

Capítulo V

Prueba de patogenicidad

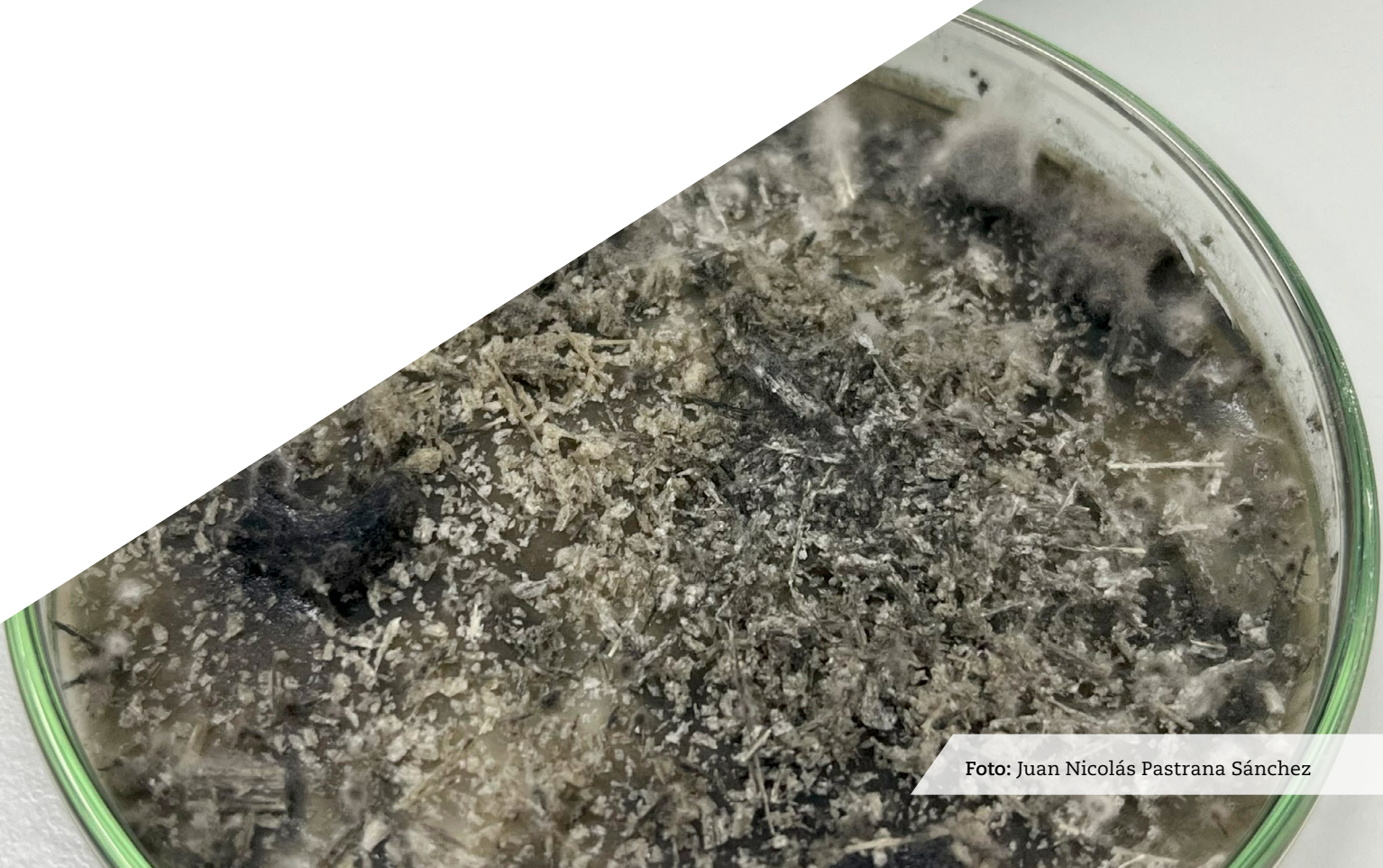


Foto: Juan Nicolás Pastrana Sánchez

Un manejo integrado efectivo de cualquier problema sanitario en cultivos como el aguacate depende de la detección y diagnóstico oportunos del agente causal, sea un patógeno, sea insecto-plaga (Miller et al., 2009). Cuando se desconoce el agente causal, las pruebas de patogenicidad son esenciales para determinar el organismo responsable del daño (Bhunjun et al., 2021). Estas pruebas consisten en inocular artificialmente el tejido vegetal con el organismo sospechoso, bajo condiciones que favorezcan la infección. Para asegurar el éxito de la prueba, es crucial estandarizar el protocolo según factores como densidad del inóculo, condiciones ambientales que promuevan el establecimiento del patógeno y procesos de esterilización del material vegetal a inocular (Bhunjun et al., 2021).

En el caso de *Lasiodiplodia* spp., se ha estandarizado un protocolo específico para evaluar la capacidad de los aislamientos obtenidos previamente (según la metodología descrita en el capítulo VI de este manual) como potenciales agentes causales de la enfermedad en aguacate. Esto con el objetivo de cumplir los postulados de Koch (Kwon et al., 2017), los cuales se consideran claves y se deben cumplir en cualquier estudio etiológico de una enfermedad. Para ello se deben seguir estos pasos: 1) el agente causal debe estar presente en el tejido enfermo; 2) se debe obtener el agente causal en un cultivo axénico (cultivo de una sola especie microbiana proveniente de una sola célula) ; 3) el agente causal aislado debe causar la misma sintomatología en un tejido inoculado, y 4) el agente causal se debe reaislar del material inoculado. Así, en el capítulo V se describe la sintomatología causada por el potencial agente causal, y en el capítulo VI se indica el proceso de obtención del potencial agente causal. En este sentido, se detallan a continuación los diferentes procesos a considerar para llevar a cabo esta prueba de patogenicidad, con lo cual se cumple con el tercer paso de los postulados de Koch (Kwon et al., 2017).

Producción de inóculo

Para evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., se inicia con la producción del inóculo. Cada aislamiento se siembra en medio PDA y se incuba a 27 °C en oscuridad durante 5 días. Transcurrido este tiempo, se obtienen discos de 5 mm de diámetro de

micelio con crecimiento activo, los cuales se utilizan como inóculo. Es importante destacar que el uso de discos o *plugs* de medio de cultivo con micelio fúngico representa una fuente de inóculo concentrada, lo que puede favorecer el proceso de infección y facilitar la evaluación de la patogenicidad del hongo (Bhunjun et al., 2021).

Material vegetal

Para las pruebas de patogenicidad, se utilizan plántulas de aguacate de 3 a 4 meses de desarrollo. Para obtenerlas, se cosechan frutos del material vegetal a evaluar y se extraen las semillas, las cuales se lavan y desinfectan. Posteriormente, las semillas se siembran en arena de río para inducir su germinación (figura 12a) y, una vez germinadas, se trasplantan a bolsas individuales con sustrato adecuado para su crecimiento y desarrollo (figura 12b).

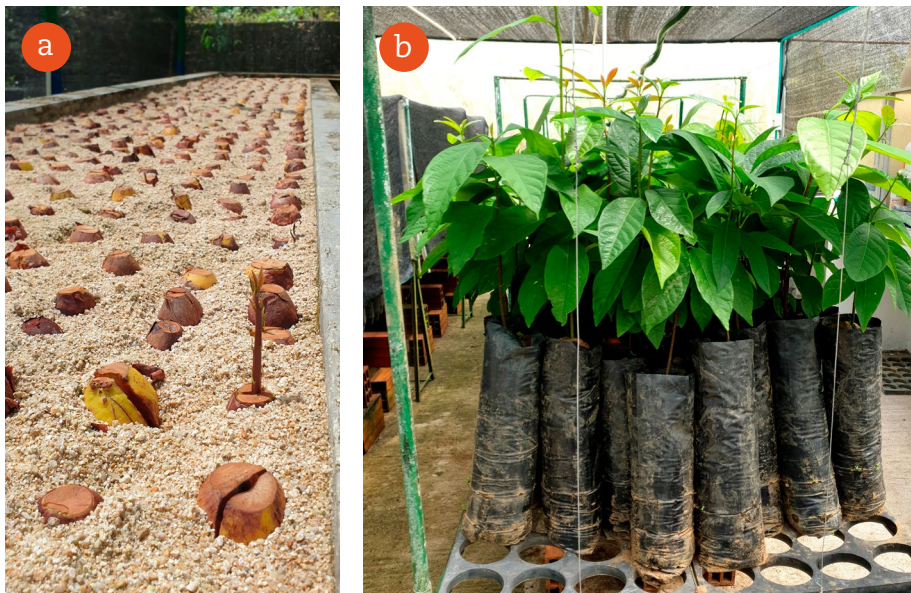


Figura 12. Producción de material vegetal de aguacate para pruebas de patogenicidad de *Lasiodiplodia* spp. a. Semillas de aguacate en germinador de arena de río; b. Plántulas de aguacate trasplantadas en bolsas individuales.

Fotos: Donald Adrián Galvis Neira

Inoculación y seguimiento de síntomas

Previo a la inoculación, se desinfecta la superficie del tallo de la plántula con etanol al 70 %. Luego, se realiza un corte de 5 mm en la epidermis (figura 13a) y se coloca un disco de 5 mm de micelio del aislamiento a evaluar (figuras 13b y 13c). El área inoculada se cubre con un algodón estéril humedecido con agua destilada autoclavada y se sella con cinta para evitar la desecación y contaminación (figuras 13d-13f).



Figura 13. Proceso de evaluación de la patogenicidad de aislamientos del género *Lasiodiplodia* en aguacate. a. Corte del tallo con bisturí; b. Corte de discos de micelio de 5 mm de diámetro; c. Disposición de disco de micelio en herida; d. Cubrimiento de la herida con cinta para injerto; e. Plantas inoculadas a nivel del cuello con aislamientos de raíz; f. Plantas inoculadas en el tallo con aislamientos foliares.

Fotos: Donald Adrián Galvis Neira

Las plántulas inoculadas se mantienen en condiciones de vivero y se monitorean semanalmente para detectar la aparición de síntomas. Un mes después de la inoculación, se realiza una evaluación detallada del material vegetal para observar los síntomas internos en el tejido del tallo. La capacidad patogénica de los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp. se confirma por la presencia de necrosis en el tejido externo, que avanza en ambos sentidos desde el punto de inoculación (figura 14a), y por la presencia de necrosis interna, caracterizada por una coloración marrón rojiza en el tejido (figura 14b). En el caso de aislamientos no patogénicos, no se observa avance de la necrosis (figura 15).



Figura 14. Material vegetal de *Persea americana* L. inoculado con aislamiento del género *Lasiodiplodia*. a. Lesión necrótica en el tejido externo con avance bidireccional; b. Necrosis interna marrón rojiza en el tejido vascular.

Fotos: Donald Adrián Galvis Neira

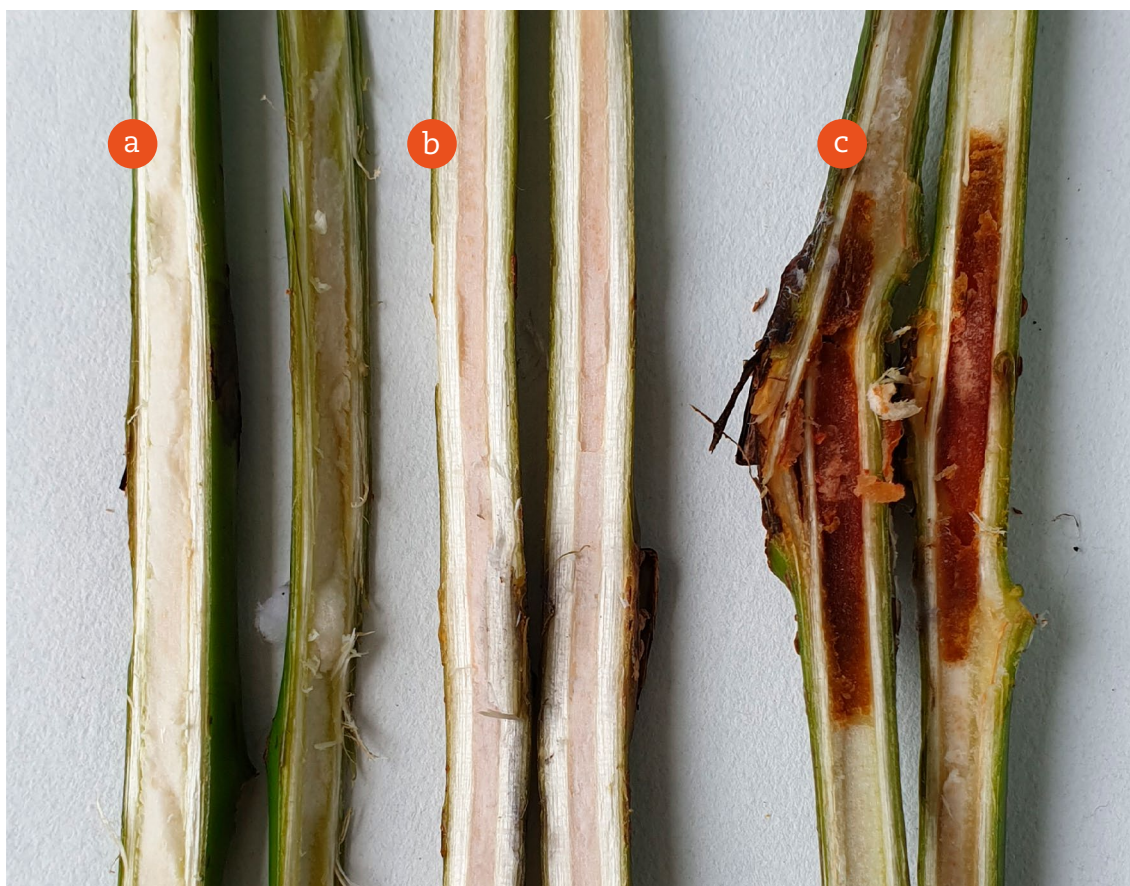


Figura 15. Material vegetal de *Persea americana* L. indexado un mes después de la inoculación. a. Sin síntomas (aislamiento no patógeno); b. Ligera tonalidad rosa (potencial patogénico); c. Necrosis interna marrón rojiza (potencial patogénico confirmado).

Fotos: Donald Adrián Galvis Neira

Finalmente, para verificar la identidad del agente causal de los síntomas observados en el material vegetal inoculado y cumplir con el cuarto paso de los postulados, se debe proceder a reaislar al microorganismo de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo VI de este manual. Con esto, se da cumplimiento a los postulados de Koch previamente descritos.