

Capítulo IV

Aislamiento de *Lasiodiplodia* spp. de tejido de aguacate (*Persea americana* L.)



Para un manejo adecuado de problemas fitosanitarios, como los ocasionados por hongos a cultivos de aguacate, es fundamental realizar un diagnóstico preciso, lo que implica la identificación del agente causal de la enfermedad. Entre los métodos convencionales para la detección de hongos fitopatógenos cultivables, como las especies del género *Lasiodiplodia*, se encuentra el aislamiento en medio de cultivo. Este método permite examinar inicialmente las características morfológicas del hongo, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Cabe indicar que para el caso específico de especies de este género y otros miembros de la familia Botryosphaeriaceae, dado su amplio rango de morfología conidial, la caracterización morfológica no se considera informativa (García et al., 2021). Para facilitar la correcta identificación de los aislamientos obtenidos, se requiere realizar la caracterización mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver capítulo VI. Detección molecular de especies de *Lasiodiplodia*).

A continuación, se describe el proceso de aislamiento de *Lasiodiplodia* spp. a partir de tejido vegetal de aguacate y se detallan las características macro- y microscópicas que se pueden observar.

Colecta de muestra

Para el aislamiento de especies de *Lasiodiplodia*, se deben seleccionar árboles de aguacate al azar en una plantación, incluidos árboles sintomáticos (que presenten signos visibles de la enfermedad) y asintomáticos (aparentemente sanos). De cada árbol seleccionado, se toman muestras de tejido de ramas, tronco y frutos, preferiblemente de zonas que presenten síntomas característicos de la enfermedad, como lesiones necróticas, chancros o pudriciones. El material vegetal colectado se dispone en bolsas plásticas con cierre hermético, evitando incluir material húmedo para prevenir la descomposición y contaminación de las muestras. Es fundamental mantener las muestras refrigeradas durante el transporte al laboratorio, donde se procesan para el aislamiento del hongo.

Proceso para el aislamiento

En el laboratorio, las muestras colectadas se someten a un proceso de limpieza y desinfección para eliminar cualquier material contaminante y asegurar la obtención de cultivos puros de *Lasiodiplodia* spp. Inicialmente, las muestras se sumergen en una solución con detergente durante 15 minutos, seguida de un lavado con agua corriente para eliminar el exceso de solución. Luego, se secan cuidadosamente con papel toalla estéril. A continuación, se obtienen fragmentos de tejido de 0,5 cm² de hojas, pecíolos, pedúnculos y frutos, o de 0,4 cm de longitud de tronco y ramas, con un bisturí estéril. Estos fragmentos se desinfectan sumergiéndolos secuencialmente en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 minutos, etanol al 70 % durante 2 minutos y agua estéril por 3 minutos.

Después de la desinfección, los fragmentos de tejido se secan con papel toalla estéril bajo la corriente de aire de una cabina de flujo laminar y se colocan sobre las superficies de cajas petri que contienen medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (figura 8). Las cajas petri se incuban a 25 °C durante 3 a 5 días, tiempo durante el cual se espera que las colonias de *Lasiodiplodia* spp. crezcan y se desarrollen, permitiendo su posterior identificación y estudio.



Figura 8. Proceso de obtención de fragmentos de tejido vegetal para el aislamiento de especies del género *Lasiodiplodia*.

- a. Fragmento de tejido vegetal de aguacate de aproximadamente 5 mm;
- b. Fragmento de tejido vegetal desinfectado dispuesto sobre medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA);
- c. Caja petri con muestra de tejido vegetal dispuesta en medio PDA para incubar.

Fotos: Laura Valentina Laverde Arias

Descripción macroscópica

Para describir la morfología de las colonias de *Lasiodiplodia* spp. aisladas, se deben cultivar en medio PDA a 27 °C. Inicialmente, las colonias presentan un micelio aéreo esponjoso de color blanco. A medida que el cultivo envejece, el color cambia gradualmente a oliva y finalmente a gris oscuro o negro (figura 9). Además, se observa un pigmento negro característico en el reverso de la caja petri.

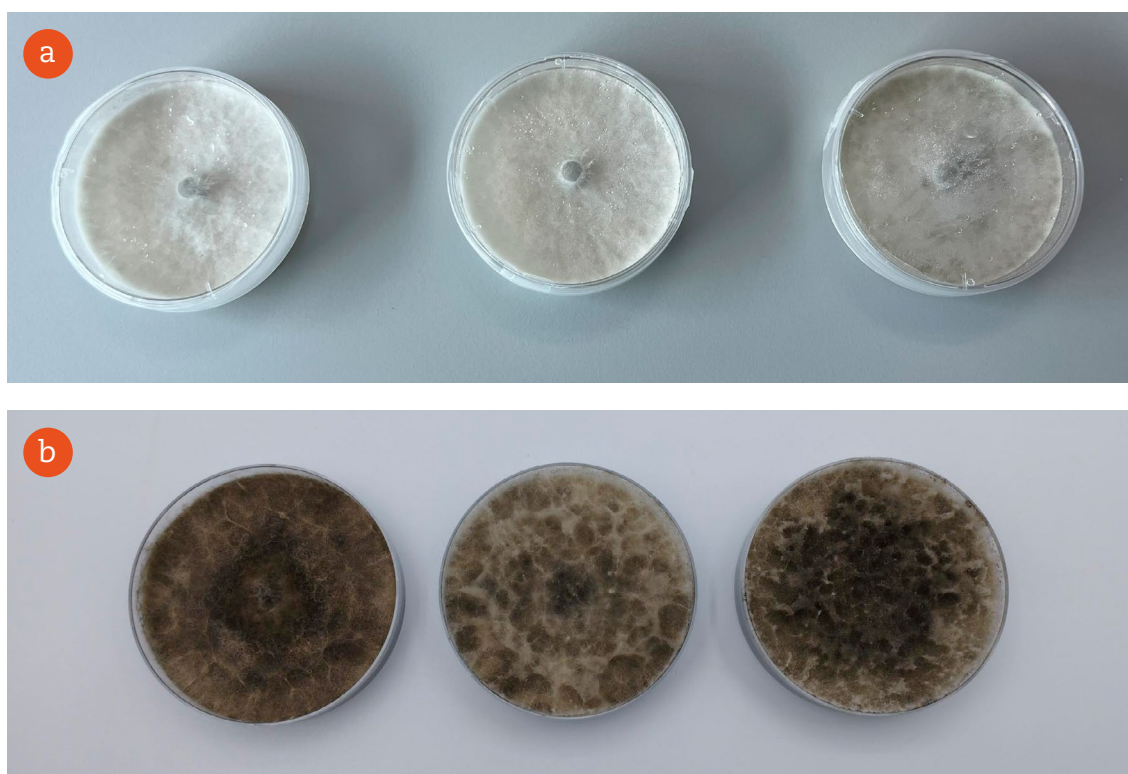


Figura 9. Fragmentos de tejido vegetal y crecimiento de *Lasiodiplodia* spp. en medio papa dextrosa agar (PDA). a. Colonias algodonosas blancas con hasta 4 días de crecimiento; b. Colonias con 8 días de crecimiento, que se tornan verde oliva o grisáceas.

Fotos: Juan Nicolás Pastrana Sánchez

Descripción microscópica

Para los hongos de la familia Botryosphaeriaceae, las características de los estados conidiales se consideran las más informativas, como la pigmentación de los conidios, el grosor de las paredes o los septos (Phillips et al., 2013). Así, con la ayuda del microscopio, se pueden observar las características microscópicas de los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp. Los conidios son inicialmente hialinos (transparentes), unicelulares, con pared celular gruesa y forma subovoide o elipsoide, lo cual concuerda con lo descrito por Phillips et al. (2013) para los miembros de esta familia. A medida que maduran, se tornan de color café oscuro y desarrollan un septo (división transversal) con estriaciones longitudinales debido a los depósitos de melanina sobre la superficie interna. El tamaño promedio de los conidios es de $29,9 \pm 15,5 \times 15,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$, con una relación largo/ancho de 1,9 (Díaz et al., 2022). Cabe indicar que los estados asexuales de las especies de la familia Botryosphaeriaceae, a la cual pertenecen los hongos del género *Lasiodiplodia*, tienen un amplio rango de morfologías conidiales. Aunque estas morfologías se pueden llegar a considerar informativas (García et al., 2021), por sí solas no tienen un valor para definir a nivel de especie y se debe recurrir a la obtención de información de datos moleculares (Phillips et al., 2013). Por ende, su clasificación taxonómica a nivel de especie se debe realizar mediante la caracterización molecular (Hyde et al., 2014).

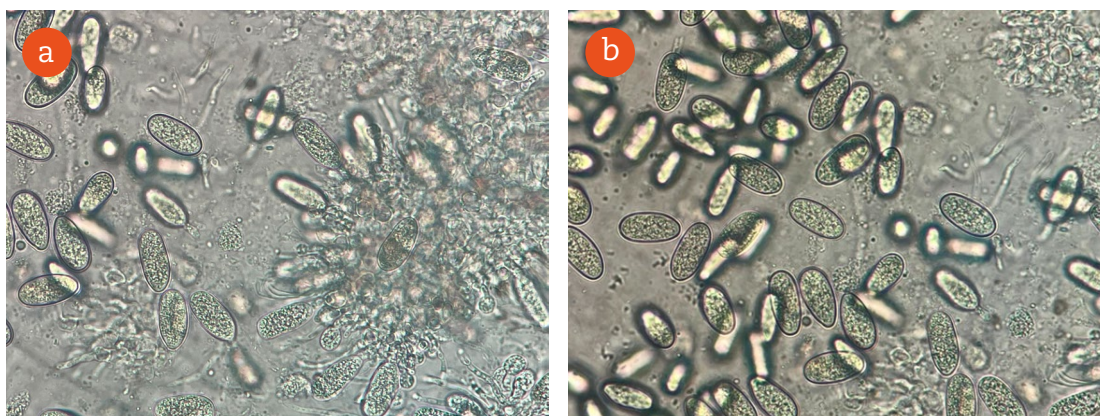


Figura 10. Conidios de aislamientos del género *Lasiodiplodia*.
a. Paráfisis, células conidiógenas y conidios inmaduros a 40 X de *Lasiodiplodia* sp.; b. Conidios maduros e inmaduros.

Fotos: Juan Nicolás Pastrana Sánchez

A continuación, se presenta un esquema que resume los pasos necesarios para obtener aislamientos del género *Lasiodiplodia* que se emplearán en las pruebas de patogenicidad (figura 11).

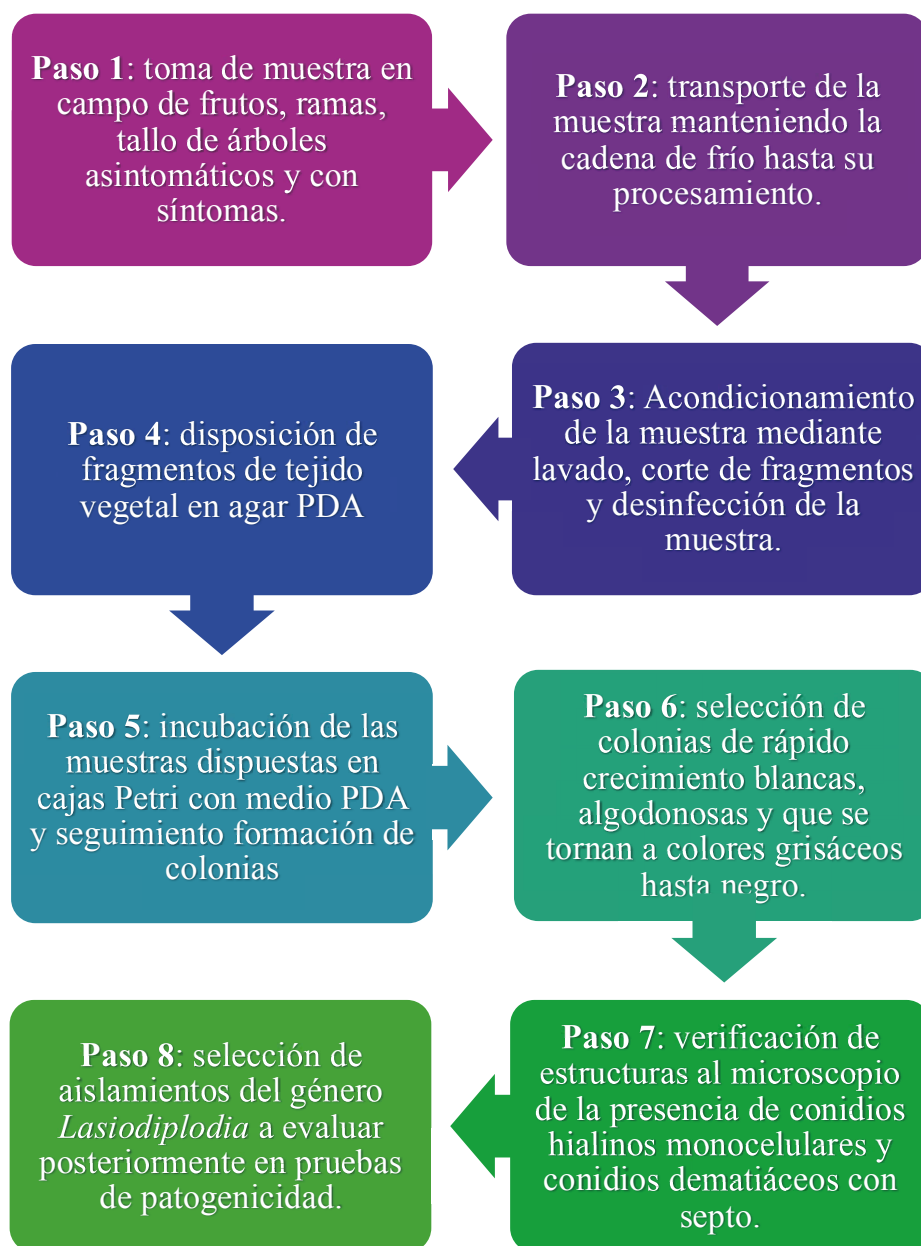


Figura 11. Pasos para obtener aislamientos del género *Lasiodiplodia* con el propósito de hacer un diagnóstico preliminar del agente causal de la muerte súbita del aguacate (*Persea americana* L.).

Fuente: Elaboración propia