióforos penicilados (Figura 2-7 A) que producen pequeños conidios cilíndricos rectos con un septo (Figura 2-8 B). Es decir, que *Gliocladiopsis* tiene conidióforos con varias series de ramas mientras que *Cylindrocadiella* solo tiene una serie de ramas en los conidióforos (Rossman *et al.*, 2013). Los dos géneros producen cadenas de clamidosporas globosas de color marrón.

Figura 2-8: Estructuras de *Gliocladiopsis* sp.(40x). A) Conidióforos penicilados. B) Conidios.



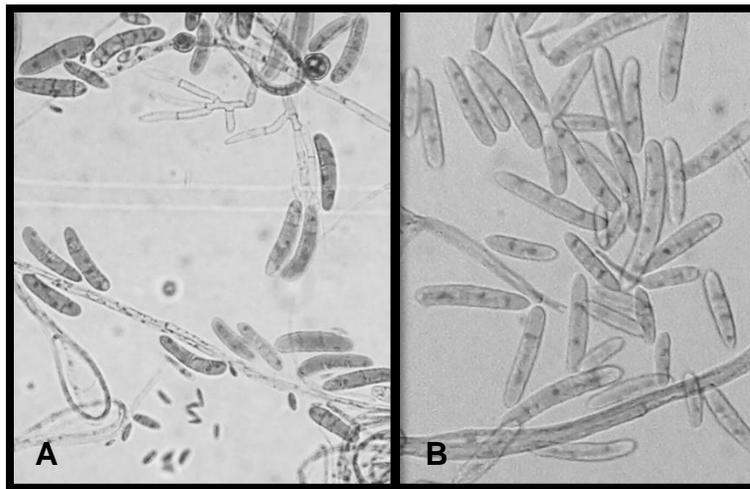
El género *Calonectria* se caracterizó por presentar conidióforos penicilados ramificados, con extensiones de estípites que terminan en vesículas, que producen conidios rectos y cilíndricos con extremos obtusos (Figura 2-9). Los conidios son grandes, rectos y multiseptados con 3 a 6 septos, como se observa en la Figura 2-9 B. Los microconidios de *Calonectria* son cilíndricos entre rectos/curvos entre 1 a 3 septos (Crous, 2002).

Figura 2-9: Estructuras de *Calonectria* sp. (40x). A) Conidióforo penicilado ramificado; B) Conidios; C) Clamidosporas.



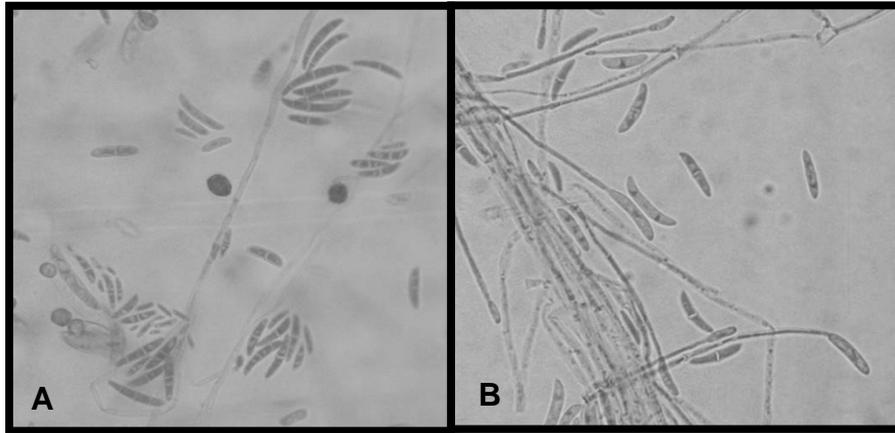
El género *Ilyonectria* sp. se caracterizó por presentar conidióforos simples, no ramificados o escasamente ramificados; ramificado irregular o verticalmente (Figura 2-10 A). Los macroconidios son cilíndricos con bordes redondeados y muestran entre 1 a 3 septos (Figura 2-10 B). Los microconidios son elipsoidales a ovoides y con un septo. Las clamidosporas son parduzcas intercalares, globosas y se agrupan en cadenas (Chaverri *et al.*, 2011; Ulloa & Hanlin, 2000).

Figura 2-10: Estructuras de *Ilyonectria* sp. (40x). A) Conidióforo ramificado vertical, macro y microconidios. B) Macroconidios.



El género *Fusarium*, se caracterizó por presentar hifas septadas, células conidiógenas (monofiálides y polifiálides), macroconidios grandes, encorvados ó en forma de medialuna, con varios septos (Figura 2-11). En algunos aislamientos se observaron microconidios ovalados o reniformes y clamidosporas que se forman aisladas, en pares o cadenas. Las características observadas fueron consistentes con las señaladas por Leslie y Summerell (2006).

Figura 2-11: Estructuras de *Fusarium* sp. (40x). A) Macroconidios y clamidosporas aisladas. B) Monofiálides y macroconidios.



Los hongos del género *Campylocarpon* carecen de microconidios. Sus conidióforos surgen lateralmente de hifas aéreas, individuales o en agregados sueltos o densos; sus macroconidios son cilíndricos levemente curvados hasta con seis septos. Las células apicales y basales de los macroconidios son obtusas; como se observa en la Figura 2-12. Sus clamidosporas son redondas, dispersas o intercalares, típicamente organizadas en grupos de 3 a 5, observaciones que coinciden con la realizadas por Halleen *et al.*, (2004).

Figura 2-12: Macroconidios de *Campylocarpon* sp. (40x).



Los aislamientos de *Colletotrichum* sp. se caracterizaron por presentar conidios cilíndricos gruesos con extremos redondeados como se muestra en la Figura 2-13. Las colonias de *Pestalotiopsis* sp. se caracterizaron microscópicamente por presentar conidióforos hialinos, septados, así como conidios ligeramente curvados que poseían cinco células (con la basal y la terminal hialina y dos o más apéndices como se observa en la Figura 2-14).

Figura 2-13: Conidios cilíndricos de *Colletotrichum* sp (40x).

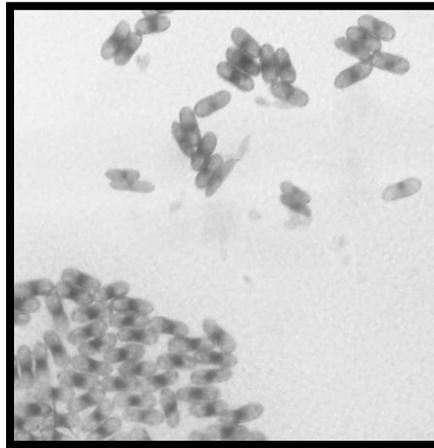
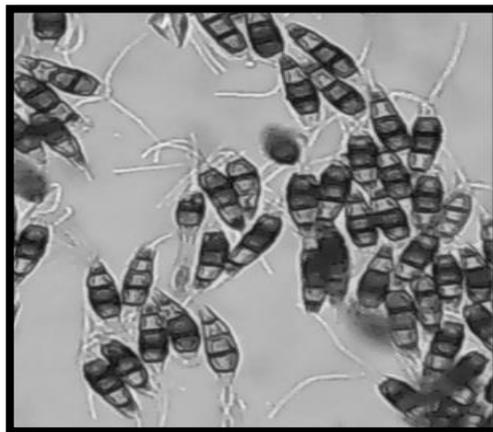
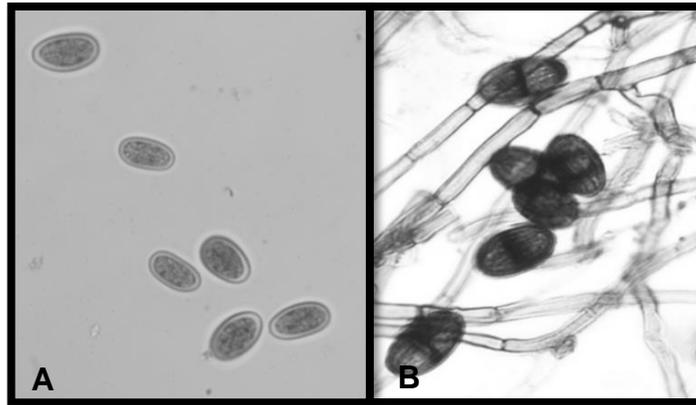


Figura 2-14: Estructuras de *Pestalotiopsis* sp. (40x)



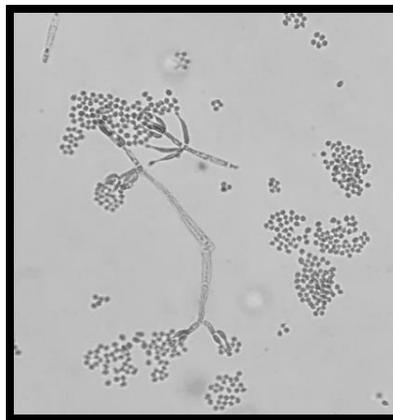
Microscópicamente *Lasiodiplodia* sp. se caracterizó por presentar conidios inmaduros o amerosporas, elipsoidales a subovoides, con pared densa y contenido granular como se observa en la Figura 2-15 A. También se observaron conidios maduros (didimosporas) de color marrón oscuro, elipsoidales a ovoides con estriaciones longitudinales irregulares (Figura 2-15 B).

Figura 2-15: Estructuras de *Lasiodiplodia* sp. (40x). A) Conidios inmaduros, elipsoidales con pared densa. B) Conidios maduros con estriaciones longitudinales irregulares.



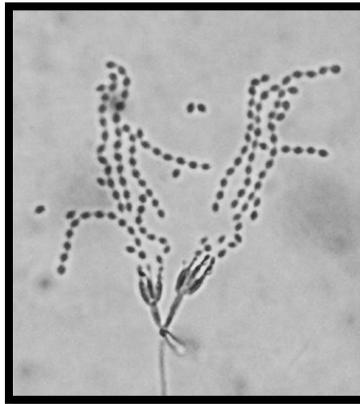
Los aislamientos de *Trichoderma* sp. se caracterizaron por presentar conidióforos ramificados, simulando un árbol pequeño de ramas irregulares que se agrupan de manera piramidal y producen conidios como se observa en la Figura 2-16.

Figura 2-16: Conidióforo y conidios de *Trichoderma* sp. (10x).



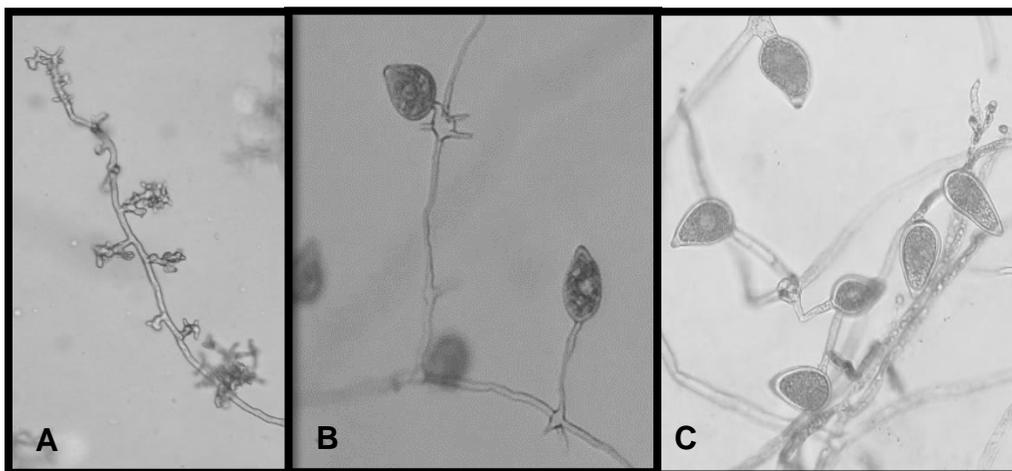
Las colonias de *Paecilomyces* se caracterizaron por un crecimiento pulverulento rosado-grisáceo. Microscópicamente presentó conidióforo erecto, ramificado en el ápice, con fiáldes en forma de botella y conidios agrupados en cadena como se observa en la Figura 2-17.

Figura 2-17: Conidióforo de *Paecilomyces* sp. con microconidios ovales en cadena (10x).



Microscópicamente, *Phytophthora* sp. mostró hifas coraloides sin septos y ramificadas (Figura 2-18 A). En algunos de los aislados se observó crecimiento de esporangios papilados como se observa en las Figura 2-18 B y C, estas características corresponden a diferentes especie de *Phytophthora* de acuerdo con lo descrito por (Drenth & Sendall, 2001).

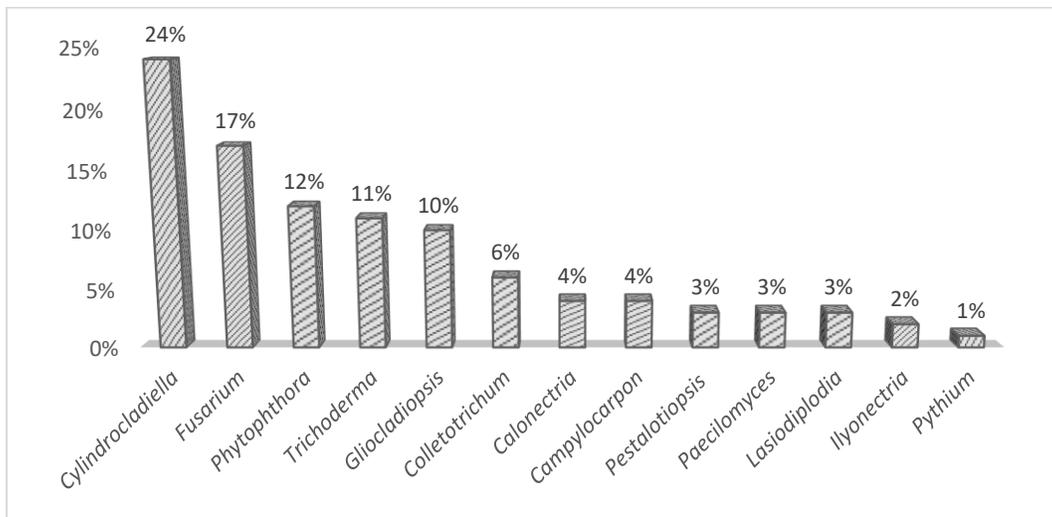
Figura 2-18: Estructuras de *Phytophthora* sp. (40x). A) Hifas coraloides. B-C) Esporangio papilado.



2.3.3 Frecuencia de microorganismos aislados de plantas con pudrición de raíces en viveros del Valle del Cauca, Colombia.

En este estudio el 87% de los aislamientos fueron hongos y el 13% Oomycetos. De los hongos aislados, el 61% pertenecen a la familia Nectriaceae, siendo el de mayor frecuencia *Cylindrocladiella* sp. con un 24%, seguido de *Fusarium* sp. con un 17%, *Gliocladiopsis* sp. con un 10%, *Calonectria* sp. y *Campylocarpon* sp. con un 4% cada uno e *Ilyonectria* sp. con un 2% como se observa en la Figura 2-19.

Figura 2-19: Frecuencia de microorganismos aislados de plantas con síntomas de marchitez en viveros del Valle del Cauca.



Otros hongos como *Colletotrichum* sp. mostraron una frecuencia del 6%, seguido de *Pestalotiopsis* sp. y *Lasiodiplodia* sp. cada uno con un 3%. Estos tres hongos no se consideraron dentro de este estudio, debido a que no pertenecen a la familia Nectriaceae y tampoco se ha demostrado su importancia como causantes de marchitez y muerte en plantas de aguacate. No obstante, estos son patógenos que causan daño al cultivo en otros tejidos de la planta. En el caso de *Colletotrichum* y *Pestalotiopsis*, han sido reportados como causantes de antracnosis y manchas necróticas en frutos y hojas de aguacate (J. Morales, Azpíroz, & Pedraza, 2009). Mientras, *Lasiodiplodia* ha sido reportada principalmente como causante de necrosis en la zona

de injertación, ramas y pedúnculo (Álvarez, 2015). Adicionalmente, se identificó la presencia de hongos antagonicos como *Trichoderma* sp. y *Paecilomyces* sp. los cuales mostraron frecuencias del 11% y el 2% respectivamente. Es importante resaltar que estos últimos dos géneros (*Trichoderma* sp. y *Paecilomyces* sp.) al igual que algunas especies de *Fusarium* se recuperaron a partir de muestras de tejido y suelo de las plantas con síntomas de pudrición de raíces, lo cual coincide con lo reportado por Salterén *et al.*, (1998). Por otro lado, los Oomycetos como *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. mostraron frecuencias del 12% y 1% respectivamente.

En los estudios de la marchitez del aguacate realizados en Colombia no se ha descrito a *Cylindrocladiella* como un microorganismo con alta frecuencia de aparición. Sin embargo, se ha descrito la recuperación de *Cylindrocladium* (*Calonectria*), el cual pueden ser fácilmente confundido con *Cylindrocladiella* y *Gliocladiopsis* (Lombard *et al.*, 2015; Parkinson, 2017), en ausencia de técnicas moleculares que permitan su correcta identificación. Entre los estudios realizados en viveros de aguacate, destaca la evaluación de patógenos radicales realizada por Salterén *et al.*, (1998) en el Valle del Cauca, Cauca, Risaralda y Caldas, donde se identificó un 65% de frecuencia de aparición de *Cylindrocladium* hongo que actualmente se conoce como *Calonectria* y que fácilmente puede ser confundido con otros Nectriaceos. Adicionalmente, Salterén *et al.*, (1998) identificaron altas frecuencias de *Fusarium*, al igual que en este estudio.

Cylindrocarpon (*Ilyonectria*), *Cylindrocladium* (*Calonectria*), *Fusarium* y *Phytophthora* han sido descritos en diferentes departamentos de Colombia como causantes de marchitez en plántulas y árboles de aguacate (Beltran & Rincón López, 2015; Ramírez & Morales, 2013).

En países como Australia, se han reportado aislamientos de *Calonectria* y *Cylindrocladiella* recuperados de raíces enfermas de árboles jóvenes de aguacate que murieron poco después del trasplante a huertos (Dann *et al.*, 2012). Asimismo, *Ilyonectria macrodidyma* e *Ilyonectria destructans* han sido reportadas afectando el cultivo de aguacate en Italia, (A. Vitale *et al.*, 2012) e Israel (Zilberstein *et al.*, 2007) respectivamente. En España López & Melero, (1992) aislaron con frecuencia *Cylindrocarpon* (*Ilyonectria*) y *Fusarium* de raíces con síntomas de necrosis. Estos autores sugirieron que estos hongos reducen el vigor de los árboles y los predisponen a la infección por otros patógenos fúngicos como *Rosellinia necatrix* y *Phytophthora cinnamomi*.

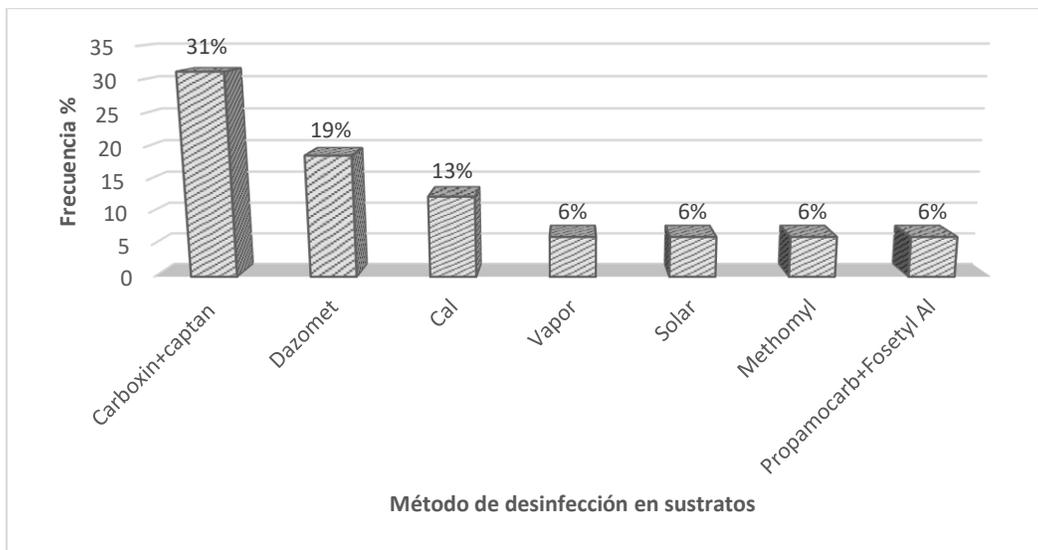
La reducción del vigor en plántulas de aguacate afectadas por hongos Nectriaceos, propicia la generación de infecciones mixtas, como ocurrió en este estudio donde se observaron infecciones

de varios microorganismos como *Calonectria* sp. y *Gliocladiopsis* sp.; *Calonectria* sp. y *Cylindrocladiella* sp., *Gliocladiopsis* sp. y *Cylindrocladiella* sp. ó alguno de los Nectriaceos mencionados anteriormente y *Phytophthora cinnamomi*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dann *et al.*, (2012), quien evidencio infecciones mixtas en sus investigaciones.

2.3.4 Métodos de desinfección y componentes del sustrato utilizados con mayor frecuencia, para la producción de plántulas de aguacate, en viveros del Valle del Cauca.

En esta investigación se identificó que más del 50% de los viveros del Valle del Cauca no emplean ningún método de desinfección para el sustrato, solo el 6% de los viveros emplean solarización o vapor como método de desinfección (Figura 2-20). Posiblemente, la alta frecuencia de microorganismos Nectriaceos identificados en este estudio se deba a la ausencia de métodos de desinfección de los sustratos empleados en la multiplicación de plántulas.

Figura 2-20: Métodos de desinfección del sustrato utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.



Entre los ingredientes activos más usados para la desinfección de sustratos destacan el Carboxin en combinación con Captan, producto utilizado por el 31% de los viveristas, con el fin de eliminar el complejo fungoso de semillas o microorganismos causantes de damping-off como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.*, *Helminthosporium oryzae*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia sp.* y *Sclerotium oryzae*.

Asimismo, se identificó el uso de ingredientes activos como Dazomet (19%) y Propamocarb en combinación con Fosetil aluminio (6%) como se observa en la Figura 2-20. Estos ingredientes activos son empleados en los viveros como método preventivo y de control para *Phytophthora cinnamomi*. Microorganismo que ha sido señalado como el principal agente causal de la pudrición radical del aguacate en Colombia (Ramírez, 2018) y por el cual actualmente se utilizan productos a base de microorganismos antagonistas ó ingredientes activos específicamente dirigidos a su control y erradicación.

De acuerdo con la información brindada por los viveristas también se emplean microorganismos de control biológico, como *Trichoderma sp.* (44%), *Paecilomyces sp.* (13%) y *Bacillus subtilis* (6%), los cuales son aplicados al sustrato. Estos microorganismos no poseen la capacidad de impedir la infección y muerte de los árboles de aguacate afectados por *Phytophthora sp.* (K. G. Pegg, Coates, Korsten, & Harding, 2002). No obstante, se ha señalado que algunas especie de *Trichoderma* tienen la capacidad de afectar las clamidosporas del patógeno y reducen la supervivencia del inóculo en el suelo (H. López, Pérez, Llobel, Monte, & Zea, 1999).

Entre la especies de *Trichoderma* con efecto antagonista sobre *P. cinnamomi* destacan, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. viridae* (Andrade-Hoyos et al., 2017; Casale, 1993; Duvenhage & Kotze, 1993; Finlay & McCracken, 1991; Gees & Coffey, 1989; McLeod, Labuschagne, & Kotze, 1995; E. Morales, Lino, Eddy, & Castellanos, 2020; Reeves, 1975). Adicionalmente, se ha señalado “que la densidad de inóculo del patógeno en los tratamientos con *Trichoderma* puede reducir significativamente con respecto al tratamiento con *P. cinnamomi*. Otros autores encuentran que la incorporación de *Trichoderma* en campo no es efectiva, pudiendo deberse esto a una aplicación inadecuada del antagonista” (Sztejnberg, Freeman, Chet, & Katan, 1987).

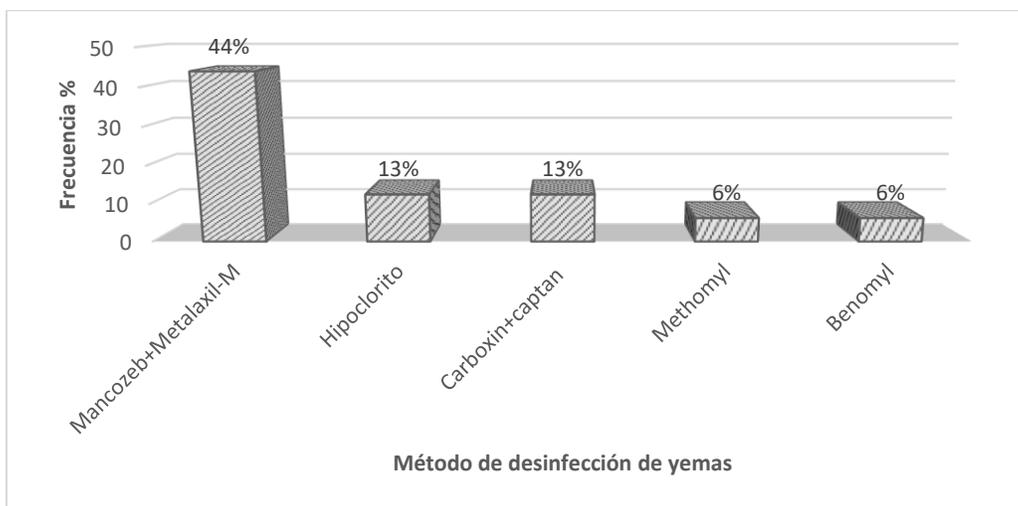
Respecto al efecto que tienen las cepas de *Trichoderma* sobre *Calonectria* son muy pocos los estudios realizados. Sin embargo, una investigación realizada en Italia con diferentes cepas de

Calonectria pauciramosa y *Trichoderma harzianum* T22, señalo que la efectividad de *T. harzianum* T22 para controlar la infección esta inversamente relacionada con su grado de virulencia. Aun así, se determinó que posee una buena actividad antagónica, reflejada en la reducción de microesclerocios y por ende la disminución de la incidencia y la severidad de *Ca. pauciramosa* en viveros (Alessandro Vitale, Cirvilleri, Castello, Aiello, & Polizzi, 2012).

Adicionalmente, *Trichoderma* ha sido descrito como un microorganismo con capacidad aumentar el vigor de las plantas inoculadas sólo con el antagonista, esto se ha contrastado mediante evaluaciones de peso seco de raíces, reportadas por varios autores, “quienes indican que este efecto puede deberse a una eliminación de patógenos menores de la rizosfera o a la existencia de un metabolito liberado por especies de *Trichoderma* que regula el crecimiento de las plantas” (Chang, Chang, Baker, Kleifeld, & Chet, 1986; V. L. Smith, Wilcox, & Harman, 1990; Windham, Elad, & Baker, 1986).

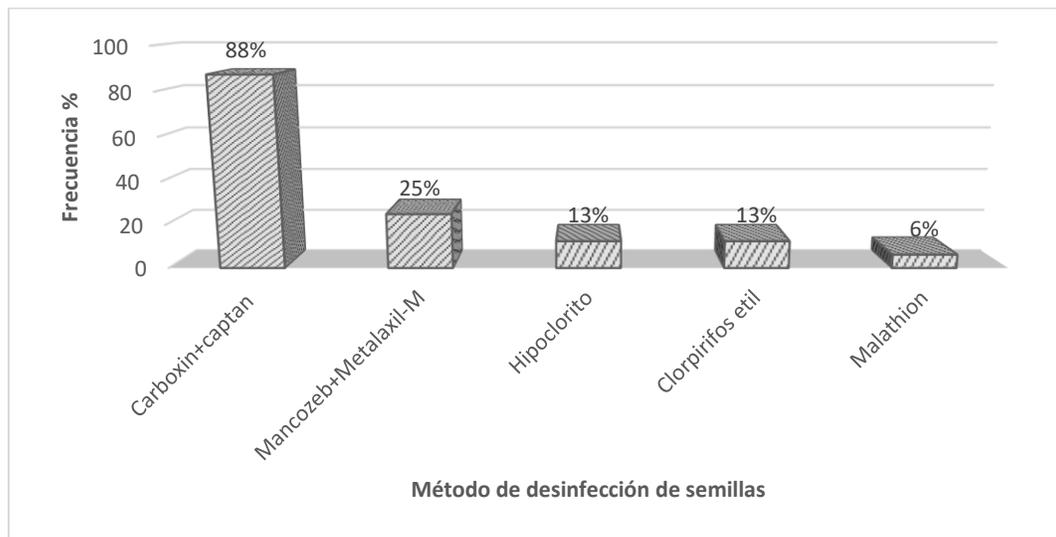
La encuesta realizada en viveros del Valle del Cauca reveló que el producto más frecuente para la desinfección de yemas de aguacate es el Mancozeb solo o combinado con Metalaxil, el cual es utilizado por el 44% y es empleado con el fin de reducir principalmente enfermedades como la pudrición ocasionada por Oomycetos. Otros productos como hipoclorito, Carboxin en combinación con Captán y Benomyl mostraron frecuencias por debajo del 14% (Figura 2-21).

Figura 2-21: Métodos de desinfección de yemas, utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.



En los viveros del Valle del Cauca la desinfección de las semillas se realiza con mayor frecuencia empleando Carboxin en combinación con Captán (88%). Otros productos con uso menos frecuente son, Mancozeb combinado con Metalaxil (25%), hipoclorito (13%), (13%) y Malatión (6%), como se muestra en la Figura 2-22.

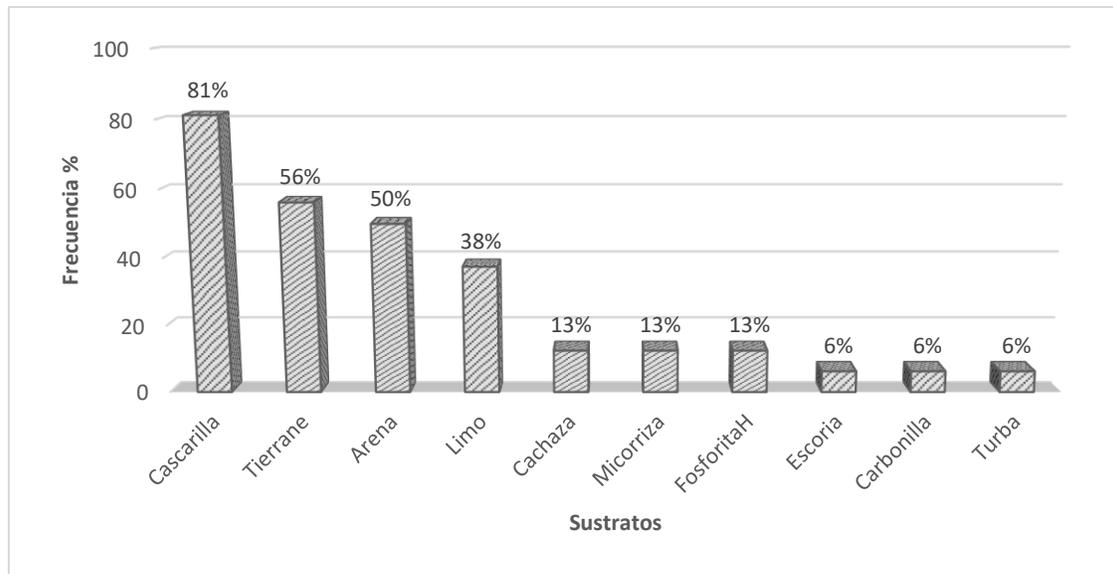
Figura 2-22: Métodos de desinfección de semillas, utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.



En cuanto a la composición de los sustratos utilizados en los viveros, para la producción de plantas de aguacate, se encontró que se utilizan mezclas de compuestos orgánicos y minerales. El 81% de los viveros del Valle del Cauca utilizan cascarilla de arroz, la mayoría no realizar el lavado de esta cascarilla el 56% usan tierra negra con altos contenidos de materia orgánica, el 50% emplean arena gruesa y un 38% limos, procedentes de borde de los ríos. Otros componentes de los sustratos utilizados y que están en menor frecuencia son: cachaza (subproducto de la industria azucarera), micorrizas (distintos géneros y especies), fosforita huila, escoria, carbonillas y turba (Figura 2-23). De acuerdo con la literatura *Calonectria*, *Cylindrocladiella*, *Ilyonectria*, *Gliocladiopsis* y *Phytophthora* han sido señalados por varios autores como habitantes normales de la rizosfera (Besoain & Piontelli, 1999; Chaverri *et al.*, 2011), motivo por el cual es importante resaltar el uso de productos o metodologías de desinfección adecuados para los sustratos. Igualmente, es de carácter trascendental la selección de una proporción adecuada para los componentes del sustrato, evitando la incorporación de

altas cantidades de componentes pesados que impidan el drenaje del agua y la circulación del oxígeno, conduciendo así a la asfixia de la planta ó a la predisposición de infección por patógenos presentes en estos.

Figura 2-23: Componentes del sustrato utilizados con frecuencia en viveros del Valle del Cauca.

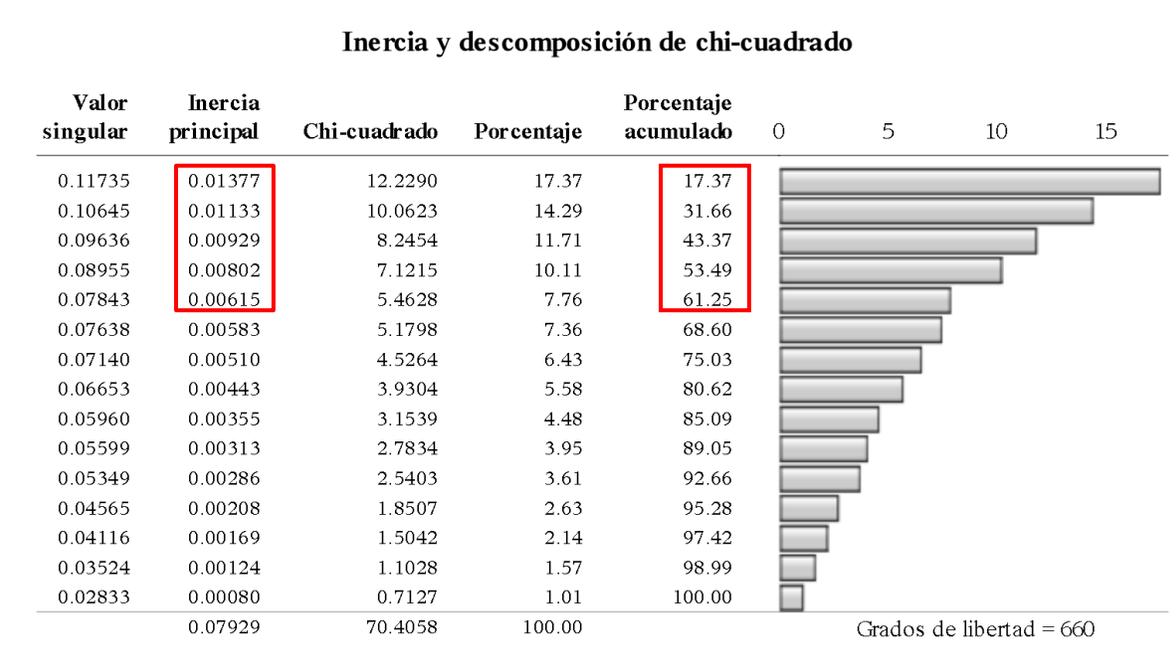


Con la información recolectada de los 16 viveros muestreados se elaboró un análisis de correspondencia múltiple (ACM), con 45 variables entre las que están: los métodos de desinfección usados, componentes de los sustratos, sintomatologías asociadas a las plantas y microorganismos aislados. En la Tabla 2-2 se muestra la descomposición de la inercia total en una tabla de contingencia con 15 componentes. El primer valor de inercia explica el 17,37% de la variabilidad inicial, el segundo valor de inercia representa el 14,29%, el tercero representa el 11,71%, el cuarto representa el 10,11% y el quinto el 7,76% y su acumulado explicarían el 61,25% de la inercia total.

Los valores de inercia determinados para cada variable permitieron seleccionar los de mayor variabilidad descriptiva. En este caso la mayor variabilidad se observó en variables con valores de inercia por encima de 0,03 y se describen de mayor a menor a continuación: limo, necrosis, *Trichoderma*, *Trichoderma* en sustrato, Metalaxil-M combinado con Mancozeb en yemas y

semillas, Carboxin y Captan en sustrato, tierra negra, arena, *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis* y *Phytophthora*. Las variables seleccionadas poseen los más altos valores de inercia, por lo tanto, son las que representan asociaciones más fuertes, además de ser las de mayor contribución al valor total de chi-cuadrado.

Tabla 2-2: Valores de inercia y contribuciones parciales a inercia para los puntos de columna².



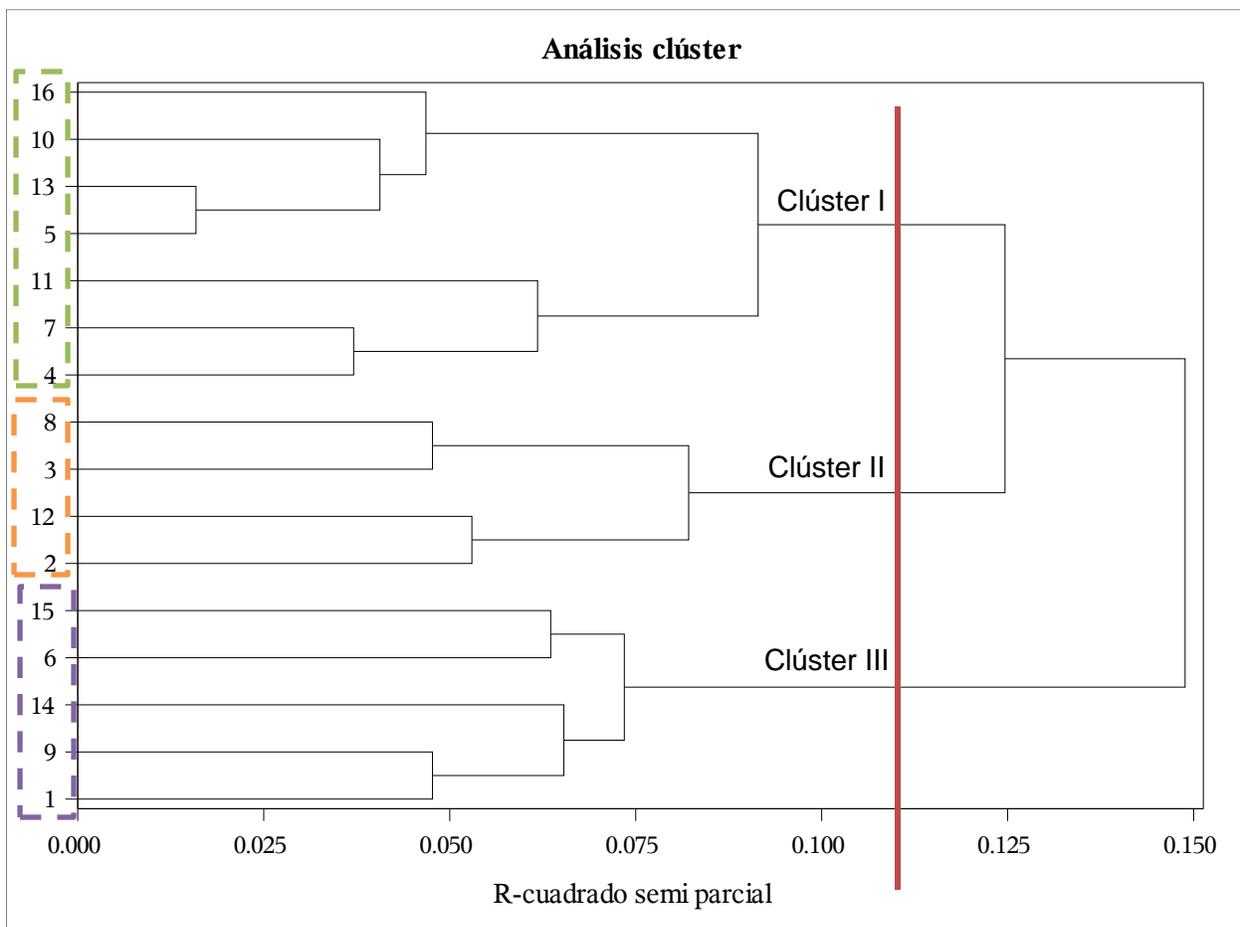
² En rojo se señalan los valores de inercia de mayor contribución.

La información recolectada en los viveros se usó para elaboración de un clúster en el cual se observó la formación de 3 conglomerados que agrupan a los viveros de acuerdo con su nivel de similitud (Figura 2-24). El clúster se realizó utilizando el método de Ward (el vecino más cercano), empleando una distancia del cuadrado de la raíz media entre observaciones de 3,547299. En la Tabla 2-1 se observa el código y la ubicación de cada uno de los viveros agrupados en el clúster.

De acuerdo con la Figura 2-24 el clúster I está formado por 7 viveros (16, 10, 13, 5, 11, 7, 4) cuyas principales características fueron ausencia de *Phytophthora*, lo cual probablemente se deba a la aplicación de *Trichoderma* como agente preventivo contra la multiplicación de estos patógenos. Adicionalmente, se identificó presencia de *Fusarium* la cual es inusual, teniendo en

cuenta que este grupo de viveros utiliza los fungicidas Carboxin y Captan aplicado a los sustratos, semillas y yemas; los cuales actúan en conjunto para afectar la respiración e inhibir la germinación de esporas de *Fusarium sp.* y *Fusarium oxysporum* (Alfonso & Sandoval, 2008). Estos son indicios de un mal manejo a la hora de realizar la aplicación de los productos, probablemente no se están aplicando en las dosis indicadas por el fabricante, lo cual conduce a su aparición.

Figura 2-24: Dendograma de viveros del Valle del Cauca, agrupados de acuerdo con sus principales características³.



³ Obtenido por el método de Ward (el vecino más cercano).

En el clúster I también se identificó presencia de síntomas de marchitez en todas las plantas, uso cascarilla de arroz y ausencia de arena, turba y cachaza en la preparación de los sustratos, ninguno de estos viveros aplica la solarización como método de desinfección de sustratos.

Asimismo, se evidenció la presencia de una amplia variedad de microorganismos como *Ilyonectria*, *Cylindrocladiella*, *Calonectria*, *Colletotrichum* y *Pestalotiopsis*. La aparición de esta gran variedad de microorganismos probablemente se deba a la ausencia de métodos de desinfección que permitan la eliminación específicamente de estos patógenos. En este clúster se puede observar la formación de dos sub-grupos de viveros; un sub-grupo consta de los códigos 16, 10, 13, 5 y posee todas las características descritas anteriormente. El otro sub-grupo está formado por los códigos 11, 7, y 4 los cuales además de presentar las mismas características del primer grupo, presentan características adicionales como el uso de tierra negra y limo en la preparación de sustratos. Esta condición que puede favorecer el desarrollo de microorganismos debido a que el limo es un sustrato pesado que no permiten la aireación teniendo en cuenta que sus partículas son muy pequeñas y se unen estrechamente, limitando los espacios de aire y reteniendo más agua (Rengasamy, 2000).

En el clúster II, se agruparon los 4 viveros (8, 3, 12, 2) con menor diversidad de patógenos probablemente debido al uso de ingredientes activos como Dazomet, empleado en la desinfección de sustratos. Adicionalmente, estos viveros utilizan otros productos de desinfección como Carboxin en combinación con Captan; y Metalaxil-M en combinación con Mancozeb para el tratamiento de las semillas. Otras características importantes de este clúster fueron, uso de arena y tierra negra como componentes del sustrato, ausencia de *Phytophthora*, *Pythium*, *Cylindrocladiella*, *Calonectria*, *Gliocladiopsis* y *Campylocarpon*, lo cual probablemente se deba a la aplicación de los productos mencionados anteriormente, los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos de estos patógenos. Así lo corroboraron Leal, Castaño, & Bolaños, (2014) en un estudio donde se evidencio la reducción de la población de *P. cinnamomi* en un 42% y reducción de la severidad en un 50%, mediante el uso de Metalaxil combinado con Mancozeb y Mancozeb combinado con Fosetil-Al en condiciones de vivero (Leal *et al.*, 2014).

El clúster III agrupa 5 viveros (15, 6, 14, 9, 1) cuyas principales características son presencia de marchitez, ausencia de necrosis, uso de arena y cascarilla como componentes del sustrato. Además, este clúster agrupa los viveros con mayor diversidad en componentes del sustrato, entre estos se encuentran turba, cachaza, limo, escoria y carbonilla. Asimismo, se identificó el uso de los ingredientes activos Carboxin y Captan para desinfección de las semillas, presencia de microorganismos como, *Phytophthora*, *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis* y *Trichoderma*.

3. Capítulo 3: Caracterización morfológica y molecular de hongos Nectriaceos asociados a la pudrición radical en plántulas de aguacate de viveros del Valle del Cauca.

3.1 Resumen

Las pudriciones radicales se han convertido en una de las principales limitantes para el cultivo de aguacate, no solo por las pérdidas ocasionadas, sino también por el desconocimiento de agentes causales lo cual dificulta su manejo. En este capítulo se describe la caracterización morfológica y molecular de 50 aislamientos de hongos Nectriaceos y ocho Oomycetos, generando dos árboles filogenéticos a partir de la extracción de ADN y amplificación de productos de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4. Las secuencias obtenidas se compararon con las registradas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), y se alinearon usando Clustal W, se estimaron las relaciones filogenéticas con el programa MEGA 6 con el coeficiente de máxima verosimilitud. Las características morfológicas más determinantes para identificar los aislamientos fueron la forma de las esporas, el tamaño y la velocidad de crecimiento de los aislados. Además, se determinó que los mejores medios de cultivo para multiplicación de hongos Nectriaceos son agar Spezieller Nährstoffarmer más extracto de levadura y agar glucosa asparagina. Los resultados de la secuenciación y filogenia permitieron la identificación de especies de importancia económica como, *P. cinnamomi*, *P. heveae*, *Calonectria* sp., *Cylindrocladiella peruviana*, *Ilyonectria destructans* y *Pleiocarpon algariense*; reportadas en la literatura como causantes de marchitez en viveros de aguacate.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados en tres medios de cultivo diferentes.

La evaluación de la tasa de crecimiento de los hongos Nectriaceos aislados e identificados previamente, se realizó en tres medios de cultivo: Agar papa dextrosa (PDA), agar glucosa asparagina (GA) suplementado con microelementos (Mn, Zn, y Fe) y vitaminas (tiamina y biotina) y agar Spezieller Nährstoffarmer más extracto de levadura (SNAY); (En el anexo A se puede ver la descripción de los componentes de los medios).

Cada aislamiento se evaluó en dos medios de cultivo diferentes. En el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) fueron evaluados todos los aislados. En el medio de cultivo agar glucosa asparagina (GA) se evaluaron y caracterizaron los hongos identificados como *Calonectria*, *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis* y *Campylocarpon*; este medio fue reportado como el medio ideal para la multiplicación y producción de estructuras de los géneros descritos (Hunter, 1970). Por otro lado, los aislados identificados como *Ilyonectria* y *Fusarium* fueron evaluados en Agar Spezieller Nährstoffarmer más extracto de levadura (SNAY), este último medio seleccionado de acuerdo con Brayford, (1993).

El procedimiento consistió en sembrar discos individuales de 0,5 cm de diámetro en cada una de las cajas con medio de cultivo, los cuales fueron tomados del margen de una colonia pura de ocho días después de la siembra. Cada disco se sembró en el centro de la caja Petri de 8,2 cm de diámetro con los medios de cultivo PDA, GA o SNAY (tres réplicas por cada medio de cultivo ó seis cajas por cepa). Las cajas se sellaron y se incubaron a 27°C en oscuridad, durante 12 días; las mediciones se realizaron cada 24 horas teniendo en cuenta el crecimiento del diámetro de la colonia y midiendo cada día con una regla graduada en cm, el avance del micelio en la caja de Petri durante 12 días continuos. La tasa de crecimiento por día (cm/día) se determinó mediante la ecuación usada por Benítez, Bentley, Bustamante, Sánchez, & Corrales, (2007):

$$TC = \frac{Cf - Ci}{Tf - Ti} \quad (1)$$

Dónde:

Cf: Crecimiento diametral final expresado en cm

Ci: Crecimiento diametral inicial (día uno) expresado en cm

Tf: Tiempo final en el que termina el crecimiento fúngico (día final)

Ti: Tiempo inicial (día uno)

3.2.2 Caracterización morfológica de los aislados

La caracterización morfológica de los hongos Nectriaceos identificados (Tabla 3-4), se realizó en medio de cultivo PDA más cloranfenicol (0,01g.L⁻¹), teniendo tres réplicas por aislado y evaluando características macroscópicas como, aspecto del micelio, margen de la colonia, color anverso–reverso (tabla de Munsell para tejidos vegetales, referencia SKU M50150), formación y posición de los anillos y presencia ó ausencia de sectores. Para las características microscópicas se utilizó una cámara digital DS-Ri2 adaptada un microscopio Nikon ECLIPSE Ci-L, evaluando el tamaño de las esporas, mediante determinación del largo y el ancho de 30 esporas por cada uno de los aislamientos, en el objetivo de 40X (Herder, 2014 modificada). Las mediciones se realizaron a partir de imágenes procesadas en el software NIS-Elements D versión 5.20.02.

Se midió la concentración de esporas producidas 12 días después de la siembra de los aislados. Para esto se realizaron suspensiones de esporas mediante adición de 9 ml de agua destilada estéril que contenía 0,5 ml de Tween 80 al 0,01% a cada caja de Petri, posteriormente cada caja se raspo y se filtró con gasa estéril para obtención de la solución a la cual se le determinó la concentración de esporas mediante recuento en cámara de Neubauer, utilizando la fórmula que se describe a continuación:

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} = \text{Número de esporas} * \text{Factor de la camara} * \text{Factor de dilución} \quad (2)$$

El factor de la cámara empleado fue de 10.000 para cuadrados principales y 250.000 para cuadrados secundarios y el factor de dilución se empleó solo en soluciones muy concentradas.

3.2.3 Identificación molecular de cepas

La identificación molecular de los aislados se realizó en el laboratorio de biotecnología de Agrosavia C.I Palmira. La extracción de ADN genómico se realizó con el protocolo descrito por Raeder & Broda (1985), con algunas modificaciones.

3.2.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico el micelio se raspo de la superficie de colonias crecidas en agar PDA más cloranfenicol ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), incubadas a 25°C en oscuridad durante 15 días, este micelio cosechado se almaceno a -40°C hasta la extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó usando el protocolo de Raeder & Broda, (1985) mediante macerado y homogenización del micelio con $500 \mu\text{l}$ de buffer de extracción (Tris 100mM , EDTA 10 mM , SDS 1%) y se depositó en un tubo eppendorf de $1,5 \text{ ml}$ estéril. Se incubó a 65°C durante una hora e invirtió el tubo 5 veces. Se adicionaron $500 \mu\text{l}$ de fenol cloroformo alcohol isoamílico (24:24:1) y mezcló por inversión 5 minutos; luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos, se rescató el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo. Posteriormente, se agregaron $500 \mu\text{l}$ de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inmersión durante 5 minutos y centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos, se rescató la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionaron $50 \mu\text{l}$ de acetato de sodio 3M pH $5,2$ y $800 \mu\text{l}$ de etanol absoluto frío; la solución se dejó precipitando durante toda la noche a -20°C . Se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante, se secó el pellet en cabina de flujo laminar una hora a temperatura ambiente y se diluyó en $30 \mu\text{l}$ de agua/ARNasa (10 mg/mL) e incubo a 37°C por una hora y se almacenó a -20°C . El ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al $1,4\%$ (P/V) teñido con GelRed (Biotium) $13,3\text{X}$ adicionado a la muestra, usando un fotodocumentador de geles Enduro GDS (Labnet). La calidad del ADN se determinó mediante cuantificación por espectrofotometría haciendo uso de un NanoDropTM 1000 (ThermoScientific) analizando las relaciones de absorbancia $260/260$ y $260/230$.

3.2.5 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar las amplificaciones por PCR se realizaron soluciones de trabajo de ADN total en concentraciones de $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$. El ADN genómico extraído se usó como molde para realizar la amplificación por PCR de la región ITS1-5.8s-ITS2 que codifica para el ARNr,

utilizando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Cada reacción se realizó con 20 ng/μL de ADN genómico, 1X de Taq Buffer con KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μM de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa (recombinante) (Thermo Scientific), para un volumen final de 25 μL. La PCR se realizó en un termociclador Agilent SureCycler 8800, utilizando las siguientes condiciones: Un ciclo de denaturación inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, un alineamiento a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos. Los fragmentos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1,4% teñidos con GelRed 13,3X y corridos en buffer TBE 0,5X a 80 V, 400 mA, por 40 minutos.

3.2.6 Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR –ITS, se enviaron para secuenciación directa en ambas direcciones mediante el sistema Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) en un secuenciador ABI Prism 3730XL (PE AppliedBiosystems) de la compañía Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas de 55 aislamientos de hongos y ocho de Oomycetos amplificados con las regiones ITS1 e ITS4 en los sentidos forward y reverse se limpiaron haciendo uso del software Geneious versión 2020.2.1 y se compararon contra secuencias de la base de datos GeneBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente, se ejecutó un mapeo de los cebadores para realizar corte de los fragmentos y se confirmó la identidad nucleotídica del consenso. Posteriormente, se alinearon con el algoritmo Clustal W (Thompson, *et al.*, 1994) las secuencias obtenidas, junto con las secuencias ex tipo (Anexo D y E) reportadas en literatura (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013). Las relaciones filogenéticas de los dos árboles se realizaron con el programa MEGA 6 usando el coeficiente de máxima verosimilitud (Maximum likelihood), se utilizó Kimura-2 parámetros con distribución gamma y deleciones parciales como modelo de sustitución de bases para el sub-set de datos de hongos Nectriaceos y Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con distribución gamma en todos los sitios para el sub-set de datos de Oomycetos. La confiabilidad de los árboles se estimó con el método Bootstrap con 1000 repeticiones. Se usó *Penicillium chrysogenum* (EU862195) como grupo externo para el análisis filogenético de los hongos Nectriaceos de manera similar a Watanabe *et al.*, (2011); y *Saprolegnia*

parasítica (AB217688.1) como grupo externo, para el análisis filogenético de *Phytophthora* de manera análoga a lo trabajado por Villa, Kageyama, Asano, & Suga, (2006).

3.2.7 Análisis estadístico

Para la evaluación del crecimiento de los aislados en los tres medios de cultivo se realizó un diseño factorial, con dos tratamientos (dos medios de cultivo por cada aislado), 50 aislados y tres repeticiones. Se realizó un ANOVA para determinar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos y una regresión lineal para determinar el crecimiento promedio en cm por día. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Scheffé con una significancia del 0,05% con el programa SAS versión 9.3 (Analytical Software). La variable de respuesta establecida fue el diámetro de crecimiento fúngico en centímetros, la cual fue transformada a tasa de crecimiento (Tc) mediante la fórmula utilizada por Benítez *et al.*, (2007) y posteriormente usada en el análisis de varianza.

Los datos obtenidos en la caracterización morfológica se usaron para realizar un análisis de frecuencias y un CLÚSTER para agrupar los aislamientos de acuerdo con características comunes.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados en dos medios de cultivo diferentes.

El análisis de varianza realizado con la variable de tasa de crecimiento (Tc) de 50 aislados evaluados en tres medios de cultivo diferentes (PDA, GA, SNAY), permitió identificar diferencias altamente significativas entre los aislados (Tabla 3-1) y los medios de cultivo evaluados, resultado que fue corroborado mediante comparación de medias con prueba de Scheffé, donde se observa la formación de dos grupos diferentes A y B (Tabla 3-2). En el grupo A se encuentran los medios GA y SNAY, medios en el que se observaron mayores tasas promedio de crecimiento en comparación con el grupo B donde se encuentra el medio PDA. Es decir, que la tasa de crecimiento de los aislamientos evaluados es mayor en medios de cultivo como agar glucosa asparagina ó agar Spezieller Nährstoffarmer más

extracto de levadura (SNAY). Estos medios de cultivo seleccionados como los mejores para la multiplicación de microorganismos Nectriaceos poseen componentes fácilmente disponibles (Anexo A) y su naturaleza transparente favorece la visualización directa a través de un microscopio compuesto. Además, de ser medios óptimos para la esporulación de los microorganismos estudiados (Leslie & Summerell, 2006; Lombard *et al.*, 2009).

Tabla 3-1: Análisis de varianza de la tasa de crecimiento de 50 aislados evaluados.

Análisis de varianza					
Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Aislamientos	50	4.75362000	0.09507240	9.05	<.0001
Error	49	0.51498400	0.01050988		
Total, corregido	99	5.26860400			

Tabla 3-2: Prueba de Scheffé y agrupamiento de medios usando la variable tasa de crecimiento.

Medio	Media	Agrupamiento
GA/SNAY	0.8118	A
PDA	0.7310	B

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con Scheffé (0,05)

La regresión lineal del diámetro de colonia en dos medios de cultivo diferentes permitió determinar un modelo lineal del diámetro promedio de crecimiento de los aislados en los medios GA y SNAY, los cuales evidenciaron mayores diámetros de colonia a lo largo de los días y presentaron un modelo con mejor ajuste con un R² de 0,75, en contraste con el PDA cuyo R² fue de 0,74. Adicionalmente, el modelo de regresión elaborado con las variables mostró diferencias altamente significativas (Tabla 3-3), lo cual permite validar el

modelo descrito a continuación: $Y_i=1,23369+0,77577*(X_i)$. Donde Y_i = día de evaluación del crecimiento y X_i = diámetro de colonia en el medio GA ó SNAY; con este modelo se explica que por cada día en el medio GA ó SNAY la colonia crecerá en promedio 0,7cm, siendo estos los mejores medios para la multiplicación de hongos Nectriaceos. Para el caso de *Ilyonectria* y *Fusarium* corresponden al medio SNAY y para el caso de *Cylindrocladiella*, *Calonectria*, *Gliocladiopsis* y *Campylocarpon* corresponde al medio GA. Por otro lado, en el medio PDA el crecimiento promedio fue de 0,3 cm/día.

Tabla 3-3: Modelo de regresión seleccionado para la evaluación del crecimiento de Nectriaceos en dos medios de cultivo diferentes.

Variable	Estimación de parámetros	Error estándar	Tipo II SS	Valor F	Pr > F
Intercept	1.23369	0.14176	225.22338	75.74	<.0001
PDA	0.33550	0.08785	43.36919	14.58	0.0001
GA/SNAY	0.77577	0.08707	236.07031	79.39	<.0001

En la figura 3-1 y 3-2 se observan gráficos de la evolución temporal del crecimiento de diez aislados de diferentes géneros seleccionados para comparar su velocidad de crecimiento en los diferentes medios evaluados. Permitiendo evidenciar que en el medio GA y SNAY algunos microorganismos con mayor tasa de crecimiento de colonia, como *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Cylindrocladiella lageniformis*, logran la colonización completa de la caja al octavo día de haber sido sembrados (Figura 3-1). Mientras, en el medio PDA la colonización completa de la caja de estos mismos aislados se logra entre el noveno y décimo día, es decir 24 a 48 horas después (Figura 3-2). Asimismo, se pudo observar que las colonias de los géneros *Calonectria*, *Ilyonectria* y *Gliocladiopsis* no lograron la colonización completa de la caja durante los 12 días de evaluación del crecimiento, poniendo en evidencia una menor tasa de crecimiento para estos microorganismos, como se observa en la Tabla 3-4. En el anexo B se describe la tasa de crecimiento obtenida en los aislamientos de *Phytophthora* evaluados.

Figura 3-1: Evolución temporal del diámetro de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas en medio GA y SNAY.

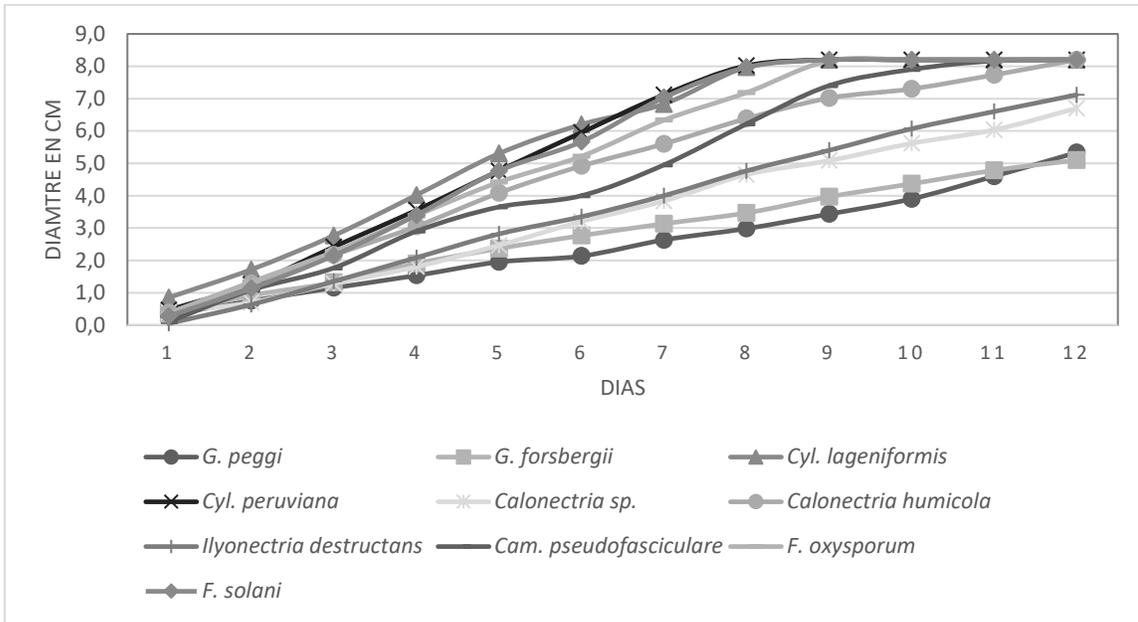


Figura 3-2: Evolución temporal del diámetro de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas en medio PDA.

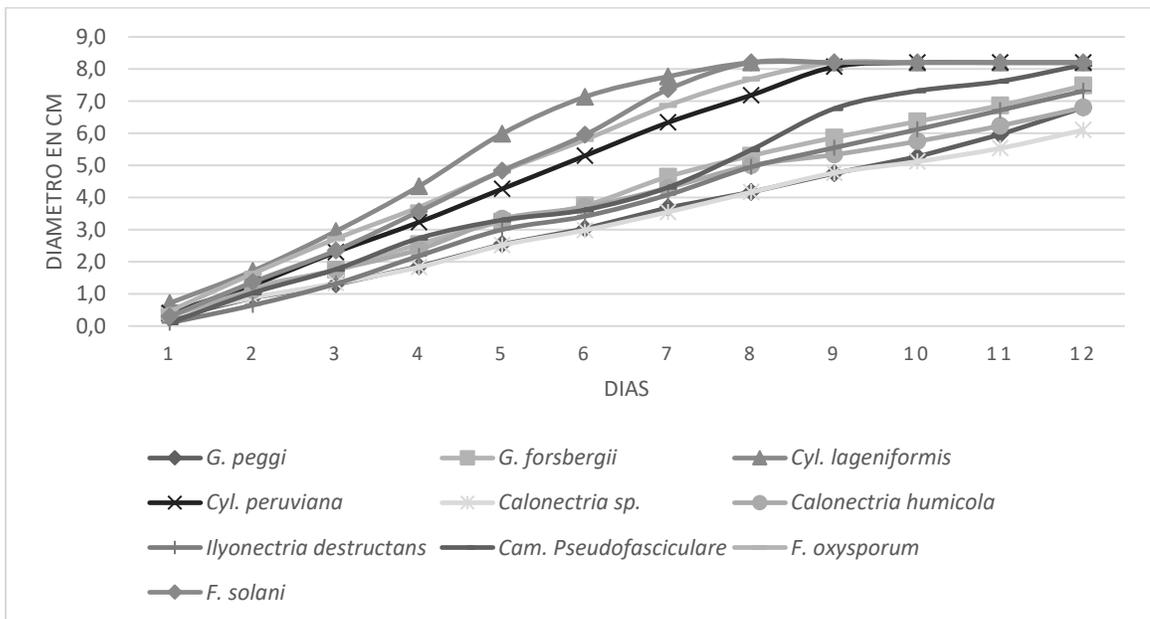


Tabla 3-4: Tasa de crecimiento de microorganismos evaluados en dos medios de cultivo diferentes.

Código	Microorganismo	Tasa de crecimiento en PDA	Tasa de crecimiento en GA	Tasa de crecimiento en SNAY
Elpro3CLA	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	0,68	0,69	NA
Jug4CAR	<i>Pleioconium algeriense</i>	0,35	NA	0,55
Para2CAR	<i>Ilyonectria destructans</i>	0,64	NA	0,66
Para3CLAA	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	0,69	0,95	NA
Para3CLAB	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	0,85	0,95	NA
Para3FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,87	NA	0,97
Para5CLAA	<i>Calonectria</i> sp.	0,29	0,66	NA
Para5CLAB	<i>Calonectria humicola</i>	0,71	0,59	NA
Parca3FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	1,01	NA	1,10
Parca4CAR	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,92	NA	0,93
Parca4Fu	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,92	NA	1,47
Per1CLAA	<i>Cylindrocladiella microcylindrica</i>	0,63	0,96	NA
Per6CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	0,44	0,55	NA
Pi1CAR	<i>Fusarium falciforme</i>	0,64	NA	0,71
Pi3FU	<i>Fusarium falciforme</i>	1,12	NA	1,12
Pi4FUb	<i>Fusarium falciforme</i>	1,10	NA	1,07
Pi6FU	<i>Fusarium keroplasticum</i>	0,80	NA	1,12
Plaum01	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	0,50	0,42	NA
Plaum02	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,70	0,71	NA
Plaum03A	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,72	0,71	NA
Plaum03B	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,97	0,87	NA
Plaum05A	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,86	0,69	NA
Plaum05B	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,96	0,86	NA
Plaum06A	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	0,89	1,00	NA
Plaum06B	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	0,74	NA	0,73
Plaum07	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	0,81	NA	0,73
Plaum08A	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	0,92	1,07	NA
Plaum08B	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	0,28	0,35	NA
Plaum09	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	0,73	NA	0,74
Plaum10	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,68	0,75	NA
Plaum11	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,75	0,93	NA
Plaum12	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,64	0,85	NA
Plaum13	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	0,62	0,53	NA
Plaum14	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,65	1,02	NA
Plaum15	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	0,83	0,81	NA
Plaum16	<i>Calonectria</i> sp	0,57	0,53	NA
Pluam04B	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,87	0,71	NA
Profru3FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	0,89	NA	1,00
Profru5CLA	<i>Gliocladiopsis curvata</i>	0,34	0,43	NA
Profru6FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	0,99	NA	1,12
Ses1CLA	<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	0,39	0,44	NA
Ses2CLA	<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	0,47	0,57	NA
Sofru1CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	0,46	0,60	NA
Sofru3CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	0,53	0,60	NA
Viarro1CAR	<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	0,43	0,65	NA
Viarro3FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	0,99	NA	0,99

Código	Microorganismo	Tasa de crecimiento en PDA	Tasa de crecimiento en GA	Tasa de crecimiento en SNAY
Viarro4CLA	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	0,75	0,90	NA
Viarro4FU	<i>Fusarium solani</i>	0,99	NA	1,13
Viarro6FU	<i>Fusarium falciforme</i>	0,98	NA	1,11
Viarro8FU	<i>Fusarium solani</i>	0,99	NA	0,99

3.3.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica permitió determinar los rasgos más usuales en los aislados, siendo las texturas afelpadas (70%) más frecuentes que las algodonosas. El color de micelio blanco predominó en el anverso de las colonias (94%); mientras el color marrón oscuro predominó en el reverso (52%) de las colonias; otras tonalidades frecuentes fueron el amarillo (26%) y el marrón rojizo (24%) como se observa en el anexo C, donde se describen las características morfológicas de algunos aislados.

El patrón de esporulación más común fue la formación de anillos sobre toda la colonia (56%). En cuanto a las formas de las esporas, predominaron los macroconidios cilíndricos rectos con extremos obtusos (62%) y los tamaños entre 5 y 13 μm de largo, con anchos entre 0 y 3 μm . El 50% de los aislamientos lograron colonización de la caja de Petri antes de los 12 días y el 50% restante estuvo por encima de los 12 días.

El dendograma elaborado con las características morfológicas de 50 aislados recuperados de plantas con síntomas en viveros del Valle del Cauca, permitió la formación de dos clúster (Figura 3-3). Como criterio de selección de clúster se usó el vecino más cercano, mediante análisis del historial de conglomerados combinados en cada etapa (Tabla 3-5). El historial permite determinar las distancias entre los conglomerados que se combinan (coeficientes), identificando en este caso las distancias más grandes entre los coeficientes de las últimas etapas del historial de clúster, lo cual permite determinar una solución mínima de dos clúster y máxima de cinco como se observa en el dendograma (Figura 3-3).

Tabla 3-5: Historial de clúster con coeficientes de conglomerados combinados.

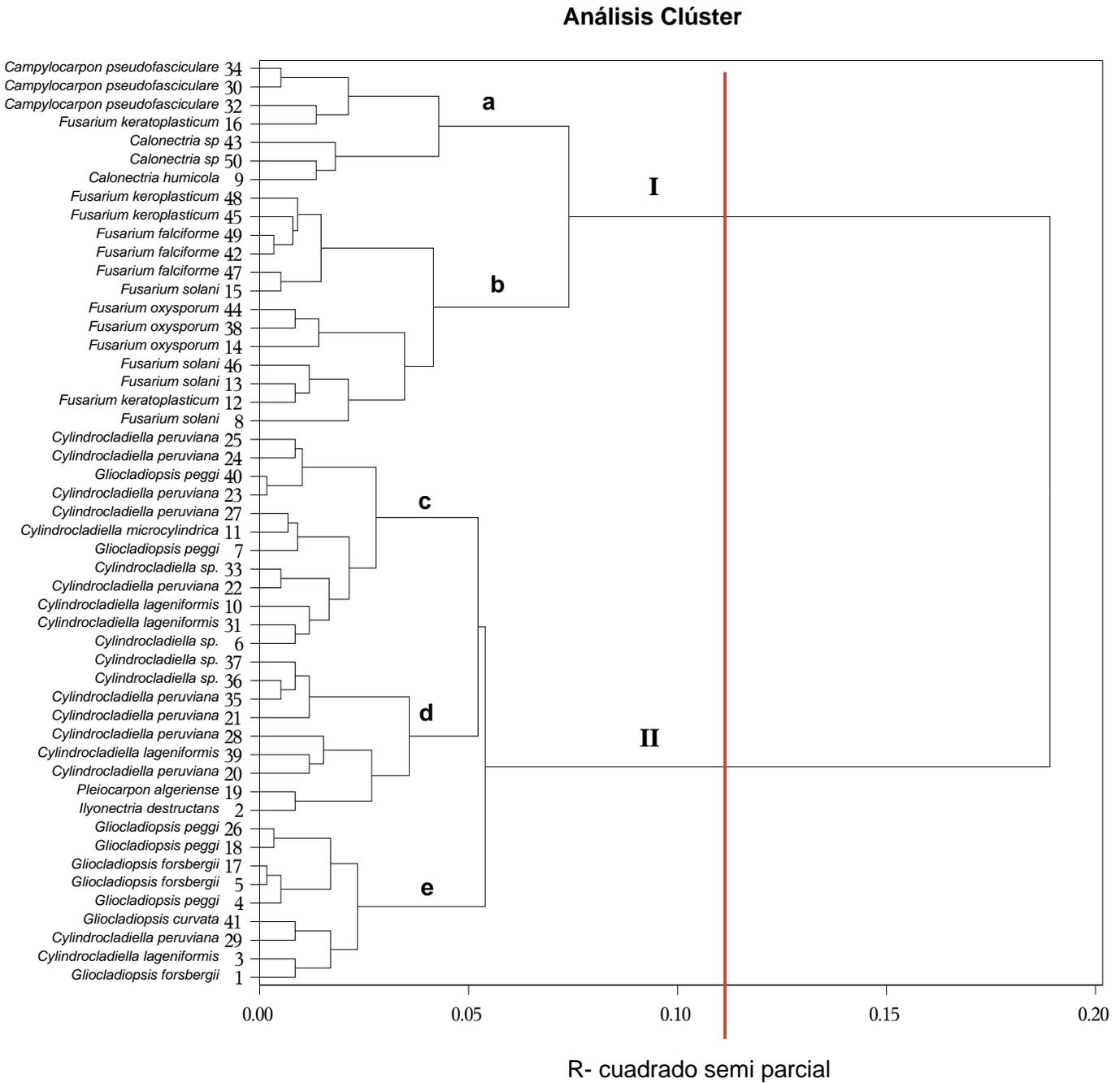
Historial de clúster								
Número de clústers	Clústeres unidos		Frec	R-cuadrado semiparcial	R-cuadrado	Estadístico pseudo F	T-cuadrado pseudo	Enlace
49	5	17	2	0.0017	.998	12.3	.	T
48	23	40	2	0.0017	.997	12.5	.	
47	18	26	2	0.0034	.993	9.5	.	T
46	42	49	2	0.0034	.990	8.6	.	
45	4	CL49	3	0.0051	.985	7.3	3.0	T
44	22	33	2	0.0051	.980	6.7	.	T
43	30	34	2	0.0051	.975	6.4	.	T
42	35	36	2	0.0051	.969	6.2	.	T
41	15	47	2	0.0051	.964	6.1	.	
40	11	27	2	0.0068	.958	5.8	.	
39	CL46	45	3	0.0079	.950	5.5	2.3	T
38	1	3	2	0.0085	.941	5.2	.	T
37	12	13	2	0.0085	.933	5.0	.	T
36	2	19	2	0.0085	.924	4.9	.	T
35	24	25	2	0.0085	.916	4.8	.	T
34	6	31	2	0.0085	.907	4.7	.	T
33	CL42	37	3	0.0085	.899	4.7	1.7	T
32	29	41	2	0.0085	.890	4.7	.	T
31	38	44	2	0.0085	.882	4.7	.	T
30	7	CL40	3	0.0090	.873	4.7	1.3	T
29	CL39	48	4	0.0090	.864	4.8	1.6	
28	CL48	CL35	4	0.0102	.854	4.7	2.0	
27	21	CL33	4	0.0119	.842	4.7	1.8	T
26	CL34	10	3	0.0119	.830	4.7	1.4	T
25	20	39	2	0.0119	.818	4.7	.	T
24	CL37	46	3	0.0119	.806	4.7	1.4	
23	16	32	2	0.0136	.792	4.7	.	T
22	9	50	2	0.0136	.779	4.7	.	
21	14	CL31	3	0.0141	.765	4.7	1.7	
20	CL41	CL29	6	0.0147	.750	4.7	2.3	
19	CL25	28	3	0.0153	.735	4.8	1.3	
18	CL26	CL44	5	0.0166	.718	4.8	2.0	
17	CL45	CL47	5	0.0170	.701	4.8	5.0	T
16	CL38	CL32	4	0.0170	.684	4.9	2.0	
15	CL22	43	3	0.0181	.666	5.0	1.3	
14	8	CL24	4	0.0212	.645	5.0	2.1	T
13	CL23	CL43	4	0.0212	.624	5.1	2.3	
12	CL18	CL30	8	0.0214	.602	5.2	2.2	
11	CL16	CL17	9	0.0234	.579	5.4	2.7	
10	CL36	CL19	5	0.0268	.552	5.5	2.3	
9	CL12	CL28	12	0.0279	.524	5.6	2.8	
8	CL14	CL21	7	0.0347	.490	5.8	2.7	
7	CL10	CL27	9	0.0358	.454	6.0	2.8	
6	CL8	CL20	13	0.0416	.412	6.2	3.3	
5	CL15	CL13	7	0.0429	.369	6.6	3.0	
4	CL7	CL9	21	0.0523	.317	7.1	4.0	

Historial de clúster								
Número de clústers	Clústeres unidos		Frec	R-cuadrado semiparcial	R-cuadrado	Estadístico pseudo F	T-cuadrado pseudo	Enlace
3	CL11	CL4	30	0.0540	.263	8.4	3.9	
2	CL6	CL5	20	0.0740	.189	11.2	4.5	
1	CL3	CL2	50	0.1891	.000	.	11.2	

El clúster I está conformado por 20 aislamientos, subdivididos por las ramas a y b. En la rama a se observa la formación de dos subgrupos, uno de estos subgrupos está conformado por tres aislamientos de *Campylocarpon pseudofasciculare* y el otro subgrupo está formado por tres aislamientos de *Calonectria*. Estos dos géneros comparten características como colonias con textura afelpada, colonización de la caja después de los 12 días de evaluación, esporas cilíndricas rectas con extremos obtusos y esporas levemente curvadas con extremos redondeados las cuales presentaron un gran tamaño, mostrando una longitud entre 37 a 44 μm x 4 a 5 μm de ancho. De acuerdo con la literatura el tamaño de los conidios de algunas especies de *Calonectria* como *C. brachiatica* muestran dimensiones conidiales similares a la obtenidas en este estudio (longitud promedio entre 38 a 44 μm x 5 μm de ancho), además de describir los conidios como estructuras cilíndricas delgadas con extremos obtusos y presencia de 1 a 2 septos (Lombard *et al.*, 2009).

En la rama b se observa el agrupamiento de hongos pertenecientes al género *Fusarium*. Dentro de este grupo se encuentran el complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) que incluye a cuatro aislamientos de *F. solani*, tres de *F. keratoplasticum* y tres de *F. falciforme*. Adicionalmente, se identificaron otras especies de *Fusarium* fuera del grupo de FSSC, e identificadas como *F. oxysporum* (3 aislamientos). Estos aislamientos poseen características como texturas algodonosas-afelpadas, ausencia de sectores, micelio de tonalidad blanca, colonización de la caja de Petri en nueve días, esporas con forma de canoa o fusiformes.

Figura 3-3: Dendrograma obtenido por el método de Ward para las características morfológicas de hongos aislados de plantas de aguacate con síntomas de marchitez en viveros del Valle del Cauca.



El clúster II agrupo 30 hongos pertenecientes al género *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis*, *Ilyonectria* y *Pleiocarpon*. Este grupo se subdividió en tres ramas identificadas como c, d, y e. En la rama c y d se agruparon en su mayoría aislamientos de diferentes especies de *Cylindrocladiella* y algunos de *Gliocladiopsis peggi*. También, se observó un pequeño subgrupo que congrega a *Pleiocarpon algariense* e *Ilyonectria destructans*. Estos cuatro géneros se caracterizaron por presentar colonias afelpadas-algodonosas, con presencia de esporulación en forma de anillos en toda la colonia, micelio con tonalidades blancas, marrones oscuras y amarillas, características que concuerdan con lo descrito en la literatura para estos géneros (Aiello *et al.*, 2020; Lombard *et al.*, 2012). Otra característica importante de este clúster fue la producción de conidios cilíndricos rectos con extremos redondeados y de tamaño pequeño (largo de 5 a 13 μm x ancho de 1 a 3 μm). Estas características coinciden con lo reportado por Aiello *et al.*, (2020) para *Cyl. peruviana*, la cual produce conidios cilíndricos rectos, redondeados en ambos extremos, con un septo y tamaños entre 8 a 13 μm de largo x 2 a 3 μm de ancho (Aiello *et al.*, 2020). De la misma manera, *Cyl. lageniformis*, hongo que según Lombard *et al.*, (2012) posee conidios cilíndricos rectos, con extremos redondeados y tamaños entre 13 a 16 μm de largo x 2 a 3 μm (Lombard *et al.*, 2012). Algunas de estas características han sido descritas en la literatura y concuerdan con los resultados obtenidos.

En la rama e del clúster se agruparon en su mayoría aislamientos del género *Gliocladiopsis*, de las especies *G. peggii*, *G. forsbergii* y *G. curvata*. Este grupo se caracterizó por presentar colonias que esporulan formando anillos en toda la caja, micelio con tonalidades blancas, amarillo-oliva y marrón oscuro; producción de conidios cilíndricos rectos de tamaño mediano (13 a 20 μm de largo x 1-3 μm de ancho). Estos resultados son similares a los reportados por Lombard *et al.*, (2012) para *G. curvata*, la cual presenta conidios cilíndricos rectos con extremos redondeados y longitud promedio de 19 μm de largo x 3 μm de ancho. Asimismo, este autor describió a *G. tenuis* con conidios de forma cilíndrica, pero a diferencia de *G. curvata*, estos son de menor tamaño (longitud promedio de 18 μm de longitud x 2 μm de ancho) (Lombard & Crous, 2012).

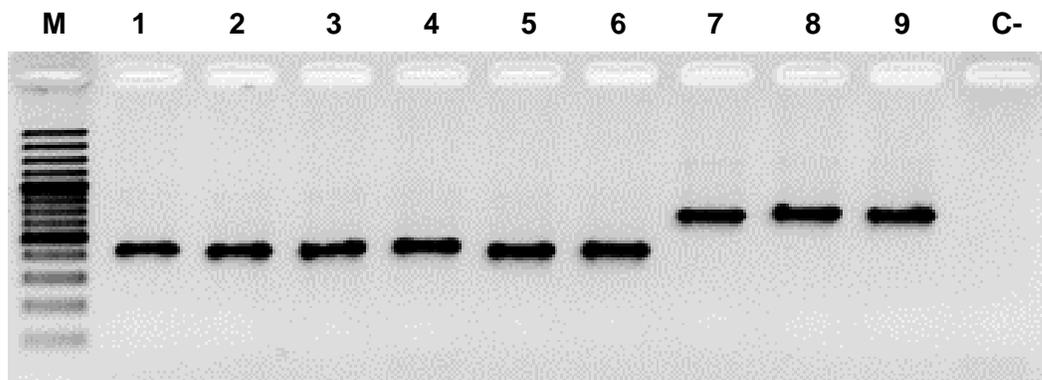
El clúster de morfología permitió la identificación y rectificación de algunos géneros complejos de clasificar. Las características más determinantes a la hora de clasificar un microorganismo fueron las formas de las esporas, el tamaño y la velocidad de crecimiento de los aislados.

3.3.3 Extracción y amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de hongos Nectriaceos

La extracción de ADN de 55 aislados de hongos Nectriaceos mostró una concentración ADN entre 163,81 y 1997,30 ng/ μ L. La relación de absorbancia 260/280 fue de 1,6-2,2, pero la mayor parte de las muestras se encontró en el intervalo entre 1,8-2,0 que es considerado de alta pureza (Gallagher, 2000).

La amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los aislados de hongos Nectriaceos mostró bandas cuyo tamaño oscilo entre 450-600 pb con los cebadores ITS1 e ITS4 como se muestra en la Figura 3-4 (White *et al.*, 1990). El procesamiento de secuencias reveló una calidad nucleotídica entre 95,7 y 100%.

Figura 3-4: Electroforesis en gel de agarosa al 1,4% de productos de PCR de 9 aislados de raíces de plantas de aguacate, amplificados con los cebadores ITS1 e ITS4. Línea M: marcador de peso molecular 100 bp; 1-6 hongos Nectriaceos; 7-9 Oomycetos; C- control negativo. Tomado por: Rodríguez, K.



3.3.4 Secuenciación y análisis filogenético de hongos Nectriaceos

El árbol filogenético fue construido a partir del consenso de las secuencias reverse y forward de la región ITS, por el método de máxima verosimilitud, utilizando como modelo de sustitución de bases Kimura 2 parámetros (K2) con distribución gamma y deleciones parciales. Este árbol reveló la formación de siete clados con los géneros *Campylocarpon*, *Pleiocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Ilyonectria*, *Gliocladiopsis*, *Calonectria* y *Fusarium* (Figura 3-5). La mayoría de los valores de soporte para los clados fueron altos como se observa en los clados de los géneros *Calonectria*, *Gliocladiopsis*, *Cylindrocladiella*, *Campylocarpon*, y *Pleiocarpon*, los cuales estuvieron entre el 99 y 100 bootstrap (BP). El clado del género *Ilyonectria* mostró un bootstrap de 87 y el clado de las especies de *Fusarium* mostró el valor más bajo de bootstrap con 34 (Figura 3-5).

El clado de las especies del género *Campylocarpon*, exhibió un alto valor de bootstrap (100 BP), permitiendo identificar como *Campylocarpon pseudofasciculare* a los aislamientos Plaum06 y Plaum07. En el clado del género *Pleiocarpon* se evidencio un alto valor de bootstrap (99 BP) logrando identificar el aislamiento Jug4CAR como *Pleiocarpon algariense* (MH587320.1). Esta especie fue reportada en junio de 2020 en Italia como causante de pudrición del tallo y corona en plantas de viveros de aguacate y cuya patogenicidad evaluada en tallos mostro ser mayor a la de *Cyl. peruviana* dos meses después de la inoculación. Los síntomas observados en las evaluaciones realizadas por Aiello *et al.*, (2020) consistieron en pudrición de tallo y corona, con presencia de lesiones necróticas visibles sobre la corteza (Aiello *et al.*, 2020).

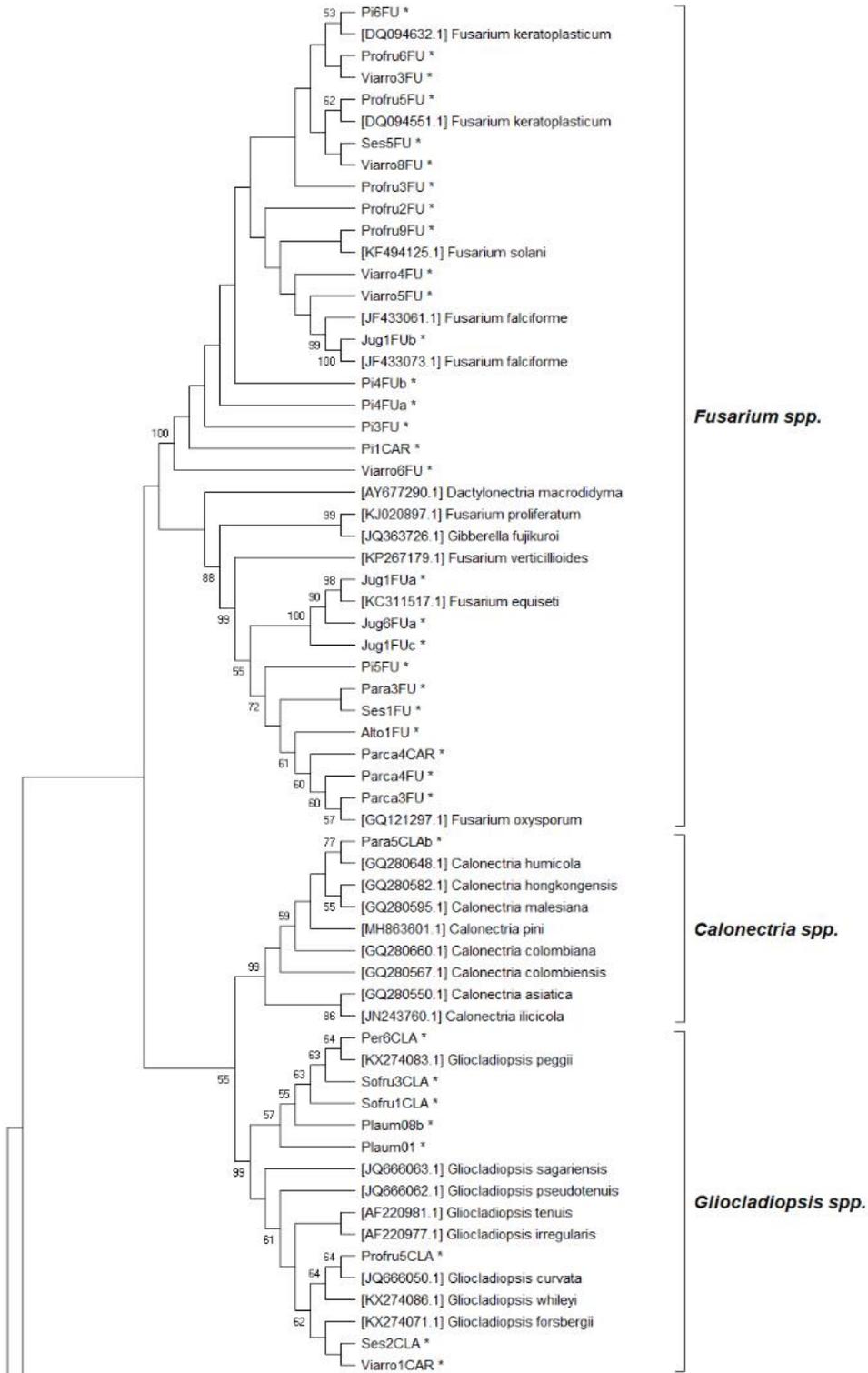
En el clado del género *Ilyonectria* se identificó la cepa Para2CAR como *Ilyonectria destructans* (MH496589.1). Esta especie de *Ilyonectria* ha sido descrita por varios autores como causante de raíces necróticas en aguacate e identificada como patógeno en plantas de vivero y árboles establecidos en campo en Colombia, Chile e Israel. (Besoain & Piontelli, 1999; Ramírez & Morales, 2013; Zilberstein *et al.*, 2007). Adicionalmente, se identificó la estrecha relación existente entre *I. destructans* y especies como *I. liriodendri* (AY677264.1) e *I. liligena* (JF735298.1), especies reportadas como causantes de pudrición negra y declive en huertos de aguacate de Northland, Nueva Zelanda (Herder, 2014).

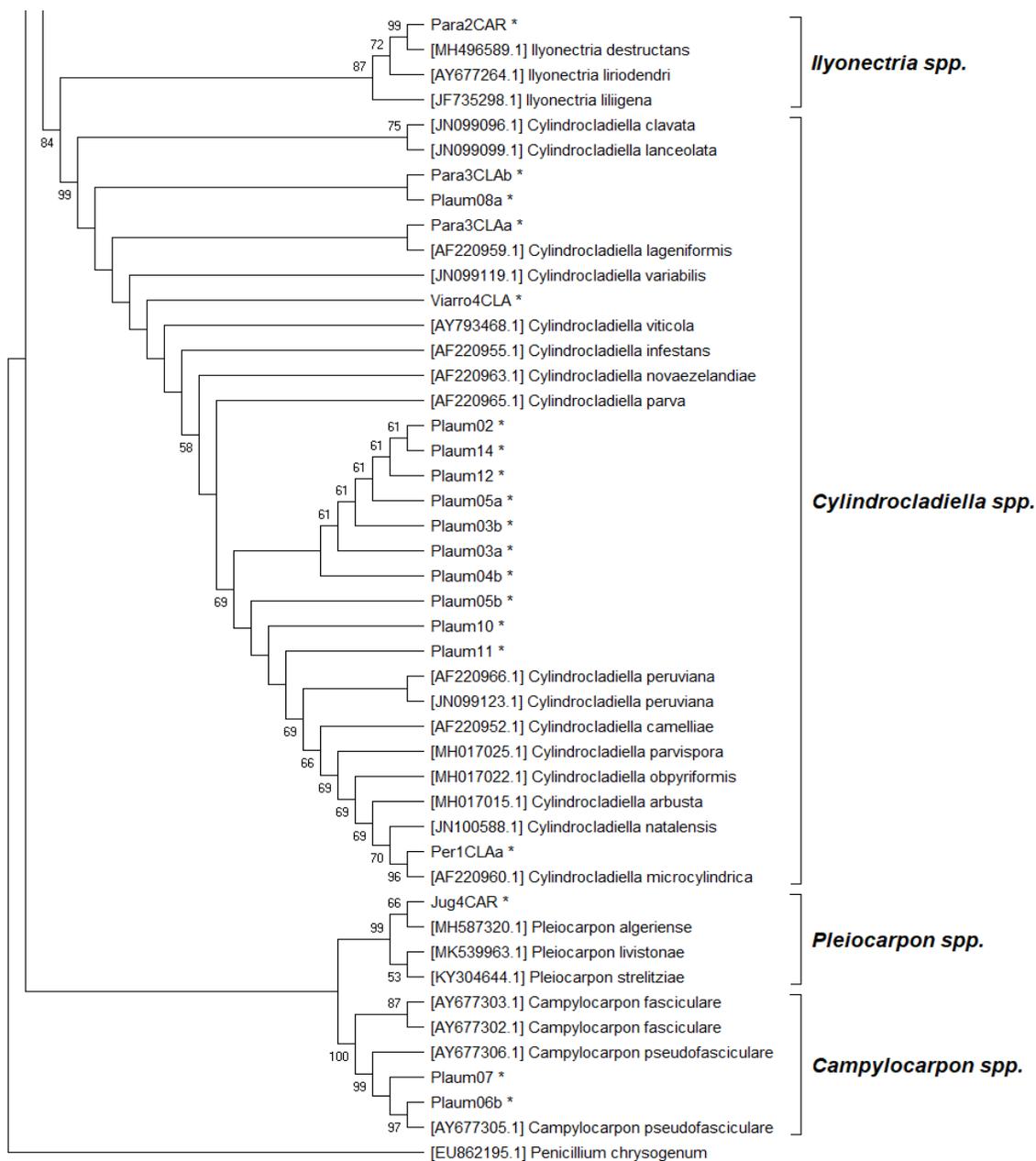
En el clado del género *Cylindrocladiella* se identificó al aislamiento Per1CLAa como *Cylindrocladiella microcylindrica* (AF220960.1). Por otro lado, diez cepas de los códigos Plaum02, Plaum14, Plaum12, Plaum05a, Plaum03b, Plaum03a, Plaum04b, Plaum05b, Plaum10 y Plaum11, no mostraron relación filogenética con una única especie tipo (Figura 3-5). No obstante, el análisis BLAST reveló una cobertura del 100% y un porcentaje de identidad del 99,8% (Tabla 3-6) con *Cyl. peruviana* (AF220966.1), especie reportada e identificada en Italia como causante de pudrición de tallo y corona, y una de las pocas especies del género *Cylindrocladiella* con patogenicidad demostrada en aguacate (Aiello *et al.*, 2020). Por otro lado, en el árbol filogenético se observó un estrecho relacionamiento de *Cyl. lageniformis* con *Cylindrocladiella clavata*, *Cyl. lanceolata* y *Cyl. variabilis*. Este relacionamiento de especies ya ha sido descrito en estudios filogenéticos realizados por Lombard *et al.*, (2012) con los genes β -tubulina, histona H3, ITS y el factor de elongación de la traducción Tef1- α (Lombard *et al.*, 2012).

El clado del género *Gliocladiopsis* mostró un alto valor de soporte (99 BP), logrando identificar como *Gliocladiopsis peggii* (KX274083.1) cinco aislamientos: Per6CLA, Sofru3CLA, Sofru1CLA, Plaum08b y Plaum01. Adicionalmente, el análisis BLAST arrojó una cobertura y porcentaje de identidad del 100% con esta especie (Tabla 3-6). También, se identificó el aislamiento Profu5CLA como *G. curvata*; el cual forma taxones hermanos con *G. whileyi* y *G. forsborgii*, resultados de filogenia similares a los obtenidos por Parkinson *et al.*, (2016). Este estudio identificó los códigos Ses2CLA y Viarro1CAR como *G. forsborgii*. Este género y sus especies han sido frecuentemente aislados de la raíces de plantas enfermas, pero se desconoce su potencial como patógeno de plantas (Dann *et al.*, 2012).

Estudios realizados por Lombard and Crous, (2012) identificaron la presencia de *Gliocladiopsis* sp. en suelos de Colombia. Este mismo estudio recuperó aislados de *G. curvata* de plantas de aguacate en Ecuador (Lombard & Crous, 2012). Por otra parte, investigaciones realizadas por Dann y Parkinson aislaron y evaluaron la patogenicidad de *G. peggii*, *G. whileyi* y *G. forsborgii*, como causantes de pudrición de la raíz en aguacate; pero estos hongos no fueron patógenos para las plántulas en estudios bajo condiciones de invernadero (Dann *et al.*, 2012; Parkinson *et al.*, 2016).

Figura 3-5: Diversidad genética de 55 hongos Nectriaceos aislados de plantas de aguacate, inferidos de ITS. Árbol filogenético de máxima verosimilitud, se utilizó Kimura dos parámetros con distribución gamma como modelo de sustitución de bases⁴.





⁴ se realizaron pruebas de arranque con 1000 repeticiones y se usó *Penicillium chrysogenum* (EU862195) como grupo externo.

El clado del género *Calonectria* mostró un alto valor de soporte (99 BP), logrando la identificación del aislamiento Para5CLAb como *Calonectria humicola* (GQ280648.1), especie que ha sido aislada de suelos en Ecuador y cuya patogenicidad aún no ha sido comprobada en el cultivo de aguacate. Entre las especies reportadas en el cultivo de aguacate se han descrito *Calonectria ilicicola* la cual causa pudrición de la raíz, marchitez, retraso en el crecimiento significativo de los árboles y muerte de las plántulas (Dann *et al.*, 2012; Parkinson, 2017; Parkinson *et al.*, 2019). En Colombia se ha descrito el aislamiento de *Calonectria pini* recuperado de viveros de corte de pino (Q. Liu *et al.*, 2020).

El clado del género *Fusarium* se subdividió en dos subclados, el primer subclado está conformado por el complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) las cuales muestran una fuerte relación entre especies (100 BP), donde se encuentran siete aislamientos (Pi6FU, Profru6FU, Viarro3FU, Profru3FU, Viarro8FU, Ses5FU, Profru5FU) identificados como *F. keratoplasticum* (DQ094632.1 y DQ094551.1), un aislamiento (Profru9FU) identificado como *F. solani* (KF494125.1) y el aislamiento Jug1FUb fue identificado como *F. falciforme* (JF433073.1). Otros aislamientos agrupados dentro del FSSC fueron Profru2FU, Pi4FUb, Pi4Fua, Pi1CAR, Pi3FU y Viarro6FU, los cuales de acuerdo con análisis realizados en BLAST tienen una cobertura e identidad del 100% con *F. falciforme* (Tabla 3-6).

El segundo subclado corresponde al grupo de especies de *Fusarium* conformado por *F. proliferatum* (KJ020897.1), *F. fujikuroi* (JQ363726.1), *F. verticilloides* (KP267179.1) los cuales no fueron aislados en este estudio. Se identificaron los aislamientos Jug1Fua, Jug1FUc y Jug6Fua como *F. equiseti* (KC311517), los cuales mostraron una fuerte relación (100 BP). Los aislamientos Parca3FU y Parca4FU fueron identificados como *F. oxysporum* (GQ121297) al igual que Alto1FU y Parca4CAR de acuerdo con resultados obtenidos tanto a nivel filogenético como por análisis BLAST ya que estos aislamientos mostraron una identidad y cobertura del 100% (Tabla 3-6).

El género *Fusarium* ha sido frecuentemente aislado y descrito en Colombia y otras partes del mundo, como microorganismo recuperado de raíces con síntomas de pudrición en el cultivo de aguacate (C. López & Melero, 1992; Ramírez & Morales, 2019). Sin embargo, pocas especies cuentan con patogenicidad comprobada en el cultivo, como es el caso de *Fusarium verticilloides* (Ttacca & Mattos, 2016).

Tabla 3-6: Porcentaje de cobertura e identidad de 55 hongos aislados y comparados con secuencias de la base de datos del GenBank (BLAST), inferidos de la región ITS.

Código	Especie	Cobertura	Identidad
Alto1FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Jug1Fua	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	100%
Jug1FUb	<i>Fusarium falciforme</i>	99%	100%
Jug1FUc	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	100%
Jug4CAR	<i>Pleiocarpon algeriense</i>	99%	99,8%
Jug6Fua	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	100%
Para2CAR	<i>Ilyonectria destructans</i>	100%	99,6%
Para3CLAa	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	100%	100%
Para3CLAb	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	100%	100%
Para3FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Para5CLAb	<i>Calonectria humicola</i>	100%	99.81%
Parca3FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Parca4CAR	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Parca4Fu	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Per1CLAa	<i>Cylindrocladiella microcylindrica</i>	95%	100%
Per6CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	100%	100%
Pi1CAR	<i>Fusarium falciforme</i>	100%	100%
Pi3FU	<i>Fusarium falciforme</i>	100%	100%
Pi4Fua	<i>Fusarium falciforme</i>	100%	100%
Pi4FUb	<i>Fusarium falciforme</i>	100%	100%
Pi5FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Pi6FU	<i>Fusarium keroplaticum</i>	100%	100%
Plaum01	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	100%	100%
Plaum02	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum03a	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum03b	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum04b	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum05a	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum05b	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum06b	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	100%	99,3%
Plaum07	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	100%	99,3%
Plaum08a	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	100%	100%
Plaum08b	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	100%	100%
Plaum10	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	100%
Plaum11	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	100%

Código	Especie	Cobertura	Identidad
Plaum12	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Plaum14	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	100%	99,8%
Profru2FU	<i>Fusarium falciforme</i>	100%	100%
Profru3FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100%	99,8%
Profru5CLA	<i>Gliocladiopsis curvata</i>	100%	99,8%
Profu5FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	99%	100%
Profru6FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100%	99,8%
Profru9FU	<i>Fusarium solani</i>	100%	100%
Ses1FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	100%
Ses2CLA	<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	100%	100%
Ses5FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	99%	100%
Sofru1CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	100%	100%
Sofru3CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	100%	100%
Viarro1CAR	<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	100%	100%
Viarro3FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100%	99,8%
Viarro4CLA	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	99%	100%
Viarro4FU	<i>Fusarium solani</i>	100%	100%
Viarro5FU	<i>Fusarium solani</i>	100%	100%
Viarro6FU	<i>Fusarium falciforme</i>	100%	100%
Viarro8FU	<i>Fusarium solani</i>	100%	100%

3.3.5 Extracción y amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Oomycetos

La extracción de ADN de ocho aislamientos de Oomycetos mostró una concentración ADN entre 490,82 y 1523,42 ng/uL. La relación de absorbancia 260/280 fue de 1,8-2,0 la cual es considerada de alta pureza (Gallagher, 2000).

La amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ocho aislados de Oomycetos mostró bandas cuyo tamaño oscilo entre 800-900 pb con los cebadores ITS1 e ITS4, como se muestra en la Figura 3-4.

3.3.6 Análisis filogenético de Oomycetos

En la Figura 3-6 se observa el árbol filogenético obtenido mediante el método de máxima verosimilitud, usando el modelo de sustitución de bases de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY)

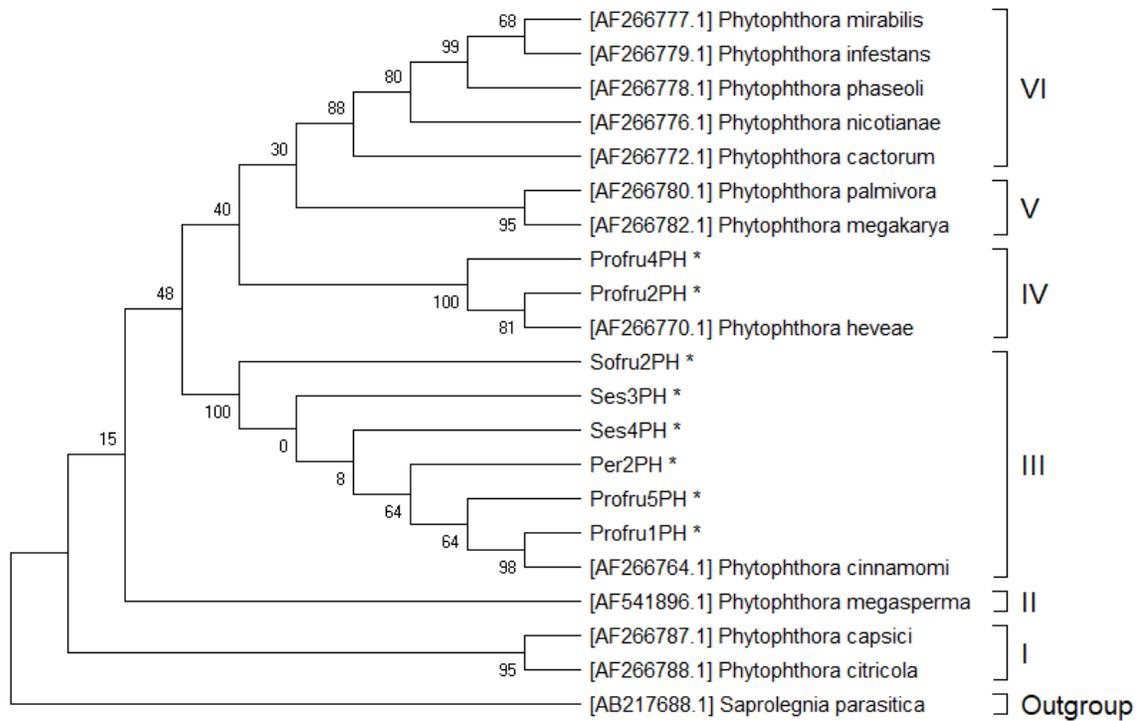
con distribución gamma, utilizando todos los sitios y empleando a *Saprolegnia parasítica* (AB217688.1) como grupo externo. Este árbol permitió la identificación de dos especies de *Phytophthora* diferentes *P. cinnamomi* y *P. heveae*. Algunos de los autores que han realizado filogenia con especies de *Phytophthora* han observado correlaciones entre filogenias moleculares y rasgos morfológicos ó fisiológicos como es el caso de la papilación y temperaturas de crecimiento óptimas y máximas (Blair, Coffey, Park, Geiser, & Kang, 2008; Cooke, Drenth, Duncan, Wagels, & Brasier, 2000; Yang, Tyler, & Hong, 2017).

La estructura sugerida para los clados en este estudio recuerda a la previamente asignada por Blair *et al.*, (2008) & Cooke *et al.*, (2000). Quienes sugieren la exclusión del taxon no papilado a un solo clado, designando en este estudio como el clado II al cual pertenece *P. megasperma* (Figura 3-6).

El clado I se dividió en dos subclados soportados por un valor de soporte de 95 BP, agrupando a *P. capsici* y *P. citrícola*. El clado III agrupó especies de *P. cinnamomi* que se caracterizan principalmente por la formación de esporangios no papilados. Los valores de soporte observados en el clado III permitieron identificar como *P. cinnamomi* (AF266764.1) a seis aislamientos Profriu1PH, Profriu5PH, Per2PH, Sofriu2PH, Ses3PH y Ses4PH como se observa en la Figura 3-6. Adicionalmente, estos aislamientos evidenciaron una cobertura y porcentaje de identidad con *P. cinnamomi* entre el 99-100% (Tabla 3-7). La presencia de *P. cinnamomi* en Colombia ha sido documentada en los departamentos de Antioquia, Cauca, Valle del Cauca, Risaralda, Bolívar y Tolima (Beltran & Rincón López, 2015; Diaz *et al.*, 2014; Marulanda, 2017; Ramírez, 2018; Ramírez *et al.*, 2017; Vinchira *et al.*, 2020).

El clado IV muestra un alto valor de soporte (100 BP) y permitió la identificación de los aislamientos Profriu2PH y Profriu4PH como *P. heveae*. Además, mostraron una cobertura y porcentaje de identidad entre el 99-100% con *P. heveae*, de acuerdo con el análisis BLAST (Tabla 3-7). El clado V agrupa a dos especies estrechamente relacionadas con un valor de soporte del 95 BP y descritas como *P. palmivora* y *P. megakarya*. Estas dos especies poseen la singularidad de producir esporangios papilados al igual de las especies del clado IV donde se encuentre *P. hevea*.

Figura 3-6: Diversidad genética de ocho Oomycetos aislados de plantas de aguacate, inferidos de la región ITS. Árbol filogenético de máxima verosimilitud, se utilizó el modelo evolutivo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con distribución gamma en todos los sitios⁵.



⁵ se realizaron pruebas de arranque con 1000 repeticiones, usando *Saprolegnia parasítica* (AB217688.1) como grupo externo.

Tabla 3-7: Porcentaje de cobertura e identidad de ocho asilamientos de *Phytophthora* comparadas con secuencias de la base de datos del GenBank (BLAST).

Código	Especie	Cobertura	Identidad
--------	---------	-----------	-----------

Per2PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	100%
Profriu1PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	100%
Profriu2PH	<i>Phytophthora heveae</i>	100%	100%
Profriu4PH	<i>Phytophthora heveae</i>	99%	100%
Profriu5PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	100%
Ses3PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100%	100%
Ses4PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	99,80%
Sofriu2PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100%	100%

En este estudio al igual que estudios realizados por Blair *et al.*, (2008); Cooke *et al.*, (2000) Yang, Tyler, & Hong, (2017) se describe la formación de cuatro subdivisiones dentro de uno de los clados designado aquí como clado VI. En el primer subclado o subdivisión se encuentra *P. cactotum*, estrechamente relacionada (88 BP) con el subclado de *P. nicotianae*, que a su vez esta moderadamente relacionada (80 BP) con el subclado de *P. phaseoli* y este último altamente relacionado (99 BP) con *P. infestans*, la cual comparte una moderada relación con *P. mirabilis*. Particularmente, en este clado se agrupan *Phytophthoras* con esporangios papilados y semipapilados (Blair *et al.*, 2008; Cooke *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2017).

4. Capítulo 4: Variabilidad patogénica de cepas aisladas de plantas con síntomas de pudrición de raíces

4.1 Resumen

La pudrición de la raíz del aguacate es una patología común en el cultivo de aguacate que ha sido ampliamente reportada en Colombia. Sin embargo, se hace necesario ampliar la evidencia sobre la patogenicidad de las especies implicadas en la marchitez del aguacate en nuestro país. En este capítulo se describen las pruebas de patogenicidad realizadas a las cepas aisladas de plantas de aguacate con síntomas de marchitez, colectadas en viveros del Valle del Cauca. Para esto se realizó una preselección de cepas patogénicas mediante la inoculación de frutos de aguacate con una suspensión de esporas de 10^6 UFC/ml de 64 cepas, a partir de las cuales se seleccionaron las que presentaron las áreas de necrosis más largas y los géneros más representativos para realizar inoculaciones en tallos y semillas de plantas de aguacate. La inoculación en tallos de plantas de aguacate Hass se realizó mediante la introducción de un disco con micelio de la cepa a evaluar, permitiendo reproducir síntomas de marchitez similares a los observados en los viveros en plantas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora heveae* y *Calonectria* sp., estas además causaron la muerte de las plantas entre los primeros seis y nueve días después de la inoculación en plantas de tres meses de edad. La inoculación de semillas se realizó mediante aplicación de 200 ml con una solución de 10^6 esporas/ml, la cual fue aplicada en bolsas con sustrato y semillas de aguacate Hass previamente desinfectadas. Un mes después de la inoculación, se evidenció que las cepas de *P. cinnamomi*, y *Calonectria* sp. poseen la capacidad de inhibir la germinación de las semillas de aguacate entre un 70-75%.

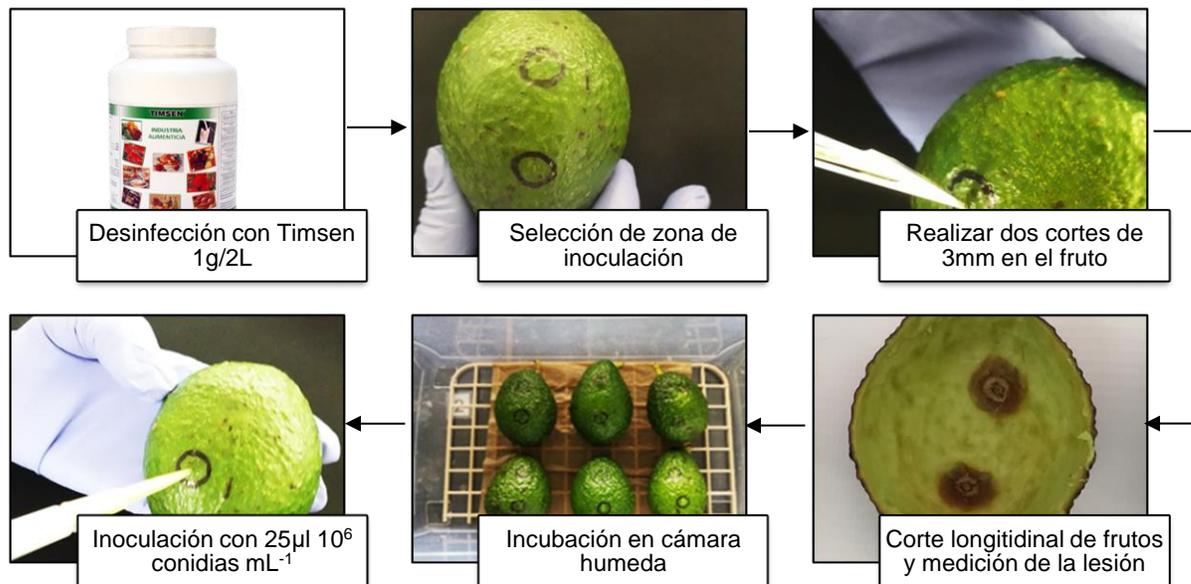
4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Preselección de aislamientos para pruebas de patogenicidad

Los aislamientos obtenidos fueron sometidos a pruebas en frutos para seleccionar los de mayor patogenicidad (Channon & Thomson, 1981). Para esto se empleó la metodología propuesta por Parkinson, (2017) en frutos de aguacate Hass en estado inmaduro (color verde brillante) entre los 180-200g. Los frutos fueron desinfectados por inmersión en solución con Timsen y agua (1g/2L) durante 10 minutos, para eliminar residuos de polvo y de fungicidas. Posteriormente, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito al 1% durante cinco minutos, etanol al 70% v/v durante un minuto y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril; luego se secaron a temperatura ambiente.

Para la preparación de la suspensión conidial, los aislados fueron cultivados en medio PDA a temperatura ambiente (25 °C) durante 15 días. Posteriormente se adicionaron 9 ml de agua destilada estéril (que contenía 0,5 ml de Tween 80 al 0,01%) en cada placa, seguido de raspado y filtrado en gasa. La solución obtenida fue usada para calcular las UFC/ml en cámara de Neubauer, cada solución fue ajustada a una concentración de 10^6 conidios/ml, mediante preparación de diluciones seriadas. El método de inoculación consistió en hacer dos cortes de 3 mm en su eje longitudinal en cada uno de los frutos, en los cuales se dispuso 25 μ l de la suspensión conidial a una concentración de 10^6 conidias mL⁻¹ (Figura 4-1), obtenida a partir de aislados cultivados en medio PDA (Parkinson, 2017). Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente al azar (CA), de tres repeticiones con dos unidades experimentales por tratamiento. Se usaron frutos inoculados con agua destilada estéril como testigos negativos. Los frutos se incubaron a 27°C en una cámara húmeda para cada aislado, hasta que se observaron síntomas de infección en el fruto.

Nueve días después de la inoculación (ddi) se cortaron los frutos longitudinalmente y se eliminó la pulpa para facilitar el registro de los diámetros de la lesión necrótica (en cm), en las dos zonas de inoculación. Para confirmar la identidad de los aislamientos se realizó recuperación de inoculó de los frutos infectados y cumplimiento de los postulados de Koch (Silva Rojas & Ávila Quezada, 2011). Las cepas que exhibieron mayores valores promedio de lesión necrótica fueron empleadas para pruebas de patogenicidad en semillas y raíces.

Figura 4-1: Proceso de inoculación de hongos Nectriaceos en frutos de aguacate Hass.

4.2.2 Multiplicación de plantas para pruebas de infección en tallos

Para las pruebas de patogenicidad se usó la variedad Hass, señalada por varios autores como susceptible a microorganismos causantes de pudrición de raíces como *Phytophthora cinnamomi* (Ramírez, Castañeda, & Morales, 2014).

Para la multiplicación de plantas se usaron frutos de aguacate Hass sanos, en estado de madurez fisiológica, a los cuales se les realizó extracción manual de la semilla. Las semillas fueron limpiadas y desinfectadas con una solución de Fosetyl y Propamocard (2 ml/L); y Carboxin combinado con Captan (50 g/L) por dos minutos. El sustrato utilizado para la germinación fue arena fina previamente solarizada y desinfectada con Prevalor (2 ml/L) siete días antes de la siembra. Una vez sembradas las semillas, permanecieron bajo cubierta plástica y polisombra con reducción de luz del 50% hasta obtener emergencia del epicótilo. Para mantener las condiciones adecuadas de contenido de humedad en las semillas se realizaron riegos diarios.

El trasplante de las semillas a sustrato se realizó siete días posteriores a su germinación en bolsas de polipropileno color negro calibre tres con capacidad para seis litros de volumen de sustrato y con perforaciones en zig-zag para facilitar la aireación y drenaje. El sustrato utilizado fue preparado a partir de turba, cascarilla de arroz, arena y vermiculita

en una relación 2:1:1/2:1/2 respectivamente. Estos fueron previamente desinfectados mediante solarización.

4.2.3 Pruebas de patogenicidad en tallos de plantas de aguacate

Se realizó inoculación de plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, mediante herida al tallo con 19 de las cepas obtenidas en este estudio. Se seleccionaron cepas de diferentes géneros y especies, dándole prioridad a las especies o géneros reportados como causantes de pudrición de raíces en aguacate y que presentaron mayores valores de necrosis en la prueba de infección con frutos. Las cepas usadas para el proceso de infección en tallo fueron: tres cepas de *Phytophthora cinnamomi*, dos de *P. heveae*, una de *Calonectria humicola*, dos de *Calonectria* sp, una *Cylindrocladiella* sp., una *Cylindrocladiella peruviana*, una *Cylindrocladiella lageniformis*, un *Pleiocarpon algariense*, una *Ilyonectria destructans*, un *Gliocladiopsis peggii*, un *Gliocladiopsis forsbergii*, un *Campylocarpon pseudofasciculare* un *Fusarium keratoplasticum*, un *Fusarium falciforme*, un *Fusarium oxysporum* y un tratamiento testigo. Las 19 cepas evaluadas fueron descritas en la tabla 4-2.

La inoculación se realizó a 8 cm de la base del tallo, retirando parcialmente una lengüeta de la corteza del tallo de aproximadamente 2 mm de profundidad e introduciendo un disco con crecimiento del micelio del patógeno a evaluar. La herida realizada se cubrió con cinta parafilm para fijar el inóculo y evitar la contaminación. El tratamiento testigo se inoculó con discos de PDA sin crecimiento de micelio.

El ensayo tuvo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y dos unidades experimentales para cada cepa. Se realizaron evaluaciones a los 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 días después de la inoculación; registrando el largo y ancho de las lesiones necróticas y síntomas de flacidez, marchitez y muerte ocasionados por los microorganismos inoculados. El ensayo se realizó bajo condiciones de casa de malla negra antiáfido, con riegos cada tres días. Se monitorearon las condiciones de temperatura y humedad relativa mediante la instalación de una estación meteorológica WatchDog, la cual se programó para registrar las variables cada 30 minutos durante los meses de desarrollo del experimento.

4.2.4 Pruebas de patogenicidad en semillas de aguacate Hass

Para las pruebas de patogenicidad en semillas, se realizó la producción de inóculo en cajas de Petri de dos *Calonectrias* sp., un *Fusarium keratoplasticum* y una *Cylindrocladiella*. Adicionalmente, se usaron dos cepas de *P. cinnamomi* como control positivo debido a su capacidad infectiva comprobada en plantas de aguacate. Todas las cepas se multiplicaron en medio de cultivo PDA y se incubaron temperatura ambiente hasta colonización completa de la caja.

Una vez los cultivos colonizaron la mayor parte de la caja, se procedió a realizar una preinoculación del sustrato con discos de micelio y otra inoculación aplicada al sustrato de las semillas a infectar en forma de suspensión de esporas. La preinoculación se realizó mediante la incorporación de 20 discos de micelio (8mm de diámetro) de la cepa a evaluar en cada una de las bolsas con sustrato preparado como se describe en el punto 4.2.2. Ocho días después se prepararon las semillas a infectar mediante el despulpado de frutos de aguacate en estado de madurez fisiológica. Posteriormente, se desinfectaron las semillas sumergiéndolas en agua destilada estéril a 47°C durante 30 minutos y se secaron a temperatura ambiente en cabina de flujo laminar. Luego, se eliminó la testa de cada semilla manualmente (usando guantes para garantizar la asepsia) y se sumergieron durante 30 minutos en una solución de esporas de concentración 10^6 UFC/ml con cada una de las cepas en estudio. Finalmente, las semillas se trasplantaron al sustrato y se adicionó 200 ml de la suspensión de esporas a cada unidad experimental. El tratamiento testigo se inóculo con discos de agar agua y agua destilada estéril.

Este ensayo se realizó bajo condiciones de casa de malla negra antiáfido, con riego periódico cada tres días y monitoreo de las condiciones ambientales mediante una estación meteorológica WatchDog. El diseño del experimento estuvo conformado por 12 unidades experimentales (bolsas con semilla) y siete tratamientos (seis cepas y un testigo). Se realizaron evaluaciones para determinar el porcentaje de germinación de las semillas a los 45 días después de haber sido sembradas. Adicionalmente, se realizaron evaluaciones periódicas a las semillas que lograron germinar para identificación de síntomas aéreos a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días, después de la siembra.

4.2.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias, mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) con los diámetros promedio de las lesiones necróticas evaluadas en frutos y las áreas promedio de las lesiones observadas en tallos 30 días después de la infección.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Preselección de aislamientos para pruebas de patogenicidad

Se realizó una preselección de cepas con mayor potencial infectivo, mediante inoculaciones con suspensión de esporas en frutos de aguacate cv. Hass. El 100% de las cepas inoculadas produjeron lesiones necróticas en el mesocarpio (Figura 4-2 B y exocarpio del fruto (Figura 4-2 C). También, se observó sobre la piel de los frutos un crecimiento de micelio reducido, moderado o abundante (Figura 4-3), que fue directamente proporcional al avance de la necrosis. Los aislamientos evaluados y que produjeron síntomas, se volvieron a aislar con éxito a partir de trozos de pulpa necrótica seleccionada, cumpliendo los postulados de Koch. El tratamiento testigo inoculado con agua destilada estéril no desarrollo ninguna sintomatología, ni crecimiento de micelio (Figura 4-3 D).

Figura 4-2: Necrosis en mesocarpio y exocarpio de frutos de aguacate inoculados con cepas aisladas de viveros. A) Tratamiento testigo. B) Mesocarpio con lesión necrótica. C) Exocarpio con lesión necrótica.

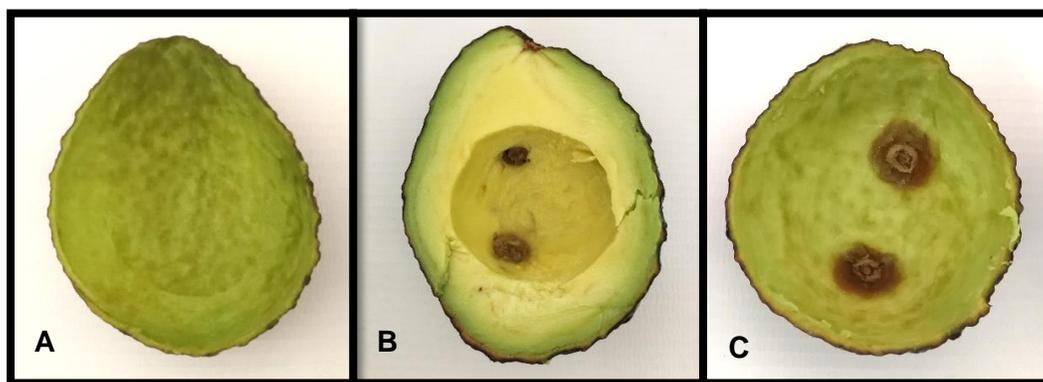
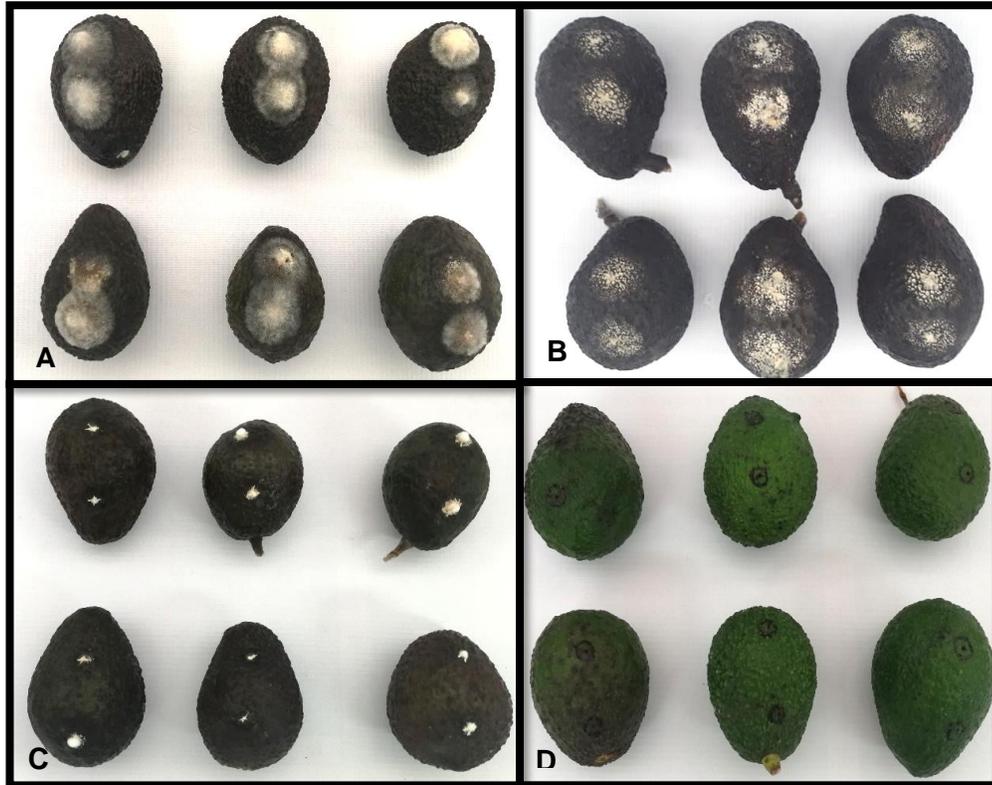


Figura 4-3: Crecimiento de micelio sobre el exocarpo de aguacate Hass inoculado con cepas de viveros. A) Crecimiento abundante de micelio ocasionado por *Calonectria*. B) Crecimiento abundante de micelio ocasionado por *Fusarium*. C) Crecimiento moderado de micelio ocasionado por *Gliocladiopsis*. D) Tratamiento testigo.



El análisis de varianza para el ensayo de infección en frutos de aguacate cv. Hass, mostró diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre las cepas evaluadas, como se observa en la Tabla 4-1. De las 64 cepas evaluadas se preseleccionaron las 19 más representativas, para ser sometidas a pruebas de infección en tallos. El criterio de selección de cepas consistió en elegir las especies con mayor diámetro promedio de necrosis, dando prioridad a las especies identificadas y reportadas como causantes de pudrición de raíces, como *Calonectria*, *Phytophthora*, *Ilyonectria* y *Pleioicarpon*; las cuales han sido reportadas como causantes de pudrición de raíces y marchitez, además de lograr reproducibilidad de síntomas en pruebas de infección (Aiello *et al.*, 2020; Dann *et al.*, 2012; Marulanda, 2017; A. Vitale *et al.*, 2012). Adicionalmente, se seleccionó al menos una especie representativa de cada género como *Cylindrocladiella*, *Fusarium*, y *Gliocladiopsis*.

Las cepas preseleccionadas para pruebas de infección en tallos se marcaron en negrilla en la Tabla 4-2, donde se describe el código de la cepa y agrupamiento de Tukey de acuerdo con las diferencias significativas existentes entre ellas.

Tabla 4-1: Análisis de varianza de pruebas de infección con 64 cepas, en frutos de aguacate Hass.

Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Cepas	63	497.1217172	7.8908209	24.40	<.0001
Error	332	107.3600000	0.3233735		
Total, corregido	395	604.4817172			

Las pruebas de infección realizadas en frutos de aguacate Hass pusieron en evidencia la capacidad que tienen las cepas de *Fusarium falciforme*, para afectar el mesocarpio del fruto ocasionando necrosis de hasta 4,58 cm de diámetro promedio. Otras cepas con posible potencial infectivo son *Fusarium keratoplasticum*, *P. cinnamomi*, *Calonectria* sp., *Cylindrocladiella* sp., *P. heveae*, y *Fusarium oxysporum*, las cuales causaron necrosis entre 3,40-4,21 cm de diámetro promedio (Tabla 4-2).

Investigaciones realizadas por Parkinson, (2017) con tres cepas de *Calonectria illicicola* mostraron diámetros promedio de lesión entre 2,87-3,35 cm; resultados que son muy similares a los encontrados en este estudio con *Calonectria* sp.. Sin embargo, las especies de *Calonectria* evaluadas en este estudio mostraron valores de necrosis más altos.

Por otro lado, especies de *Cylindrocladiella peruviana*, *Cyl. lageniformis*, *Gliocladiopsis peggi*, *G. forsbergii*, *F. falciforme*, *F. solani*, y *Pleioicarpon algeriense* mostraron una menor capacidad para afectar el mesocarpio del fruto, con diámetros de necrosis promedio entre 2,36-2,96 cm. Otras como *Campylocarpon pseudofasciculare*, *Calonectria humicola*,

Fusarium oxysporum e *Ilyonectria destructans*; mostraron diámetros de necrosis por debajo de 1,6 cm (Tabla 4-2).

Parkinson, (2017) evaluó dos cepas de *Ilyonectria* sp. que presentaron una alta capacidad infectiva con lesiones necróticas entre 2,96-3,50 cm. Este resultado difiere de los obtenidos en este estudio con una cepa de *Ilyonectria destructans*, la cual fue evaluada y mostró bajos promedios de lesión de 0,46 cm.

Tabla 4-2: Agrupamiento de Tukey (0,05) para 64 cepas evaluadas con base en el diámetro promedio de las lesión necrótica ocasionada en frutos de aguacate Hass 9 ddi.

Cepa	Especie	Media	Agrupamiento Tukey
Viarro6FU	<i>Fusarium falciforme</i>	4,5833	a
Profriu6FU	<i>Fusarium keroplaticum</i>	4,2167	ab
Profriu1PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	4,1667	ab
Pi6FU	<i>Fusarium keroplaticum</i>	4,1000	abc
Pi3FU	<i>Fusarium falciforme</i>	4,0000	abcd
Para5CLA	<i>Calonectria</i> sp.	3,7167	abcd
Plaum06A	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	3,6333	abcd
Profriu9FU	<i>Fusarium solani</i>	3,6167	abcde
Viarro4FU	<i>Fusarium solani</i>	3,5333	abcdef
Profriu2PH	<i>Phytophthora heveae</i>	3,5000	abcdef
Profriu3FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	3,4167	abcdefg
Plaum16	<i>Calonectria</i> sp.	3,4167	abcdefg
Para3FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,4000	abcdefg
Viarro8FU	<i>Fusarium solani</i>	3,2500	abcdefgh
Profriu5FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	3,2000	bcdefgh
Pi4Fua	<i>Fusarium falciforme</i>	3,0000	bcdefghi
Plaum05B	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	2,9667	bcdefghi
Para3CLAb	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	2,8833	cdefghij
Per6CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	2,8000	cdefghij
Viarro1CAR	<i>Gliocladiopsis forsborgii</i>	2,7167	defghij
Jug1FUb	<i>Fusarium falciforme</i>	2,7000	defghijk
Viarro5FU	<i>Fusarium solani</i>	2,7000	defghijk
Plaum05A	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	2,6667	defghijk
Plaum03B	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	2,6500	defghijk
Ses2CLA	<i>Gliocladiopsis forsborgii</i>	2,4500	efghijkl
Plaum02	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	2,4333	efghijkl
Jug4CAR	<i>Pleiocarpon algeriense</i>	2,3667	efghijkl

Cepa	Especie	Media	Agrupamiento Tukey
Viarro3FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	2,3667	efghijklm
Sofru3CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	2,3667	efghijklm
Sofru1CLA	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	2,2667	efghijklmn
Plaum03A	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	2,2500	fghijklmno
Elpro3CLA	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	2,2333	fghijklmno
Plaum08B	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	2,2167	fghijklmno
Plaum04B	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	2,1833	fghijklmno
Ses5FU	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	2,1667	ghijklmno
Ses1FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	2,1667	ghijklmno
Ses1CLA	<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	2,1333	ghijklmno
Plaum01	<i>Gliocladiopsis peggi</i>	2,0833	ghijklmnop
Parca3FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	1,9667	hijklmnopq
Per1CLAa	<i>Cylindrocladiella microcylindrica</i>	1,9000	hijklmnopqr
Plaum06B	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	1,8000	ijklmnopqrs
Profu5CLA	<i>Gliocladiopsis curvata</i>	1,7833	ijklmnopqrs
Ses3FU	<i>Fusarium</i> sp.	1,6667	ijklmnopqrs
Plaum07	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	1,5833	ijklmnopqrs
Pi4FUb	<i>Fusarium falciforme</i>	1,5000	jklmnopqrs
Plaum14	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	1,4500	jklmnopqrst
Para5CA	<i>Calonectria</i> sp.	1,3500	klmnopqrst
Parca4FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	1,1833	lmnopqrstu
Plaum13	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	1,1500	lmnopqrstu
Viarro4CLA	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	1,0667	mnopqrstu
Jug1FUa	<i>Fusarium equiseti</i>	1,0167	mnopqrstu
Per2PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	1,0000	nopqrstu
Ses4PH	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	1,0000	nopqrstu
Plaum15	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	0,9333	nopqrstu
Alto1FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,9000	opqrstu
Plaum08A	<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	0,7500	pqrstu
Plaum10	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,6667	qrstu
Plaum12	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,6500	qrstu
Plaum11	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	0,6000	rstu
Pi5FU	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,5667	rstu
Para2CAR	<i>Ilyonectria destructans</i>	0,4667	stu
Jug1FUc	<i>Fusarium equiseti</i>	0,4333	stu
Plaum09	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	0,1333	tu
Testigo	No aplica	0	u

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con Tukey (0,05)

El ensayo de infección en frutos es una metodología sencilla y económica en comparación con las pruebas de patogenicidad que se realizan en un invernadero con plantas. Este experimento nos permitió preseleccionar materiales para poner a prueba metodologías más extensas y costosas como la infección en semillas y plantas de aguacate.

4.3.2 Pruebas de patogenicidad en tallos de plantas de aguacate

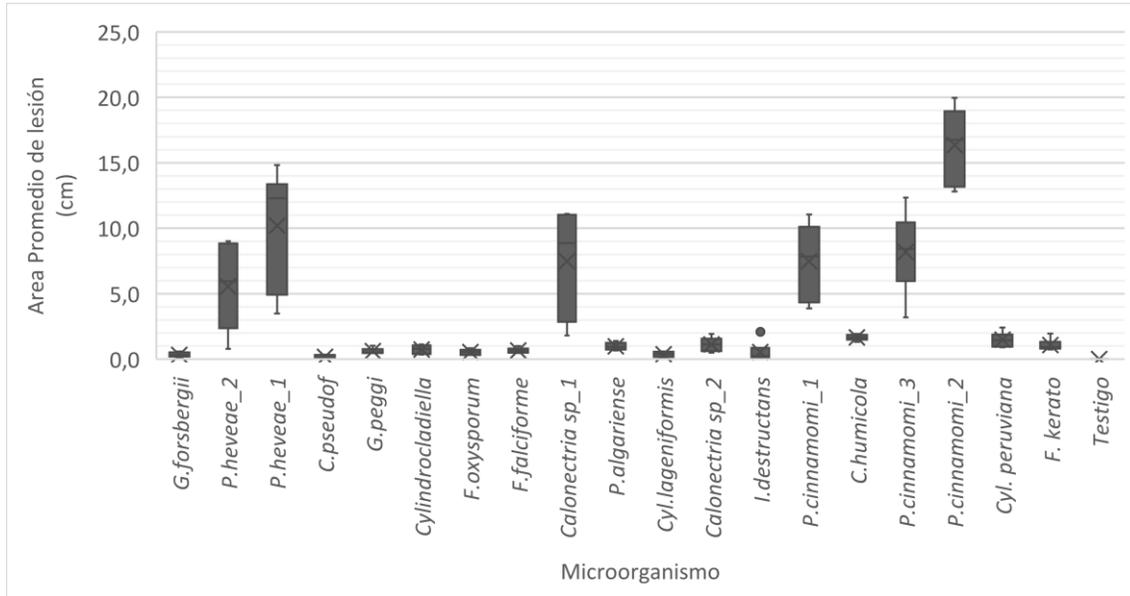
Las pruebas de patogenicidad realizados en tallos de aguacate Hass mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre las 20 cepas evaluadas (Tabla 4-3). La prueba de Tukey realizada a las 20 cepas evaluadas mediante infección en tallo de plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, permitió la formación de cinco grupos con diferencias altamente significativas. En el primer grupo (a) se encuentra la cepa Per2PH de *P. cinnamomi*, esta mostró los valores más altos de área promedio de lesión (16,3 cm) y fue la más severa, ocasionando rápidamente la muerte de las seis unidades experimentales evaluadas (entre seis y nueve ddi), como se muestra en la Tabla 4-4.

Tabla 4-3: Análisis de varianza de las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas de aguacate Hass a 20 cepas aisladas de viveros del Valle del Cauca.

Origen	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor F	Pr > F
Cepas	21	2271.308678	108.157556	28.24	<.0001
Error	98	375.364722	3.830252		
Total, corregido	119	2646.673399			

En la Figura 4-4 se observan las cepas con mayor área de necrosis, estas corresponden en su mayoría a cepas de *Phytophthora cinnamomi* (P.cinna2, P.cinna3, P.cinna1), *Phytophthora heveae* (P.hev1, P.hev) y *Calonectria* sp.(Calonec1). Siendo *P. cinnamomi* (Per2PH) la cepa con mayor área promedio de lesión con 16,3 cm de área, seguida de *P. heveae* (Profru2PH) con 10,2 cm de área promedio de lesión (Tabla 4-4).

Figura 4-4: Diagrama de cajas de lesión necróticas observadas en plantas de aguacate Hass inoculadas en tallo con 20 cepas.



La prueba de Tukey realizada a las 20 cepas evaluadas mediante infección en tallo de plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, permitió la formación de cinco grupos con diferencias altamente significativas. En el primer grupo (a) se encuentra la cepa Per2PH de *P. cinnamomi*, esta mostró los valores más altos de área promedio de lesión (Tabla 4-4) y fue la más severa, ocasionando rápidamente la muerte de las seis unidades experimentales evaluadas (entre seis y nueve ddi), como se muestra en la figura 4-5.

En el segundo agrupamiento (b) se encuentran *P. heveae* (Profriu2PH), dos *P. cinnamomi* (Ses4PH y Profriu1PH), y una *Calonectria* sp. (Plaum16); las cuales también causaron la muerte de todas sus unidades experimentales (Figura 4-6 y Figura 4-7). Sin embargo, estas mostraron menores áreas de lesión en comparación con el grupo a (Tabla 4-4).

Tabla 4-4: Agrupamiento de Tukey de acuerdo con el área promedio de lesión obtenida en plantas de aguacate Hass inoculadas en tallo con 20 cepas.

Inoculo	Cepa	Long. promedio de necrosis en cm	Ancho promedio de necrosis en cm	Área promedio de lesión en cm	Agrupamiento
<i>Phytophthora cinnamomi</i> _2	Per2PH	11,35	1,45	16,3	a
<i>Phytophthora heveae</i> _1	Profu2PH	9,23	1,08	10,2	b
<i>Phytophthora cinnamomi</i> _3	Ses4PH	7,18	1,13	8,1	bc
<i>Phytophthora cinnamomi</i> _1	Profu1PH	5,71	1,26	7,5	bc
<i>Calonectria</i> sp_1	Plaum16	7,48	0,95	7,4	bc
<i>Phytophthora heveae</i> _2	Profu4PH	5,03	1,01	5,5	cd
<i>Calonectria humicola</i>	Para5CLAb	2,2	0,75	1,6	de
<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	Plaum04B	1,78	0,81	1,4	de
<i>Calonectria</i> sp_2	Para5CLAa	1,85	0,6	1,1	e
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	Profu6FU	1,78	0,6	1	e
<i>Pleioconium algariense</i>	Jug4CAR	1,86	0,53	1	e
<i>Cylindrocladiella</i> sp.	Plaum06A	1,46	0,5	0,7	e
<i>Fusarium falciforme</i>	Pi3FU	2,41	0,38	0,6	e
<i>Gliocladiopsis peggii</i>	Per6CLA	1,6	0,38	0,6	e
<i>Fusarium oxysporum</i>	Para3FU	1,31	0,41	0,5	e
<i>Ilyonectria destructans</i>	Para2CAR	1,05	0,38	0,5	e
<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	Para3CLAb	0,91	0,38	0,3	e
<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	Viarro1CAR	0,65	0,48	0,3	e
<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Plaum07	0,58	0,25	0,1	e
Testigo	Testigo	0	0	0	e

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con Tukey (0,05)

En el grupo c, se encuentran tres de las cepas incluidas en el grupo anterior Ses4PH, Profu1PH, y Plaum16 (Tabla 4-4); además de una cepa de *P. heveae* (Profu4PH). En el d se agruparon las cepas Profu4PH, Para5CLAb y Plaum04B, identificadas como *P. heveae*, *Calonectria humicola* y *Cylindrocladiella peruviana* respectivamente. Particularmente este último grupo demostró poseer capacidad infectiva, pero con una menor severidad en comparación a los grupos a, b y c. Estos resultados son similares a los reportados por Aiello, *et al.*, (2020), quienes evaluaron la patogenicidad de dos cepas de *Cylindrocladiella peruviana* en tallos de aguacate e identificaron lesiones necróticas con longitudes entre 12-13 mm (Aiello *et al.*, 2020). En este estudio se identificó un promedio de lesión necrótica de 17 mm de longitud y un área (largo x ancho) promedio de lesión de 14 mm.

Figura 4-5: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass de 3 meses de edad, inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* en tallo. A) Flacidez y clorosis ocasionada por Per2PH seis días ddi. B) Marchitez y muerte ocasionada por Per2PH, nueve días ddi. C) Marchitez y muerte ocasionada por Ses4PH, 12 ddi. D) Testigo.



Figura 4-6: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, inoculadas con *Phytophthora heveae* en tallo. A) Marchitez ocasionada por Profru2PH seis días ddi. B) Marchitez y muerte ocasionada por Profru2PH, 12 días ddi. C) Marchitez y muerte ocasionada por Profru2PH, 18 ddi. D) Testigo.



Figura 4-7: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass de tres meses de edad, inoculadas con *Calonectria* sp. en tallo. A) Flacidez y clorosis ocasionada por *Calonectria* sp., seis ddi. B) Marchitez y muerte ocasionada por *Calonectria* sp., nueve ddi. C) Marchitez y muerte ocasionada por *Calonectria* sp., nueve ddi. D) Testigo.



Finalmente, en el grupo e se encuentran las cepas que no lograron demostrar una capacidad infectiva en plantas de aguacate Hass. Estas se identificaron como *Fusarium keratoplasticum*, *Pleioconium algariense*, *Cylindrocladiella* sp., *Fusarium falciforme*, *Gliocladiopsis peggii*, *Ilyonectria destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladiella lageniformis*, *Gliocladiopsis forsbergii*, *Campyloconium pseudofasciculare* y una *Calonectria* sp.. Probablemente algunas de las especies de las cepas recuperadas sean carácter endófito o saprofito en plantas de aguacate, teniendo en cuenta que los autores Aiello y Dann aislaron y comprobaron la patogenicidad en cepas de *Calonectria*, *Ilyonectria destructans* y *Pleioconium algariense* en plantas de aguacate (Aiello *et al.*, 2020; Dann *et al.*, 2012, 2011).

La evaluación de síntomas desarrollada durante un mes permitió observar síntomas de flacidez, clorosis, marchitez y muerte de las plantas inoculadas con las cepas de *P. cinnamomi* (Figura 4-5), *P. heveae* (Figura 4-6) y *Calonectria* (Figura 4-7).

En este estudio al igual que el realizado por Marulanda, (2018) los síntomas de flacidez y clorosis en planta se comenzaron a observar entre el tercer y sexto ddi. Asimismo, la muerte de las plantas se observó entre el sexto y noveno día después de haber sido

inoculadas con la cepa Per2PH de *Phytophthora cinnamomi*. La cepa más patogénica de *P. cinnamomi* evaluada por Marulanda, (2017), mostró una lesión necrótica de 15cm de longitud. En este estudio la cepa más patogénica de *P. cinnamomi* Per2PH mostró resultados aproximados con 11,3 cm de longitud en promedio de lesión necrótica (Marulanda, 2017).

Particularmente, las plantas de aguacate inoculadas con *Calonectria* sp. mostraron síntomas de flacidez y clorosis (Figura 4-7) seis ddi; también, se observó muerte de plántulas entre los seis y nueve días ddi en las cepas de *Calonectria* sp. patogénicas. En una de las cepas de *Calonectria* sp. no se logró observar reproducción de síntomas de marchitez (Para5CLAa). Las plantas inoculadas con *Fusarium keratoplasticum*, *Cylindrocladiella* sp., *Fusarium falciforme*, *Gliocladiopsis peggii*, *Ilyonectria destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladiella lageniformis*, *Gliocladiopsis forsbergii*, *Campylocarpon pseudofasciculare* y el testigo no mostraron síntomas.

Las especies de *Fusarium* son microorganismos ampliamente extendidos que agrupan cepas patógenas y no patógenas las cuales se asocian a las plantas como endófitos o saprofitos y estas pueden llegar a representar una amenaza significativa para los viveros de producción al ser causantes de pudrición de raíces, tallo y corona, manchas en hojas y marchitez vascular (K. Pegg & Maners, 2014). No obstante, las cepas evaluadas en este estudio no reprodujeron síntomas en las plantas de aguacate por lo tanto no se consideran patogénicas y probablemente se trate de microorganismos saprofitos o endófitos.

En este estudio se aisló e identificó una alta frecuencia de especies de *Cylindrocladiella* como *Cyl. parvispora* y *Cyl. lageniformis*. Este género ha sido constantemente recuperado de plantas con síntomas de marchitez. Sin embargo, en este estudio y otros realizados con especies de *Cyl. pseudoinfestans* y *Cyl. parva* no se logró demostrar su patogenicidad (Crous, 2002; Dann *et al.*, 2012; Darvas, 1978; Parkinson, 2017).

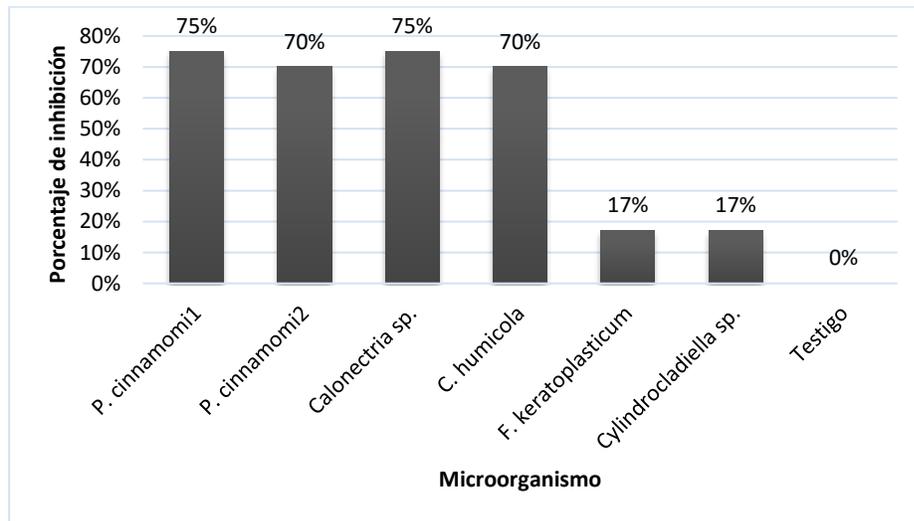
4.3.3 Pruebas de patogenicidad en semillas de aguacate Hass

El experimento de patogenicidad realizado con semillas de aguacate Hass, permitió corroborar la capacidad infectiva de dos cepas de *Calonectria* sp. preseleccionadas previamente en ensayos de frutos. Las dos cepas de *Calonectria* sp. evaluadas y otras dos

cepas de *P. cinnamomi*, poseen la capacidad de inhibir la germinación de las semillas de aguacate Hass entre un 70-75% (Figura 4-8), debido a la presencia de sus propágulos en el sustrato. Por otro lado, microorganismos como *F. keratoplasticum* y *Cylindrocladiella* sp. evidenciaron una inhibición del 17%. Posiblemente, las cepas de *F. keratoplasticum* y *Cylindrocladiella* sp. evaluadas presentan una menor capacidad patogénica ó requieren condiciones ambientales diferentes que favorezcan su colonización y posterior infección.

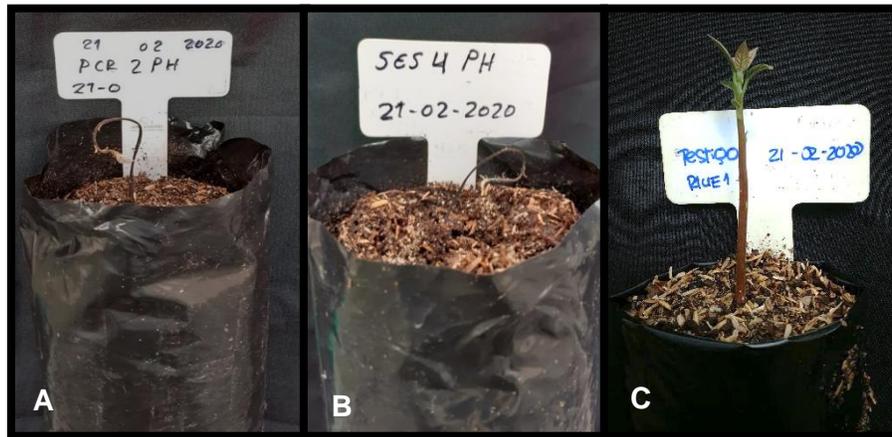
Según la literatura, en pruebas de patogenicidad realizadas a especies de *Fusarium* se ha recomendado valores de H.R. por encima del 76% para iniciar la formación de conidios y tener una esporulación abundante. En este estudio la humedad relativa estuvo entre el 46-59% (ver anexo F) permitiendo el desarrollo del hongo, pero no se considera la H.R. ideal para una abundante esporulación (Balășu, Cristea, Zală, & Oprea, 2015).

Figura 4-8: Porcentaje de inhibición de la germinación en semillas de aguacate Hass inoculadas con cepas aisladas de viveros del Valle del Cauca.



Las semillas de aguacate que lograron germinar después de las inoculaciones realizadas se evaluaron durante seis meses, logrando identificar síntomas de marchitez y muerte del material restante (20-25%), en las plantas que fueron inoculadas con *P. cinnamomi* (Figura 4-9) y *Calonectria* sp. (Figura 4-10). Es decir, que finalmente ninguna de las plantas infectadas con estos dos patógenos logró sobrevivir.

Figura 4-9: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass inoculadas con *P. cinnamomi*. A) cepa de *P. cinnamomi* Per2PH. B) Cepa de *P. cinnamomi* Ses4PH. C) Testigo.



En plantas infectadas con *P. cinnamomi* los síntomas se observaron un mes después de la inoculación, estos fueron apreciables desde el momento en que las plantas germinaron. La sintomatología comenzó con una leve flacidez del tallo, escaso desarrollo de hojas, pasando posteriormente a presentar secamiento y decaimiento total del tallo lo cual condujo a la muerte de las plantas. El tejido de la raíz afectada se desintegraba con facilidad y su coloración era marrón oscuro a negro. En algunos casos la raíz se observó totalmente descompuesta.

Varios autores han señalado la rapidez de algunas cepas de *P. cinnamomi* para infectar y matar plantas de aguacate, característica que se asocia a la velocidad con la que penetra y coloniza el tejido de la planta. Hardham, (1998), ha descrito el ciclo de enfermedad de *Phytophthora*, el cual inicia cuando los esporangios liberan zoosporas en respuesta a la presencia de aminoácidos y azúcares presentes en las raíces, estas zoosporas se adhieren, enquistan y germinan en tan solo 30 minutos mediante la formación de tubos germinativos que penetran rápidamente las células de la raíz. De acuerdo con (1961), la penetración ocurre aproximadamente 24 horas ddi y seis horas después de la penetración el tejido comienza a ser afectado ocasionando que en cuestión de días se observen pequeñas lesiones necróticas. Tres días después de la infección el patógeno esporula nuevamente formando esporangios que liberan zoosporas en la rizosfera, aumentando de esta manera el inoculo de la población rápidamente (Hardham, 1998).

Figura 4-10: Síntomas observados en plantas de aguacate Hass inoculadas con *Calonectria* sp. A) Cepa de *Calonectria* sp. dos meses ddi. B) Cepa de *Calonectria* sp. tres meses ddi. C) Cepa de *Calonectria* sp. cinco meses ddi. D) Testigo.



Los síntomas de marchitez ocasionados por *Calonectria* sp. en los ensayos de semillas que lograron germinar, se dieron con menor velocidad, logrando observar los primeros síntomas de marchitez entre 2-3 meses después de la inoculación. Los mecanismos de acción del microorganismo para colonizar el tejido aún son desconocidos, pero se ha descrito que algunas especies de *Calonectria* poseen el gen de la endopoligalacturonasa (endo-PG) (Cp_Cap14295) la cual regula significativamente la etapa media y posterior de la infección. Esta Endo-PG es secretado por el fitopatógeno para hidrolizar la pectina y macerar el tejido vegetal (Ye, Liu, Jin, Guo, & Huang, 2017).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Este estudio representa un referente del estado fitosanitario actual de los viveros productores de plantas de aguacate en el departamento del Valle del Cauca, donde se identificaron una amplia variedad de microorganismos como *P. cinnamomi*, *P. heveae*, *Calonectria humicola*, *Calonectria* sp., *Ilyonectria destructans*, *Cylindrocladiella peruviana*, *Cylindrocladiella* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Pleioocarpon algariense*, *Campylocarpon pseudofasciculare*, *Gliocladosis peggii*, *G. forsbergii*.

Se determinó una frecuencia de marchitez por pudrición de raíces del 81% en plantas de aguacate de viveros del Valle del Cauca, identificando los agentes causales de esta sintomatología como, *P. cinnamomi*, *P. heveae* y *Calonectria* sp.

Se logró la reproducción de síntomas de flacidez, clorosis, marchitez y muerte de plantas de aguacate con cepas de *P. cinnamomi*, *P. heveae* y *Calonectria* sp. las cuales pueden ser altamente patogénicas en fase de vivero y representan un alto riesgo para la fase de establecimiento del cultivo.

La caracterización molecular y el análisis filogenético de las cepas permitió una aproximación a la biología de estas y lo cual favorecerá el desarrollo de estrategias de manejo eficientes para la enfermedad causada por estos patógenos.

5.2 Recomendaciones

Se resalta la importancia de aplicar métodos de desinfección que permitan eliminar patógenos que habitan naturalmente en componentes del sustrato como tierra negra, arena y materia orgánica.

Se sugiere ampliar el muestreo incluyendo viveros de otras regiones para lograr determinar el estatus fitosanitario del país ante patógenos tan importantes como *Phytophthora* spp. y *Calonectria* spp.

Una identificación más completa de las cepas caracterizadas en este estudio mediante la inclusión de otras regiones genómicas que permitan una mejor resolución de la filogenia de las especies aisladas. Algunos autores han sugerido el uso de B-tubulina, Histona H3 y el factor de elongación TEF-1 α . De esta manera, se incrementarían las regiones de genes que proporcionan la información valiosa sobre las relaciones entre *Cylindrocladiella*, *Calonectria* y otros Nectriaceos.

Realizar más estudios para identificar el modo de acción de especies de *Calonectria* y *Phytophthora* involucradas en la marchitez del aguacate. Siendo, la prevención la principal estrategia de manejo ante estas enfermedades, cuya propagación es favorecida por el manejo inadecuado de los viveros a falta del uso de plantas sanas y sustratos libres de patógenos.

Adicionalmente, es de gran importancia continuar con el estudio filogenético y de patogenicidad de las *Cylindrocladiellas* encontradas y que no se agruparon con ninguna especie; enfocando esta búsqueda en la identificación de *Cyl. peruviana*, la cual ha sido aislada y cuenta con pruebas de patogenicidad que demuestran su capacidad para infectar y causar marchitez en plántulas de aguacate (Aiello *et al.*, 2020).

A. Anexo: Medios selectivos usados en la investigación

Agar PDA suplementado con antibióticos y fungicidas

Rehidratar 39 g del medio PDA sintético en un litro de agua destilada estéril, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Una vez esterilizado el medio de cultivo, se llevó a cabina de flujo laminar y antes de servir se adicionaron antibióticos y fungicidas. Aplicando 2 ml de cada solución de antibióticos y fungicidas por cada litro de medio PDA, exceptuando el Merteck cuya dosis fue de 1 ml por litro de medio PDA.

Solución madre de antibióticos y fungicidas

Antibiótico ó fungicida	Gramos	Etanol al 96%	Agua destilada estéril en ml
Ampicilina	0,005 gr	6,7ml = 6700 µl	13,3 ml = 13300 µl
Rifampicina	0,0002 gr	2,5 ml = 2500 µl	17,5 ml = 17500 µl
Penicilina	0,008 gr	6,7 ml = 6700 µl	13,3 ml = 13300 µl
PCNB	0,004 gr	17 ml = 17000 µl	3,0 ml = 3000 µl
Hymexazol	0,005 gr	10 ml = 10000 µl	10 ml = 10000 µl
Vancomicina	0,005 gr	3 ml = 3000 µl	17 ml = 17000 µl
Polimixina	0,005 gr	3 ml = 3000 µl	17 ml = 17000 µl
Merteck	Puro	No aplica	No aplica

Agar Spezieller Nährstoffarmer más extracto de levadura (SNAY)

Utilizado para identificación y mantención de especies de *Ilyonectria* (*Cylindrocarpon*) y *Fusarium* sp., además de estimular la esporulación (Brayford, 1993).

- KH_2PO_4 1,0 g
- KNO_3 1,0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg

- KCl 500 mg
- Glucosa 200 mg
- Sacarosa 200 mg
- Agar 20 g
- Extracto de levadura 1,0 g
- Agua destilada 1L

Agar Glucosa Aspargina

Un excelente medio para estudios taxonómicos y bioquímicos de especies de *Calonectria* sp. (*Cylindrocladium*) (Hunter, 1970).

- Glucosa 10 g
- Asparagina 2,0 g
- K_2HPO_4 1,0 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 500 mg
- KCl 500 mg
- Agua destilada 1L
- Agar 20g

Adicionar 1ml de solución de elementos menores y ajustar el pH a 6,5.

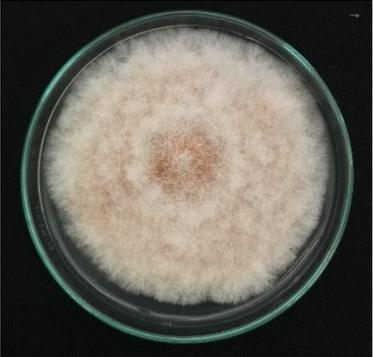
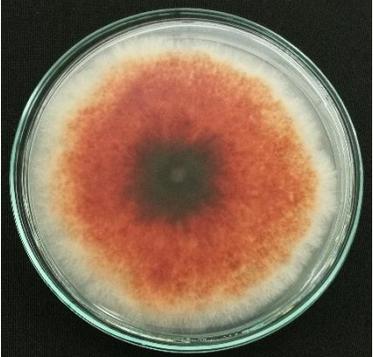
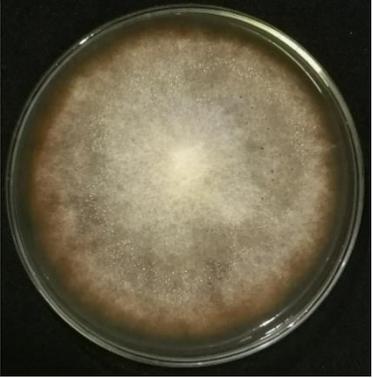
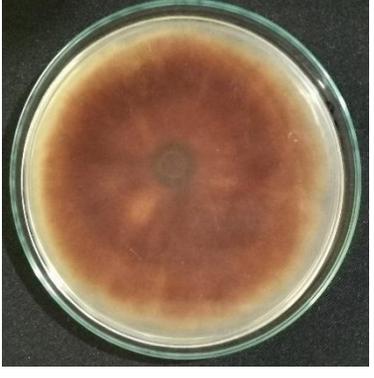
Solución de elementos menores (autoclavable).

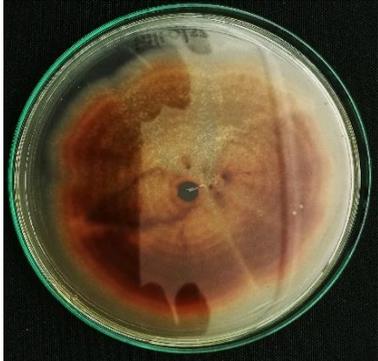
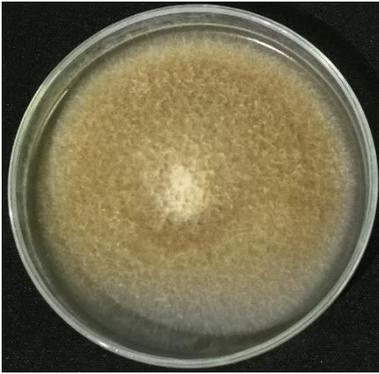
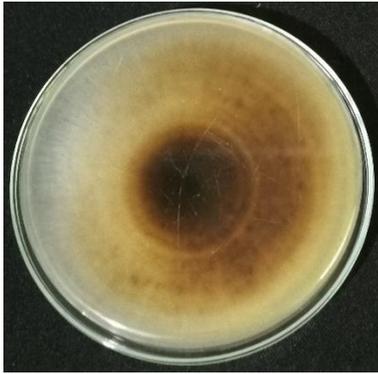
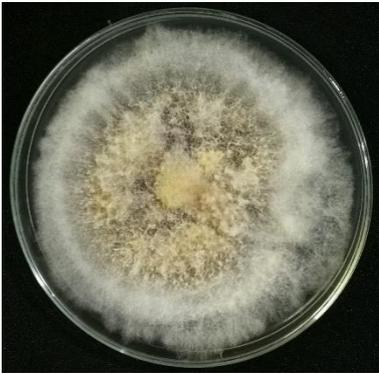
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 g
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,0 g
- H_3BO_3 1,0 g
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 500 mg
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 mg
- KI 100 mg
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 100 mg
- En 1L de agua destilada

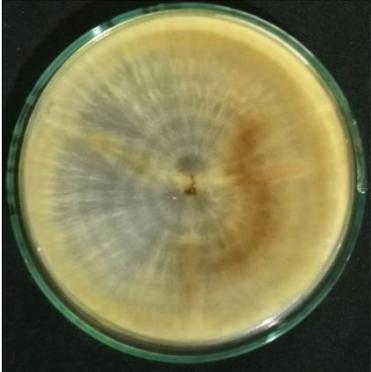
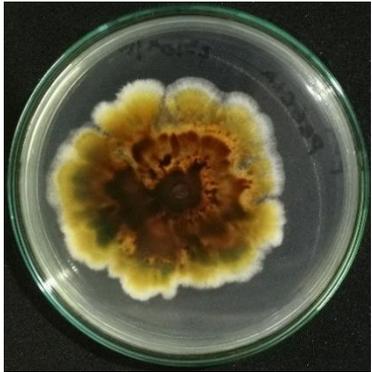
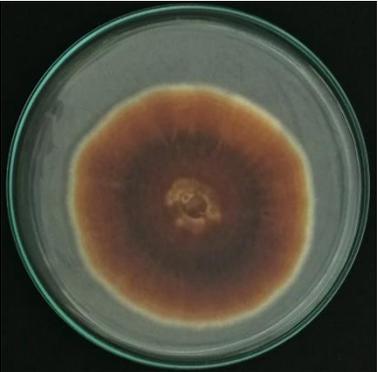
B. Anexo: Tasa de crecimiento de aislados de *Phytophthora*.

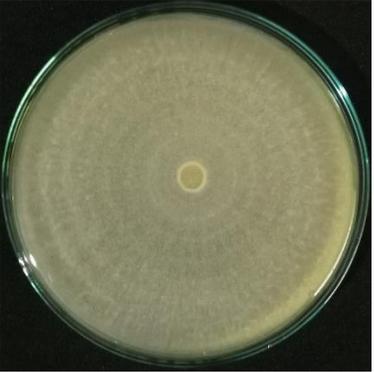
Código	Microorganismo	Tasa de Crecimiento	Colonización de caja Petri (días)	Patrón de colonia
Per2PH	<i>P. cinnamomi</i>	0,36	6	Rosaceo
Profriu2PH	<i>P. heveae</i>	0,28	12	Rosaceo
Ses4PH	<i>P. cinnamomi</i>	0,26	9	Rosaceo
Profriu1PH	<i>P. cinnamomi</i>	0,24	9	Rosaceo
Sofriu2PH	<i>P. cinnamomi</i>	0,23	12	Rosaceo
Profriu4PH	<i>P. heveae</i>	0,21	12	Rosaceo
Ses3PH	<i>P. cinnamomi</i>	0,15	15	Rosaceo
Profriu1PH	<i>P. cinnamomi</i>	0,14	12	Rosaceo

C. Anexo: Características morfológicas de los géneros de hongos Nectriaceos aislados.

Aislamiento	Anverso	Reverso
<p>Microorganismo: <i>Calonectria</i> sp.</p> <p>Código: Plaum 16</p> <p>Colores: 10R 3/6; 5YR 6/6; 7.5YR 8/1</p>		
<p>Microorganismo: <i>Calonectria humicola</i></p> <p>Código: Para5CLAb</p> <p>Colores: 7.5YR 8/1; 2.5YR 3/4; 10R 3/6</p>		

Aislamiento	Anverso	Reverso
<p>Microorganismo: <i>Ilyonectria destructans</i></p> <p>Código: Para2CAR</p> <p>Colores: 7.5YR 5/8; 7.5YR 4/4; 2.5Y 8/2</p>		
<p>Microorganismo: <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i></p> <p>Código: Plaum 07</p> <p>Colores: 2.5Y 6/4; 2.5Y 8/2; 7.5YR 5/4</p>		
<p>Microorganismo: <i>Cylindrocladiella lageniformis</i></p> <p>Código: Para3CLAa</p> <p>Colores: 2.5Y 6/4; 5Y 8/1; 7.5YR 4/4</p>		

Aislamiento	Anverso	Reverso
<p>Microorganismo: <i>Cylindrocladiella peruviana</i></p> <p>Código: Plaum04b</p> <p>Colores: 2.5Y 8/2; 7.5YR 5/6; 5YR 4/8</p>		
<p>Microorganismo: <i>Gliocladiopsis peggii</i></p> <p>Código: Per6CLA</p> <p>Colores: 7.5YR 5/6; 2.5Y 5/6; 7.5YR 8/1</p>		
<p>Microorganismo: <i>Gliocladiopsis forsbergii</i></p> <p>Código: Viarro1CAR</p> <p>Colores: 7.5YR 4/4; 7.5YR 5/8; 5Y 8/1</p>		

Aislamiento	Anverso	Reverso
<p>Microorganismo: <i>Fusarium oxysporum</i>.</p> <p>Código: Para3FU</p> <p>Colores: 7.5R 8/2; 2.5R 8/2</p>		
<p>Microorganismo: <i>Fusarium solani</i>.</p> <p>Código: Viarro8FU</p> <p>Colores: 5Y 8/1; 2.5Y 7/2</p>		

D. Anexo: Número de GenBank de secuencias parciales del espaciador transcrito interno ITS, usadas para el análisis filogenético de Nectriaceos.

Especie	Número de accesión	Localización	Aislado
<i>Calonectria asiatica</i>	GQ280550.1	Asia	CBS 114073
<i>Calonectria colombiana</i>	GQ280660.1	Colombia	CBS 115127
<i>Calonectria colombiensis</i>	GQ280567.1	Colombia	CBS 112221
<i>Calonectria hongkongensis</i>	GQ280582.1	Hong Kong	CBS 114711
<i>Calonectria humicola</i>	GQ280648.1	Ecuador	CBS 125251
<i>Calonectria ilicicola</i>	JN243760.1	Australia	BRIP 53653
<i>Calonectria malesiana</i>	GQ280595.1	Tailandia	CBS 112710
<i>Calonectria pini</i>	MH863601.1	Colombia	CBS 125523
<i>Campylocarpon fasciculare</i>	AY677303.1	Países bajos	CBS 113559
<i>Campylocarpon fasciculare</i>	AY677302.1	Países bajos	CBS 112614
<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	AY677305.1	Países bajos	CBS 112592
<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	AY677306.1	Sudáfrica	CBS 112679
<i>Cylindrocladiella arbusta</i>	MH017015.1	Vietnam	CMW47295
<i>Cylindrocladiella camelliae</i>	AF220952.1	Sudáfrica	CPC:234
<i>Cylindrocladiella clavata</i>	JN099096.1	Australia	CBS 129563
<i>Cylindrocladiella infestans</i>	AF220955.1	Nueva Zelanda	CBS 111795
<i>Cylindrocladiella lageniformis</i>	AF220959.1	Brasil	CBS 340.92
<i>Cylindrocladiella lanceolata</i>	JN099099.1	Australia	CBS 129566
<i>Cylindrocladiella microcylindrica</i>	AF220960.1	Sudáfrica	ATCC:38571
<i>Cylindrocladiella natalensis</i>	JN100588.1	Sudáfrica	CBS 114943
<i>Cylindrocladiella novaezelandiae</i>	AF220963.1	Nueva Zelanda	CBS 486.77
<i>Cylindrocladiella obpyriformis</i>	MH017022.1	Vietnam	CMW47194
<i>Cylindrocladiella parva</i>	AF220965.1	Sudáfrica	STE-U373
<i>Cylindrocladiella parvispora</i>	MH017025.1	Vietnam	CMW47197

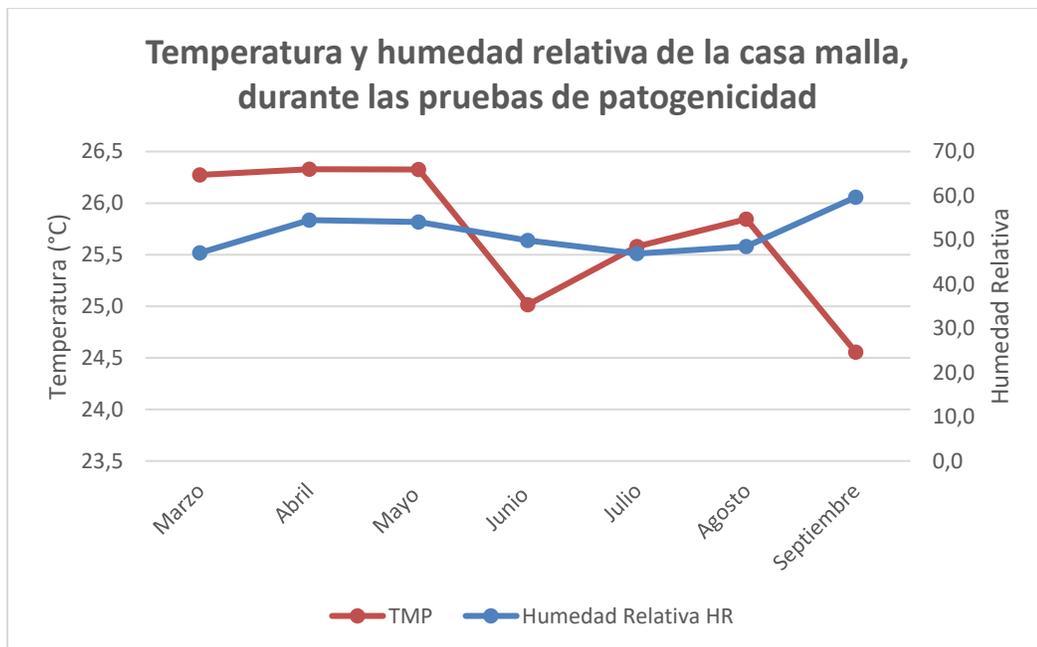
Especie	Número de accesión	Localización	Aislado
<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	AF220966.1	Perú	IMUR1843
<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	JN099123.1	Sudáfrica	CBS 114953
<i>Cylindrocladiella variabilis</i>	JN099119.1	India	CBS 375.93
<i>Cylindrocladiella viticola</i>	AY793468.1	Sudáfrica	CBS 112897
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	AY677290.1	Sudáfrica	CBS 112615
<i>Fusarium equiseti</i>	KC311517.1	Austria	SC1104_10
<i>Fusarium falciforme</i>	JF433061.1	Sri Lanka	S1953_G51
<i>Fusarium falciforme</i>	JF433073.1	Sri Lanka	S1973_Y354
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	DQ094632.1	USA	NRRL:32959
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	DQ094551.1	USA	NRRL:32780
<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ121297.1	India	GIFOZUHF
<i>Fusarium proliferatum</i>	KJ020897.1	China	8405
<i>Fusarium solani</i>	KF494125.1	Canadá	TVD_Fungal- Culture127
<i>Fusarium verticillioides</i>	KP267179.1	China	XJ14
<i>Gibberella fujikuroi</i>	JQ363726.1	Irán	F30
<i>Gliocladiopsis curvata</i>	JQ666050.1	Nueva Zelanda	CBS 112365
<i>Gliocladiopsis forsbergii</i>	KX274071.1	Australia, Nuevo gales del Sur	BRIP 61349a
<i>Gliocladiopsis irregularis</i>	AF220977.1	Indonesia	CBS 755.97
<i>Gliocladiopsis peggii</i>	KX274083.1	Australia: Queensland	BRIP 60983
<i>Gliocladiopsis pseudotenuis</i>	JQ666062.1	Indonesia	CBS 114763
<i>Gliocladiopsis sagariensis</i>	JQ666063.1	India	CBS 199.55
<i>Gliocladiopsis tenuis</i>	AF220981.1	China	CBS 116074
<i>Gliocladiopsis whileyi</i>	KX274086.1	Australia, Nuevo gales del Sur	BRIP 61430
<i>Ilyonectria destructans</i>	MH496589.1	Corea del Sur	17chu02-01
<i>Ilyonectria liliigena</i>	JF735298.1	Países bajos: Holanda	CBS 732.74
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	AY677264.1	Sudáfrica	CBS 112596
<i>Pleioconium algeriense</i>	MH587320.1	Argelia	WAM6
<i>Pleioconium livistonae</i>	MK539963.1	Sri Lanka	CBS 145030
<i>Pleioconium strelitziae</i>	KY304644.1	Italia	CPC 27628
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EU862195.1	China	CTSP F15

E. Anexo: Número de GenBank de secuencias parciales del espaciador transcrito interno ITS, usadas para el análisis filogenético de *Phytophthora*.

Espece	Número de accesoión	Localización	Aislado
<i>Phytophthora mirabilis</i>	AF266777.1	México	CBS678.85
<i>Phytophthora infestans</i>	AF266779.1	Países bajos	IMI66006
<i>Phytophthora phaseoli</i>	AF266778.1	Reino unido	CBS556.88
<i>Phytophthora nicotianae</i>	AF266776.1	Australia	UQ848
<i>Phytophthora cactorum</i>	AF266772.1	Reino unido	IMI296524
<i>Phytophthora palmivora</i>	AF266780.1	Papúa nueva Guinea	UQ1294
<i>Phytophthora megakarya</i>	AF266782.1	Ghana	IMI337104
<i>Phytophthora heveae</i>	AF266770.1	Malasia	IMI180616
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	AF266764.1	Malasia	UQ881
<i>Phytophthora capsici</i>	AF266787.1	India	IMI352321
<i>Phytophthora citricola</i>	AF266788.1	Irlanda	IMI031372
<i>Phytophthora megasperma</i>	AF541896.1	Australia	P1279
<i>Saprolegnia parasitica</i>	AB217688.1	Japón	IFO32780

F. Anexo: Condiciones ambientales de las pruebas de patogenicidad realizadas en casa de malla negra antiáfido.

Durante los meses de evaluación de los ensayos de patogenicidad en tallos y semillas, se monitorearon las condiciones ambientales de casa de malla (temperatura y humedad relativa). La temperatura registrada en la casa de malla osciló entre 24,6 y 26,3°C; la humedad relativa de los experimentos estuvo entre 46,9 y 59,7%.



De acuerdo con reportes de literatura, las temperaturas entre 25 y 30°C son adecuadas para el desarrollo de microorganismos como *Fusarium*, *Calonectria*, *Cylindrocladiella*, *Gliocladiopsis*, *Ilyonectria* y *Phytophthora*. Estas temperaturas favorecieron la supervivencia, esporulación y el desarrollo de la infección, lo cual se vio reflejado en el tamaño de la lesión y expresión de síntomas en la parte aérea de la planta ocasionados por los microorganismos patógenos (Almeida & Bolkan, 1981; Crous, 2002; Lombard & Crous, 2012; Zentmyer, 1984).

La humedad relativa registrada en los experimentos (46,9 - 59,7%) favoreció el desarrollo de síntomas ocasionados por *P. cinnamomi*, *P. heveae* y *Calonectria* sp.

6. Referencias bibliográficas

- Agnihotrudu, V. (1959). Notes on fungi from north-east India. *Transactions of the British Mycological Society*, 42(4), 458–462. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(59\)80046-2](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(59)80046-2)
- Agrios, G. (1995). *Fitopatología*. México: Limusa.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2013). Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 137(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0221-8>
- Agusti, B., & Armengol, J. (2012). Effects of temperature, pH and water potential on mycelial growth, sporulation and chlamydospore production in culture of *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 37–50. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Aiello, D., Gusella, G., Vitale, A., Guarnaccia, V., & Polizzi, G. (2020). *Cylindrocladiella peruviana* and *Pleiocarpon algeriense* causing stem and crown rot on avocado (*Persea americana*). *European Journal of Plant Pathology*, 158(2), 419–430. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02082-x>
- Alfenas, A., Edival, A., Valverde, E., Gonçalves, R., & Assis, T. F. de. (2009). *Clonagem e doenças do eucalipto* (2ª ed.). Universidad Federal de Viçosa.
- Alfonso, P., & Sandoval, S. (2008). *Evaluación “in Vitro” de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento*. Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana.
- Almeida, O. C., & Bolkan, H. A. (1981). Effects of soil humidity and incubation temperature on survival of *Cylindrocladium clavatum*. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 165–171.
- Álvarez, L. (2015). Eficacia fungicida en el control de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas de palto (*Persea americana*) con el uso del bioestimulante a base de algas marinas Fertimar®. En *VIII Congreso Mundial de la Palta* (pp. 135–141).
- Anderson, P. J. (1918). *Rose Canker and Its Control*. (Massachusetts Agricultural Experiment Station, Ed.). Massachusetts. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?id=Fb8UAAAAYAAJ&pg=PA27&dq=Rose+canker+and+its+control.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6nqCMrPvhAhWrTN8KHf6jCZ0Q6AEIKTAA>

- Andrade-Hoyos, Molina-Gayosso, Isidro-Cortes, Hernández-Leal, Cortés-Gonzalez, & Rivera-Sosa. (2017). Control biológico in vitro de *Phytophthora cinnamomi* con *Trichoderma* spp. En *V Congreso Latinoamericano del Aguacate* (pp. 147–153). México.
- Balășu, G., Cristea, S., Zală, R., & Oprea, M. (2015). The biological growth parameters of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *glycines* fungus. *Romanian Biotechnological Letters*, *20*(6), 10921–10928.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society. <https://doi.org/citeulike-article-id:5726464>
- Barrientos, P. F., & López, L. L. (2002). *Historia y genética del aguacate*. En: *Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México*. Coatepec de Harinas, México. Recuperado de http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1998/cictamex_1998_33-51.pdf
- Barron, G. L. (1968). *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Beltran, N. M., & Rincón López, J. D. (2015). Caracterización microbiológica y molecular de hongos fitopatógenos por PCR (ITS1 e ITS4), asociados a la marchitez del aguacate (*Persea americana*) en el departamento de Risaralda, 1–17. Recuperado de http://media.utp.edu.co/vicerrectoria-de-investigaciones/archivos/PONENCIA_CARACTERIZACION_MICROBIOLOGICA_Y_MOLECULAR_DE_HONGOS_FITOPATOGENOS.pdf
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L. C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova*, *5*(8), 147. <https://doi.org/10.22490/24629448.383>
- Bergh, B. (1992). The Origin, Nature, and Genetic Improvement of the Avocado. *California Avocado Society*, *76*, 61–75.
- Besoain, X., & Piontelli, E. (1999). Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. *Boletín Micológico*, *14*(1–2), 41–47.
- Betancourth Garcia, C., Salazar González, C., Lagos Mora, L. E., Díaz Rodríguez, V., & Mora Chaves, S. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *23*(1), 1–11. <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>
- Blair, J., Coffey, M., Park, S., Geiser, D., & Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(3), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.010>
- Bleach, C., Jones, E., Ridgway, H., & Jaspers, M. (2013). Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. *Phytopathologia Mediterranea*, *52*(2), 347–358.

- https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11815
- Boesewinkel, H. J. (1982a). *Cylindrocladiella*, a new genus to accommodate *Cylindrocladium parvum* and other small-spored species of *Cylindrocladium*. *Canadian Journal of Botany*, 60(11), 2288–2294. <https://doi.org/10.1139/b82-280>
- Boesewinkel, H. J. (1982b). Heterogeneity within *Cylindrocladium* and its teleomorphs. *Transactions of the British Mycological Society*, 78(3), 553–556. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(82\)80169-1](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(82)80169-1)
- Bolkan, H. A., Dianese, J. C., Ribeiro, W. R., & Almeida O. C. (1980). Disease caused by *Cylindrocladium* on potato tubers in Brazil. *Plant Disease*.
- Bolkan, H. A., Ribeiro, W. R., & C., A. O. (1981). Pathogenicity of *Cylindrocladium clavatum* Causing Potato Tuber Rot. *Plant Disease*, 65(1), 47–49. <https://doi.org/10.1094/pd-65-47>
- Booth, C. (1966). The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers*, 104, 1–56. Recuperado de <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=2138&Fields=All>
- Booth, C. (1971). *The Genus Fusarium*. Kew, UK, Commonwealth Mycological Institute. Recuperado de https://books.google.com.co/books/about/The_Genus_Fusarium.html?id=bTwIAQAA-MAAJ&redir_esc=y
- Booth, C., & Murray, J. S. (1960). *Calonectria hederæ* arnaud and its *Cylindrocladium* conidial state. *Transactions of the British Mycological Society*, 43(1), 69–72. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(60\)80008-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(60)80008-3)
- Brayford, D. (1993). *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. (L. Singleton, J. Mihail, & C. Rush, Eds.). St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Brown, B. N., & Ferreira, F. A. (2000). Diseases and pathogens of eucalypts. En P. Keane, G. Kile, F. Podger, & B. Brown (Eds.), *Disease during propagation of eucalypts* (pp. 119–152). Australia: CSIRO Publishing. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=8ZCnv-CIKvAC&oi=fnd&pg=PA119&dq=Disease+during+propagation+of+eucalyptus.+In:+Diseases+and+pathogens+of+eucalypts.&ots=9Rd1tFFrhW&sig=gdkUqdn0qS704F70xGRtSralrCc#v=onepage&q=Disease+during+propagation+of+euca>
- Bugbee, W. M., & Anderson, N. A. (1963). Infection of spruce seedlings by *Cylindrocladium scoparium*. *Phytopathology*, 53, 1267–1271.
- Bugnicourt, F., & Guilliermond, A. (1939). *Les fusarium et cylindrocarpon de l'Indochine*. *Encyclopédie Mycologique*. Paris.
- Buriticá, P. (1999). *Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia*. Medellín: Instituto Colombiano Agropecuario.
- Casale, W. L. (1993). Analysis of Suppressive Soils and Development of Methods for

- Biocontrol of Phytophthora Root Rot. *Society*, 48–50. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301732196>
- Chang, Y., Chang, Y., Baker, R., Kleifeld, O., & Chet, I. (1986). Increased Growth of Plants in the Presence of the Biological Control Agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 70(2), 145. <https://doi.org/10.1094/pd-70-145>
- Channon, A. G., & Thomson, M. C. (1981). Parsnip canker caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Plant Pathology*, 30(3), 181–181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1981.tb01253.x>
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A., & Samuels, G. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68, 57–78. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>
- Ciro, D., Rendón, K., Navarro, R., & Gaviria, B. (2006). Reconocimiento de la pudrición de raíces (*Phytophthora cinnamomi* Rands) en Aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia. *Revista Universidad Católica de Oriente*, 22(0121–1463), 41–52.
- Cooke, D., Drenth, A., Duncan, J., Wagels, G., & Brasier, C. (2000). A molecular phylogeny of phytophthora and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1), 17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Corpohass. (2020). *Plan estratégico cadena de aguacate*.
- Cox, R. S. (1953). Etiology and control of a serious complex of diseases of conifer seedlings. *Journal of Phytopathology*, 43–469.
- Coyier, D., & Roane, M. (1988). Diseases Caused by Infectious Agents. En R. Linderman & M. Benson (Eds.), *Compendium of Rhododendron and Azalea Diseases* (2ª ed., pp. 5–58). St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544396.002>
- Crous, P. W. (2002). *Taxonomy and Pathology of Cylindrocladium (Calonectria) and Allied Genera*. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J., Simoneau, P., & Nigél, L. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50, 415–430.
- Crous, P. W., Hawksworth, D. L., & Wingfield, M. J. (2015). Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 247–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120245>
- Crous, P. W., Phillips, A. J. L., & Wingfield, M. J. (1991). The genera *cylindrocladium* and *cylindrocladiella* in South Africa, With special reference to forest nurseries. *South African Forestry Journal*, 157(1), 69–85. <https://doi.org/10.1080/00382167.1991.9629103>
- Crous, P. W., & Wingfield, M. J. (1993). A re-evaluation of *Cylindrocladiella*, and a comparison with morphologically similar genera. *Mycological Research*, 97(4), 433–448. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80131-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80131-7)

- Crous, P. W., & Wingfield, M. J. (1994). A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon*, 51, 341–435.
- DANE. (2019). *Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA)*. *Boletín Técnico*.
- Dann, E., Cooke, A. W., Forsberg, L. I., Pegg, K. G., Tan, Y.-P., & Shivas, R. G. (2012). Pathogenicity studies in avocado with three nectriaceous fungi, *Calonectria ilicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria liriodendri*. *Plant Pathology*, 61(5), 896–902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02579.x>
- Dann, E., Forsberg, L., Cooke, A., Pegg, K., Shivas, R., & Tan, Y. P. (2011). The “Cylindro” complex of avocado root pathogens. En *Proceedings VII World Avocado Congress 2011* (pp. 1–7). Cairns, Australia.
- Darvas, J. M. (1978). Common root pathogens from avocados. *South African Avocado Growers' Association Research Report*, 2, 3–4. Recuperado de http://avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA_1978/SAAGA_1978_PG_3-4.pdf
- Daughtrey, M., Wick, R., & Peterson, J. (1994). *Compendium of flowering potted plant diseases*. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Degani, C., El-Batsri, R., Hamo, M., Shaya, F., Regev, I., & Lahav, E. (2003). Autopolinización y polinización cruzada en el aguacate. En *Congreso mundial del aguacate V* (pp. 96–97).
- Diaz, D., Osorio, T., Tamayo, V., Osorio, V., Córdoba, G., Londoño, Z., ... Bernal, E. (2014). *Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacate*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12616>
- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (1981). *Compendium of Soil Fungi* (1ª ed.). London: Academic Press (London) .
- Drenth, A., & Sendall, B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora* practical guide to detection and. *CRC for Tropical Plant Protection*, 1, 1–41.
- Duque, L. (2011). *Asfixia radicular estrategias de manejo en Colombia*. *Proceedings VII World Avocado Congress*.
- Duvenhage, J. A., & Kotze, J. M. (1993). Biocontrol of root rot of avocado seedlings. *Yearbook South African Avocado Growers' Association*, 16, 70–72.
- EVA. (2018). *Evaluaciones Agropecuarias municipales de 2007-2018*.
- FAO. (2020). Major Tropical Fruits Market Review 2019, 24. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tropical_Fruits/Documents/CA2895EN.pdf
- FAOSTAT. (2018). FAOSTAT. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Farr, D., & Rossman, A. (2020). Fungal databases, systematic mycology and microbiology

- laboratory, ARS, USDA. Recuperado 26 de noviembre de 2020, de <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>
- Ferreira, F. A. (1989). *Patologia Florestal. Principais doenças florestais no Brasil. Sociedade de Investigações Florestais*. Viçosa.
- Finlay, A., & McCracken, A. (1991). Microbial suppression of *Phytophthora cinnamomi*. En Cambridge University Press (Ed.), *Phytophthora* (pp. 383–398). UK.
- Fletcher, J. T., & Martin. (1972). Spread and control of *Fusarium* wilt of carnations. *Plant Pathology*, 21, 182–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1972.tb01756.x>
- French, R., & Hebert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A8740e/A8740e.pdf>
- Gallagher, R. (2000). Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Neuroscience*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cpim.20>
- Gallardo, P. (2004). *Control químico y estudio de la diseminación de Fusarium oxysporum en huertos comerciales de Babaco en los valles de Tumbaco y los Chilllos*. Universidad central del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de https://books.google.com.co/books?id=boQzAQAAMAAJ&pg=PA10&lpg=PA10&dq=El+género+Fusarium+fue+definido+por+Link+en+1809&source=bl&ots=cExh3n7fWu&sig=ACfU3U3wJicBgmNEkwNmCVW4k_tEkCxFYQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjFqx_Fr9_oAhXImuAKHdR7Cx8Q6AEwBHoECAwQMg#v=onepage
- Gazit, S., & Degani, C. (2007). Biología reproductiva. En A. W. Whiley, B. Shaffer, & B. Wolstenholme (Eds.), *El Palto. Botánica, Producción y Usos*. (pp. 103–131). Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Gees, R., & Coffey, M. (1989). Evaluation of a Strain of *Myrothecium roridum* as a Potential Biocontrol Agent Against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 79(10), 1079. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-1079>
- Grasso, S. (1984). Infection of *Fusarium oxysporum* and *Cylindrocarpon destructans*, associated with a grapevine decline in a vineyard of eastern Sicily. *Informatore Fitopatologico*, 34, 59–62.
- Graves, A. H. (1915). Root rot of coniferous seedlings. *Phytopathology*, 5, 213–217.
- Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, S55–S67. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1845
- Halleen, F., Schroers, H. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, 50(2), 431–455.
- Halleen, F., Schroers, H. J., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. W. (2006). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of

- grapevines. *Studies in Mycology*, 55(1966), 227–234.
<https://doi.org/10.3114/sim.55.1.227>
- Hardham, A. (1998). Cell Biology of *Phytophthora cinnamomi*. En P. Gadek (Ed.), *Patch deaths in tropical Queensland rainforests: association and impact of Phytophthora cinnamomi and other soil borne organisms* (p. 98). Cairns: Cooperative Research Centre for Tropical Rainforest.
- Hawksworth, D. L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus*, 2(2), 155–162. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.06>
- Hawksworth, D. L. (2012). Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA Fungus*, 3(1), 15–24. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2012.03.01.03>
- Herder, M. (2014). *Identification of Ilyonectria species associated with and determining their role in Avocado decline*. Lincoln University. Lincoln University. Recuperado de <https://researcharchive.lincoln.ac.nz/handle/10182/6467>
- Hernández, A. (2016). *Identificación Morfológica y Molecular de los Fitopatógenos Asociados al Aguacatero en Michoacán*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411–446. <https://doi.org/10.1086/417338>
- Hodges, C., & Cardoso, L. (1972). A root disease of pine, Araucaria, and Eucalyptus in Brazil caused by a new species of *Cylindrocladium*. *Phytopathology*, 62, 898–901. Recuperado de http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1972Articles/Phyto62n08_898.PDF
- Hollowell, J. E., Shew, B. B., Beute, M. K., & Abad, Z. G. (1998). Occurrence of Pod Rot Pathogens in Peanuts Grown in North Carolina. *Plant Disease*, 82(12), 1345–1349. <https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.12.1345>
- Hunter, B. B. (1970). *Nutritional and environmental factors affecting growth, sporulation and sclerotial formation of species of Cylindrocladium*. West Virginia University, Morgantown.
- Inderbitzin, P., Bostock, R., & Subbarao, K. (2012). *Cylindrocladiella hahajimaensis*, a new species of *Cylindrocladiella* transferred from *Verticillium*. *MycKeys*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.4.2619>
- IPGRI. (1995). *Descriptores para aguacate (Persea spp.)*. Roma, Italia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos.

- of the genus *Cylindrocladiella*. *Mycological Progress*, 11(4), 835–868. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0799-1>
- Lombard, L., van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2014). Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 241–252. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Lombard, L., van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80, 189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- López, C., & Melero, J. (1992). Diseases of avocado caused by soil fungi in the southern mediterranean coast of Spain. En *Proceedings of Second World Avocado Congress* (pp. 119–121). Recuperado de http://www.avocadosource.com/WAC2/WAC2_p119.pdf
- López, H., Pérez, J., Llobel, A., Monte, V., & Zea, B. (1999). Estudios In VIVO de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en Aguacate. *Chapingo Serie Horticultura*, 5, 261–265.
- Marulanda, C. (2017). Identificación de aislamientos de *Phytophthora* asociados al cultivo de aguacate en el sur occidente de Colombia. *Corpoica*, 244.
- Massey, L. M. . (1917). The crown canker disease of rose. *Phytopathology*, 7, 408–417.
- Matuo, T., & Miyazawa, Y. (1984). Scientific name of *Cylindrocarpon* sp. causing root rot of ginseng. *Japanese Journal of Phytopathology*, 50(5), 649–652. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.50.649>
- McLeod, A., Labuschagne, N., & Kotze, J. M. (1995). Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bark medium artificially infested with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 32–37. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ZA9600500>
- Mejía, A. (2015). Perspectivas del aguacate Hass en Colombia. En *Actas VIII Congreso Mundial de la Palta 2015* (pp. 477–479). Lima. Recuperado de http://www.avocadosource.com/WAC8/Section_07/MejiaHernandezAE2015.pdf
- Minagricultura. (2019). *Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural*. Recuperado de <https://sioc.minagricultura.gov.co/Aguacate/Documentos/2019-09-30> Cifras Sectoriales.pdf
- Mohanan, C., Sharma, J. ., Nair, C. T. ., Kedharnath, S., & Kondas, S. (1986). Epidemiology of *Cylindrocladium* diseases of Eucalyptus. Eucalypts in India. Past, Present and Future. *Proceedings of the national seminar held at Kerala Forest Research Institute, Peechi, Kerala, India.*, 388–394.
- Montecchio, L. (1995). First Report of *Cylindrocarpon destructans* on English Walnut in Italy. *Plant Disease*, 79, 967. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0967B>
- Morales, E., Lino, M., Eddy, O., & Castellanos, P. (2020). Evaluación de la capacidad antagónica in vitro de cepas de *Trichoderma* spp frente a *Phytophthora cinnamomi*,

- fitopatígeno de *Persea americana* (Palta) In vitro antagonistic capacity evaluation of *Trichoderma* spp strains against. *Ciencia e Investigación*, 23(1), 65–70.
- Morales, J., Azpíroz, H., & Pedraza, M. (2009). *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill .) en Michoacán , México. *Revista UDO Agrícola.*, 9(4), 848–856.
- Munkvold, G. P. (2017). *Fusarium Species and Their Associated Mycotoxins*. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1542, pp. 51–106). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4
- Nelson, P. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En M. E. Mace, A. A. Bell, & C. H. Beckman (Eds.), *Fungal Wilt Diseases of Plants* (pp. 51–80). New York: Academic Press. Recuperado de <http://www.oalib.com/references/11358707>
- Newett, S. D., Crane, J. H., & Balerdi, C. F. (2007). Cultivares y Portainjertos. En A. W. Whiley, B. Schaffer, & B. N. Wolstenholme (Eds.), *El palto: botánica, producción y usos* (pp. 155–175). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso. Recuperado de <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:El+palto:+Botánica,+producción+y+usos.#1>
- Nicolaisen, M., Suproniene, S., Nielsen, L., Lazzaro, I., Spliid, N., & Justesen, A. (2009). Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.016>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Outram, M. A. (2013). *Identification of the individual species within the Ilyonectria macrodidyma complex that cause black foot disease of grapevines in New Zealand*. Lincoln University.
- Parkinson, L. (2017). *Investigating soilborne nectriaceous fungi impacting avocado tree establishment in Australia*. The University of Queensland.
- Parkinson, L., Le, D., Shivas, R., & Dann, E. (2019). Pathogenicity and molecular detection of Nectriaceous fungi Associated with black root rot of avocado. En *IX World Avocado Congress* (pp. 23–27). Medellín, Colombia.
- Parkinson, L., Shivas, R., & Dann, E. (2016). Novel species of *Gliocladiopsis* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) from avocado roots (*Persea americana*) in Australia. *Mycoscience*, 58(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.10.004>
- Pataky, J. K., & Beute, M. K. (1983). Effects of inoculum burial, temperature, and soil moisture on survival of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in North Carolina. *Plant Disease*, 67, 1379–1382.
- Pathrose, B. (2012). *Characterising sub-species variation in New Zealand Cylindrocarpon*

- species that cause black foot of grapevines*. Lincoln University.
- Peerally, A. (1991). The Classification and Phytopathology of *Cylindrocladium* Species. *Mycotaxon*, 40, 323–366. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9129262>
- Pegg, K. G., Coates, L. M., Korsten, L., & Harding, R. M. (2002). Foliar, fruit and soilborne diseases. En A. W. Whiley, B. Schaffer, & B. N. Wolstenholme (Eds.), *Avocado: Botany, Production and Uses*. (pp. 299–338). CABI.
- Pegg, K., & Maners, A. (2014). *Soilborne root pathogens in production nurseries*. Queensland.
- Petit, E., Barriault, E., Baumgartner, K., Wilcox, W. F., & Rolshausen, P. E. (2011). *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(2), 177–183. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10112>
- Pham, N. Q., Barnes, I., Chen, S. F., Pham, T. Q., Lombard, L., Crous, P. W., & Wingfield, M. J. (2018). New species of *Cylindrocladiella* from plantation soils in South-East Asia. *MycKeys*, 32, 1–24. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.32.23754>
- Phipps, P. M., & Beute, M. K. (1979). Population Dynamics of *Cylindrocladium crotalariae* *Microsclerotia* in Naturally-Infested Soil. *Phytopathology*, 69, 240–243. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n03_240.PDF
- Probst, C. M. (2011). *Cylindrocarpon Black Foot Disease in Grapevines Identification and Epidemiology*. Lincoln University.
- Procolombia. (2019). Colombia apuesta por un aguacate Hass cada vez más sostenible . Recuperado 20 de noviembre de 2020, de <https://procolombia.co/noticias/colombia-apuesta-por-un-aguacate-hass-cada-vez-mas-sostenible>
- Radwan, M., & Hassan, M. (2018). Control of Avocado (*Persea americana* Miller) Damping-off and Root Rot Diseases in Egypt. *Plant Pathology*, 9(9), 577–585.
- Raeder, U. and Broda, P. (1985) Rapid Preparation of DNA from Filamentous Fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rahman, M., & Punja, Z. (2005). Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 95(12), 1381–1390.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramírez, G. (2013). *Incidencia, diagnóstico, comportamiento y alternativas de manejo de la marchitez del Aguacate con énfasis en Phytophthora cinnamomi* Rands. Universidad Nacional de Colombia.
- Ramírez, G. (2018). Avocado wilt complex disease, implications and management in

- Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 71(2), 8525–8541. <https://doi.org/10.15446/rfna.v71n2.66465>
- Ramírez, G., Castañeda, D., & Morales, J. (2014). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*, 61–1, 050–061. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Ramírez, G., Gilchrist, R., & Morales, O. (2017). Economic impact of the avocado (cv. Hass) wilt disease complex in Antioquia, Colombia, crops under different technological management levels. *Crop Protection*, 101, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.023>
- Ramírez, G., & Morales, J. (2013). Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill) en Colombia. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 27–35. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100004
- Ramírez, G., & Morales, O. (2019). Polyphasic identification of preharvest pathologies and disorders in avocado cv. Hass. *Agronomía Colombiana*, 37(3), 249–263. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n3.78528>
- Reeves, R. J. (1975). Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* rands in different soils and water regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 7(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(75\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(75)90025-5)
- Rengasamy, P. (2000). Subsoil Constraints and Agricultural Productivity-Indian Journals. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 48(4), 674–682. Recuperado de <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jisss&volume=48&issue=4&article=004>
- Rossmann, A. Y. (1983). *The phragmosporous species of Nectria and related genera (Calonectria, Ophionectria, Paranectria, Scoleconectria and Trichonectria)* (Volumen 15). Mycological Papers.
- Rossmann, A. Y., Seifert, K. A., Samuels, G. J., Minnis, A. M., Schroers, H.-J., Lombard, L., ... Chaverri, P. (2013). Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus*, 4(1), 41–51. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.05>
- Roth, D. A., Griffin, G. J., & Graham, P. J. (1979). Low temperature induces decreased germinability of *Cylindrocladium microsclerotia*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(2), 157–162. <https://doi.org/10.1139/m79-024>
- Saksena, S. B. (1954). A New Genus of Moniliaceae. *Mycologia*, 46(5), 660–666. <https://doi.org/10.1080/00275514.1954.12024402>
- Salтарén, L., Varón de Agudelo, F., & Marmolejo, F. (1998). Patógenos radicales en material de propagación de aguacate (*Persea americana* Mill). *Fitopatología Colombiana*, 22(2), 52-58.
- Salтарén, L., Varón, F., & Marmolejo, F. (1999). *Cylindrocladium* sp. asociado con muerte de plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en viveros del Valle y Risaralda. *Fitopatología Colombiana*, 22–2(0120–0143), 52–58.

- Sarasola, A., & Rocca M. (1975). *Fitopatología. Curso moderno*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur.
- Scattolin, L., & Montecchio, L. (2007). First Report of Damping-Off of Common Oak Plantlets Caused by *Cylindrocladiella parva* in Italy. *Plant Disease*, 91(6), 771–771. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-6-0771b>
- Schoch, C. L., Crous, P. W., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2000). Phylogeny of *Calonectria* and selected hypocrealean genera with cylindrical macroconidia. *Studies in Mycology*, 45, 45–62. Recuperado de <https://nzfungi2.landcareresearch.co.nz/WebForms/LiteratureDetails.aspx?RefUPk=E15C8C47-B716-11D5-BEBB-00508BCA8DE8>
- Schoch, L., Seifert, A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, L., Levesque, C., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Scora, R., & Bergh, B. (1992). Origin of and Taxonomic Relationships within the Genus *Persea*. En *Second World Avocado Congress* (pp. 505–514).
- Scora, R., Wolstenholme, B., & Lavi, U. (2007). Taxonomía y Botánica. En A. Whinley, B. Schaffer, & B. Wolstenholme (Eds.), *El Palto. Botánica, Producción y Usos*. (pp. 25–46). Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Seifert, K. A., McMullen, C. R., Yee, D., Reeleder, R. D., & Dobinson, K. F. (2003). Molecular differentiation and detection of Ginseng-Adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 93(12), 1533–1542. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.12.1533>
- Sharma, J. K., & Mohanan, C. (1982). *Cylindrocladium* spp. associated with various diseases of Eucalyptus in Kerala. *Forest Pathology*, 12(3), 129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1982.tb01385.x>
- Sharma, J. K., & Mohanan, C. (1991). In vitro evaluation of fungicides against *Cylindrocladium* spp. causing diseases of Eucalyptus in Kerala, India. *European Journal of Forest Pathology*, 21(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1991.tb00298.x>
- Silva Rojas, H. V., & Ávila Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: A novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5), 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Smith, C. E. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, 20(2), 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02904012>
- Smith, V. L., Wilcox, W., & Harman, G. (1990). Potential for Biological Control of Phytophthora Root and Crown Rots of Apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-80-880>
- Snyder, W. C., & Hansen, H. N. (1945). The Species Concept in *Fusarium* with Reference

- to Discolor and Other sections. *American Journal of Botany*, 32(10), 657–666.
- Sobers, E. K., & Littrell, R. H. (1974). Pathogenicity of three species of *Cylindrocladium* to select hosts [Peanuts, soybeans, *Cylindrocladium crotalariae*, *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocladium scoparium*]. *Plant Disease*, (0032–0811), 1017–1019.
- Szteinberg, A., Freeman, S., Chet, I., & Katan, J. (1987). Control of *Rosellinia necatrix* in Soil and in Apple Orchard by Solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 71(4), 365. <https://doi.org/10.1094/pd-71-0365>
- Tamayo, P. (2007). Enfermedades del Aguacate*. *Revista Politécnica*, 4, 51–70. Recuperado de <http://132.248.9.34/hevila/Revistapolitecnica/2007/no4/2.pdf>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013, diciembre). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taniguchi, T., Tanaka, C., Tamai, S., Yamanaka, N., & Futai, K. (2008). Identification of *Cylindrocladium* sp. causing damping-off disease of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) and factor affecting the disease severity in a black locust (*Robinia pseudoacacia*)-dominated area. *Journal of Forest Research*, 13(4), 233–240. <https://doi.org/10.1007/s10310-008-0076-6>
- Taylor, J. D., Griffin, G. J., & Garren, K. H. (1981). Inoculum pattern, inoculum density-disease incidence relationships and population fluctuations of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in peanut field soil. *Phytopathology*, 71, 1297–1302. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n12_1297.PDF
- Téliz, O. D. (2000). *El aguacate y su manejo integrado*. México D.F.: Mundi-Prensa. Recuperado de <https://www.worldcat.org/title/aguacate-y-su-manejo-integrado/oclc/807357915?referer=di&ht=edition>
- Tramier, R. J., Pionnat, J. C., & Metay, C. (1983). Epidemiology of *Fusarium* wilt during propagation of carnation. *Acta Horticulturae (Netherlands)*, 141, 71–77.
- Ttacca, L., & Mattos, C. (2016). Hongos Fitopatógenos asociados a semillas de palto (*Persea Americana* mill). *Revista Investigación Altoandina*, 18(2313–2957), 423–429. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18271/ria.2016.234>
- Ulloa, M., & Hanlin, R. T. (2000). *Illustrated dictionary of mycology*. APS Press. Recuperado de <https://my.apsnet.org/ItemDetail?iProductCode=44006&WebsiteKey=2661527a-8d44-496c-a730-8cfeb6239be7>
- Van Coller, G. J., Denman, S., Groenewald, J. Z., Lamprecht, S. C., & Crous, P. W. (2005). Characterisation and pathogenicity of *Cylindrocladiella* spp. associated with root and cutting rot symptoms of grapevines in nurseries. *Australasian Plant Pathology*, 34(4), 489–498. <https://doi.org/10.1071/AP05058>
- Vargas, W. G. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales*. Manizales: Universidad de Caldas.

- Victor, D., Crous, P., Janse, B., Van Zyl, W., Wingfield, M., & Alfenas, A. (1998). Systematic appraisal of species complexes within *Cylindrocladiella*, 102(3), 273–279.
- Villa, N., Kageyama, K., Asano, T., & Suga, H. (2006). Phylogenetic Relationships of *Pythium* and *Phytophthora* Species Based on ITS rDNA , Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA , cytochrome oxidase II and , B-tubulin gene sequences. *Mycological Society of America*, 98(3), 410–422.
- Vinchira, D., Macias, J., Mendez, J., Méndez, M., Rodríguez, V., Saavedra, Z., ... Moreno, N. (2020). Presence of phytopathogenic fungi and oomycetes on rice and avocado crops in Tolima (Colombia). *African Journal of Microbiology Research*, 14(6), 259–272. <https://doi.org/10.5897/ajmr2020.9331>
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G., & Polizzi, G. (2012). First report of root rot caused by *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160(3), 156–159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x>
- Vitale, Alessandro, Cirvilleri, G., Castello, I., Aiello, D., & Polizzi, G. (2012). Evaluation of *Trichoderma harzianum* strain T22 as biological control agent of *Calonectria pauciramosa*. *BioControl*, 57(5), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9423-1>
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-konishi, Y., & Goto, K. (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BioMed Central*, 11(322), 1–16. Recuperado de <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/322>
- Weckert, M. A., Nair, N. G., Lamont, R., Alonso, M., Priest, M. J., & Huang, R. (2007). Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 36(5), 403–406. <https://doi.org/10.1071/AP07041>
- Whiley, A. W., Saranah, J. B., Cull, B. W., & Pegg, K. G. (1988). Manage avocado tree growth cycles for productivity gains. *Queensland Agriculture Journal*, 14, 29–36.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). New York: Academic Press.
- Williams, L. O. (1977). The avocados, a synopsis of the Genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31, 315–320. <https://doi.org/10.2307/4253853>
- Windham, M. T., Elad, Y., & Baker, R. (1986). A Mechanism for Increased Plant Growth Induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-76-518>
- Wollenweber, H. W., & Reinking, O. A. (1935). *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Berlin, Germany: P. Parey.
- Yabrudy, J. (2012). El aguacate en Colombia : Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano. *Documento de Trabajo Sobre Economía Regional. Publicación del Banco de la República – Sucursal Cartagena*, 45. Recuperado de <https://www.mendeley.com/catalogue/el-aguacate-en-colombia-estudio-caso-los-montes-maria-en-el-caribe-colombiano/>

- Yang, X., Tyler, B., & Hong, C. (2017). An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus*, 8(2), 355–384. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2017.08.02.09>
- Ye, X., Liu, H., Jin, Y., Guo, M., & Huang, A. (2017). Transcriptomic Analysis of *Calonectria pseudoreteauidii* during Various Stages of Eucalyptus Infection. *PLOS ONE*, 12 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169598>
- Yli-Mattila, T., Mach, R. L., Alekhina, I. A., Bulat, S. A., Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C. M., ... Klemsdal, S. S. (2004). Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 267–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.006>
- Zentmyer, G. A. (1984). Avocado diseases. *Tropical Pest Management*, 30(4), 388–400. <https://doi.org/10.1080/09670878409370915>
- Zilberstein, M., Noy, M., Levy, E., Elkind, G., Zeidan, M., Teverovski, E., & Ze'ev, I. B. (2007). Wilting disease young of avocado trees caused by *Neonectria radicolain* Israel. En *Proceedings VI World Avocado Congress 2007* (pp. 25–30). Viña del Mar, Chile.