

# Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitácuaro, Michoacán

## Caracterización y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Phytophthora cinnamomi* causante de pudrición de raíz en aguacate en Zitácuaro, Michoacán

Alejandra Mondragón-Flores<sup>1,2</sup>, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. UMSNH, Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5 Tarímbaro Michoacán. CP 58880. <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de Apatzingán-INIFAP. Carretera Apatzingán-Cuatro caminos km 17.5, Antúnez, Michoacán. CP. 60780; Patricia Manosalva, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of California, Riverside, CA. CP 92521; Salvador Ochoa-Ascencio, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas no. 2290 Jardines del Cupatitzio Uruapan, Michoacán. CP 60170; Marlene Díaz-Celaya<sup>1</sup>, Gerardo Rodríguez-Alvarado<sup>1</sup>, Sylvia P. Fernández-Pavía<sup>1\*</sup>

\*Corresponding author: patricia.pavia@umich.mx

Received: September 29, 2021.

Accepted: December 23, 2021.

Mondragón-Flores A, Manosalva P, Ochoa-Ascencio S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G and Fernández-Pavía SP. 2022. Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitacuaro, Michoacan. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 59-81.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>

First DOI publication: December 29, 2021.

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** *Phytophthora cinnamomi* is the pathogen most frequently associated with avocado root rot. In Zitácuaro, Michoacán, production

**Resumen.** *Phytophthora cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la pudrición de raíz en aguacate. En Zitácuaro, Michoacán la producción ha aumentado un 19.8 %; sin embargo, actualmente no existen estudios de esta enfermedad en la región. El objetivo de este estudio fue caracterizar aislados obtenidos de raíces de aguacate y evaluar la sensibilidad a fungicidas. Se tomaron muestras de cinco huertas de aguacate, tomando cinco árboles por huerta (25 muestras en total). A partir de las muestras se aislaron, y se identificaron morfológica y molecularmente las cepas obtenidas. Se analizó el tipo de compatibilidad con aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate). Para comprobar

has increased by 19.8%; however, there are no studies of root rot in this area. The objective of the study was to characterize the isolates obtained from avocado roots and assess the sensitivity to fungicides. Samples from 5 avocado orchards were collected, sampling 5 trees per orchard (a total of 25 samples). The samples isolated were characterized morphological and molecularly. Mating type was analyzed using reference isolates of *P. cinnamomi* A1 (isolate from camelia) and A2 (isolate from avocado). To confirm the pathogenicity, tests were performed on avocado fruits with the isolates. The sensitivity of 15 isolates to potassium phosphite and to metalaxyl-M at different concentrations was evaluated *in vitro*. In a subgroup of six isolates, it was evaluated whether there was a relationship between growth rate and potassium phosphite sensitivity. Fifteen isolates were obtained with coenocytic coraloid mycelium, chlamydospores, sporangia without papilla, ovoid to ellipsoid, with internal proliferation, heterothallic with mating type A2, with amphigynous antheridia and plerotic oospores, characteristics consistent with *P. cinnamomi*. The inoculated isolates were pathogenic on avocado fruits. The isolates were more sensitive to potassium phosphite than to metalaxyl-M, with mean  $EC_{50}$  values of 24.62 and  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., respectively. No relationship was observed between growth rate and potassium phosphite sensitivity. It is necessary to obtain a greater number of *P. cinnamomi* isolates for virulence studies.

**Key words:** sensitivity, mating type, mycelial growth, wilt.

Avocado (*Persea americana*) is an extremely important fruit crop produced in several areas of the world. Nowadays, it is widely documented as

la patogenicidad, se realizaron pruebas en frutos de aguacate con los aislados. Se evaluó la sensibilidad de 15 aislados a fosfito de potasio y metalaxil-M en diferentes concentraciones bajo condiciones *in vitro*. En un subgrupo de seis aislados se evaluó la relación entre la tasa de crecimiento y la sensibilidad a fosfito de potasio. Se obtuvieron 15 aislados con micelio cenocítico coraloide, clamidosporas, esporangios sin papila, ovoides y elipsoides, con proliferación interna, heterotálicos, tipo de compatibilidad A2, con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas características que concuerdan con *P. cinnamomi*. Los aislados inoculados fueron patógenicos en frutos de aguacate. Los aislados fueron más sensibles a fosfito de potasio que a metalaxil-M, con valores promedio de  $CE_{50}$  de 24.62 y  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., respectivamente. No se observó relación entre la tasa de crecimiento y la sensibilidad a fosfito de potasio. Es necesario obtener mayor número de aislados para estudios de virulencia.

**Palabras clave:** sensibilidad, tipo de compatibilidad, crecimiento micelial, marchitez.

El aguacate (*Persea americana*) es un cultivo frutal de gran importancia que se produce en diversas regiones del mundo, en la actualidad se encuentra plenamente documentado que el aguacate es fuente importante de energía y vitaminas (Araújo *et al.*, 2018). México es el principal productor y exportador de aguacate con una producción de más de 2.3 millones de toneladas, seguido de República Dominicana, Perú e Indonesia (FAOSTAT, 2020). A nivel nacional, Michoacán aporta más del 70 % de la producción, destacando los municipios de Ario de Rosales, Salvador Escalante, Tacámbaro y Tancítaro, por el volumen producido (SIAP, 2019). De acuerdo con el Servicio de Información Alimentaria y Pesquera en el municipio de Zitácuaro

being an important source of energy and vitamins (Araújo *et al.*, 2018). Mexico is the main avocado producer and exporter, with a production of over 2.3 million t, followed by the Dominican Republic, Peru and Indonesia (FAOSTAT, 2020). Nationwide, Michoacán provides over 70% of the production, particularly in the municipalities of Ario de Rosales, Salvador Escalante, Tacámbaro and Tancítaro, due to the volume produced (SIAP, 2019). According to the Food and Fishing Information Service in the municipality of Zitácuaro, the avocado production has increased, since in 2010 it reached 10,027 t and 12,509 t in 2019, which represents an increase of 19.8%.

One of the most devastating diseases on avocado in the world due to its frequency, severity and economic losses is root rot or wilt (Coffey, 1992; Ramírez-Gil *et al.*, 2014). In Mexico, this disease affects all the varieties and is responsible for the deaths of trees in the main avocado-producing areas, covering 5% of the total surface of the crop in Michoacán (Téliz, 2000). Root rot causes necrosis in feeder roots, chlorosis, defoliation and dieback, which reduces yield and leads to the death of trees (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005). The disease is more severe and develops faster in heavy soils, with poor drainage and at an average temperature of 24 °C (Zentmyer, 1980; Erwin and Ribeiro 1996). Phytopathogenic fungi such as *Calonectria ilicicola*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma*, *Rosellinia necatrix*, and others have been associated to this disease (Ruano-Rosa and López-Herrera, 2009; Dann *et al.*, 2012; Vitale *et al.*, 2012; Olalde-Lira *et al.*, 2020). Recently, in the Canary Islands, the species *P. cinnamomi*, *P. citricola* sensu lato, *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora* and *Phytophthium vexans* have been identified as the cause of rot in avocado (Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). In Michoacán, *Pythium* sp. *amazonianum* and

la producción de aguacate ha ido en aumento, ya que en 2010 alcanzó 10,027 t y en 2019 12,509 t, lo que representó un incremento del 19.8%.

Una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de aguacate a nivel mundial debido a su frecuencia, severidad y pérdidas económicas, es la pudrición de raíz o marchitez (Coffey, 1992; Ramírez-Gil *et al.*, 2014). En México, esta enfermedad afecta a todas las variedades y es responsable del aumento de la mortalidad de los árboles en las principales zonas de producción de aguacate, encontrándose en el 5 % de la superficie total del cultivo en Michoacán (Téliz, 2000). La pudrición de raíz, ocasiona necrosis en las raíces alimentadoras, clorosis, defoliación y muerte descendente, lo que reduce el rendimiento y la muerte de los árboles (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). La enfermedad es más severa y se desarrolla rápidamente en suelos pesados, con poco drenaje y a una temperatura promedio de 24 °C (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996). Hongos fitopatógenos como *Calonectria ilicicola*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* y *Rosellinia necatrix*, entre otros, se han asociado a esta enfermedad (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009; Dann *et al.*, 2012; Vitale *et al.*, 2012; Olalde-Lira *et al.*, 2020). Recientemente, en las islas Canarias se identificaron las especies *P. cinnamomi*, *P. citricola* sensu lato, *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora* y *Phytophthium vexans*, ocasionando pudrición de raíz en aguacate (Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). En Michoacán, se reportó a *Pythium* sp. *amazonianum* y a *P. vexans* asociados a marchitez y a pudrición de raíz (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). Sin embargo, *P. cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la pudrición de raíz de aguacate, el cual generalmente, infecta raíces finas y alimentadoras por medio de zoosporas móviles (O’Gara *et al.*, 2015; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). En el

*P. vexans* were reported as related to wilt and root rot (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). However, *P. cinnamomi* is the pathogen most frequently associated to root rot in avocado, and it generally infects fine and feeder roots using mobile zoospores (O’Gara *et al.*, 2015; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). In the genus *Phytophthora*, it is easier to identify the species *P. cinnamomi* due to its particular morphological characteristics. In a V8 medium, it develops cotton-like cultures with a prominent cenocytic mycelium, with resistant hyphae with swellings (coraloid), chlamydospores, ovoid and non-papillated sporangia, absent in culture medium. These characteristics are usually enough for its identification (Erwin and Ribeiro, 1996; Robin *et al.*, 2012).

The most commonly used fungicides to control *P. cinnamomi* are metalaxyl-M (Mtx) and potassium phosphite (Fp) (Ramírez-Gil *et al.*, 2017). Since Mtx was introduced in the market in 1977, it is known to affect the polymerase I complex, inhibiting rRNA synthesis, affecting the growth of hyphae and the formation of haustoria and spores (Müller and Ulrich, 2012). In 1984, Darvas and Becker reported that after constant applications of Mtx on soils, it becomes difficult to control root rot in young avocado plants, suggesting a loss of sensitivity. Studies show that species such as *P. cryptogea*, *P. nicotianae* are insensitive or have an intermediate sensitivity to mefenoxam at concentrations of 1 or 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i. a. (Hwang and Benson, 2005). However, when testing for sensitivity to Mtx in *P. cinnamomi* populations isolated from avocado in California, EC50 value were obtained between 0.023 and 0.138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., confirming the sensitivity of the isolates to the fungicide (Belisle *et al.*, 2019a).

Potassium phosphite has a complex action mechanism. It is known to have a direct fungistatic effect that reduces the growth and sporulation of

género *Phytophthora*, la identificación de la especie *P. cinnamomi* se facilita por sus características morfológicas particulares; en medio V8 desarrolla colonias algodonosas con micelio cenocítico prominente, con hifas resistentes e hinchamientos (coraloide), clamidosporas, esporangios ovoides y elipsoides no papilados ausentes en medio de cultivo, usualmente estos caracteres son suficientes para su identificación (Erwin y Ribeiro, 1996; Robin *et al.*, 2012).

Los fungicidas más utilizados para el control de *P. cinnamomi* son metalaxil-M (Mtx) y fosfito de potasio (Fp) (Ramírez-Gil *et al.*, 2017). Desde 1977, el Mtx fue introducido al mercado, se sabe que afecta el complejo polimerasa I, inhibiendo la síntesis de la ARNr, además afecta el crecimiento de las hifas y la formación de haustorios y esporas (Müller y Ulrich, 2012). En 1984, Darvas y Becker reportaron que después de constantes aplicaciones de Mtx a los suelos, es difícil controlar la pudrición de raíz en plantas de aguacate jóvenes, sugiriendo una pérdida de sensibilidad. Estudios demuestran que especies como *P. cryptogea*, *P. nicotianae* son insensibles o de insensibilidad intermedia a mefenoxam a concentraciones de 1 o 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i. a. (Hwang y Benson, 2005). Sin embargo, en pruebas de sensibilidad a Mtx de poblaciones de *P. cinnamomi* aisladas de aguacate en California, se obtuvieron valores de CE50 de 0.023 a 0.138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., confirmando la sensibilidad de los aislados al fungicida (Belisle *et al.*, 2019a).

El fosfito de potasio tiene un mecanismo de acción complejo, se sabe que tiene efecto fungistático directo, que reduce el crecimiento y esporulación del patógeno, permitiendo al hospedante que su sistema de defensa tenga más tiempo para matar al organismo invasor (Guest y Grant, 1991; Dann y MacLeod, 2021). Estudios con *Phytophthora* spp. confirman la variación inter e intraespecífica en la tolerancia a Fp, además de la promoción del

the pathogen, allowing the defense system of the host to have more time to kill the invasive organism (Guest and Grant, 1991; Dann and MacLeod, 2021). Studies with *Phytophthora* spp. confirm the inter- and intraspecific variation in the tolerance to Fp, as well as the promotion of the mycelial growth on isolates exposed to low concentrations (Hunter *et al.*, 2018). In Australia, *P. cinnamomi* populations displayed variations in sensitivity to Fp, with CE50 values ranging between 4 and 148  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., (Wilkinson *et al.*, 2001). Recently, in California, in *P. cinnamomi* populations of lineage A2, genetically different isolates were found, which are less sensitive to potassium phosphite and have high virulence (Belisle *et al.*, 2019b). Linde *et al.* (1999) suggest that *P. cinnamomi* isolates with a higher growth rate may be more virulent, and other investigations have concluded that some isolates, less sensitive to potassium phosphite, are also more virulent (Belisle *et al.*, 2019b).

The surface planted with avocado in the municipality of Zitácuaro, Michoacán, has increased in recent years, given the agroclimatic conditions that are adequate for its development. However, root rot is also present in commercial orchards and there are currently no studies on the etiology of the disease in this production region. Therefore, the aim of this study was to phenotypically characterize isolates obtained from avocado tree roots in Zitácuaro, Michoacán and evaluate their sensitivity to fungicides.

## MATERIALS AND METHODS

**Characteristics of the orchards.** In November of 2019, five avocado orchards, located in the municipality of Zitácuaro, Michoacán, were sampled. All orchards are located in a A(C)(w<sub>1</sub>)(w) semi-warm subhumid climate with abundant

crecimiento del micelio de los aislados expuestos a bajas concentraciones (Hunter *et al.*, 2018). En Australia, poblaciones de *P. cinnamomi* presentaron variación en la sensibilidad a Fp, con valores de CE50 que oscilan entre 4 a 148  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., (Wilkinson *et al.*, 2001). Recientemente en California se detectaron en poblaciones de *P. cinnamomi* del linaje A2, aislados genéticamente distintos, los cuales son menos sensibles a fosfito de potasio y con alta virulencia (Belisle *et al.*, 2019b). Linde *et al.* (1999) sugieren que aislados de *P. cinnamomi* con una mayor tasa de crecimiento pueden ser más virulentos, además otras investigaciones han concluido que algunos aislados menos sensibles a fosfito de potasio también son más virulentos (Belisle *et al.*, 2019b).

La superficie cultivada con aguacate en el municipio de Zitácuaro, Michoacán ha ido en aumento en los últimos años, dadas las condiciones agroclimáticas dominantes que resultan aptas para su desarrollo; sin embargo, la pudrición de raíz en huertos comerciales de aguacate también está presente y no se tienen a la fecha estudios sobre la etiología de la enfermedad en esta región productora. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípicamente aislados obtenidos de raíces de aguacate en Zitácuaro, Michoacán y evaluar la sensibilidad a fungicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Características de las huertas.** En noviembre del 2019, se muestrearon cinco huertas de aguacate ubicadas en el municipio de Zitácuaro, Michoacán. Todas las huertas se encuentran en un clima A(C)(w<sub>1</sub>)(w), semicálido subhúmedo con abundantes lluvias en verano, lluvia invernal menor a 5 %, humedad intermedia, de acuerdo con el sistema climático Köppen modificado por García (1981) y



rainsfall in the summer, winter rains below 5%, intermediate humidity, according to the Köppen climate system, modified by García (1981), and the established variety is ‘Hass’; in addition, they have heavy, clay-rich soils. Other characteristics of the orchards are indicated in Table 1.

**Collection of samples and isolation.** Root and soil samples were collected from the rhizosphere, one sample per tree and five trees per orchard, with symptoms of yellowing, defoliation and dieback. The samples were placed in labelled plastic bags in a cooler and transported to the Plant Pathology Laboratory of the Institute of Farming and Forestry Research (Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales - IIAF), of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). In order to obtain a greater percentage of isolates from roots, the protocols by Erwin and Ribeiro (1996) and Rodríguez-Padrón *et al.* (2018) were modified. Lateral, partially necrotized roots were selected, washed with tap water and dried using sterilized paper towels. Approximately 2 cm cuts were made, with one healthy part and one necrotized part, placed in inclusion *cassettes*, which were submerged in commercial chlorine bleach at 2% (v/v) for 45 s and rinsed with sterile distilled water three times. The excess water was removed from the tissue cuts using sterilized paper towels and placed in Petri dishes with

tienen establecida la variedad ‘Hass’, además tienen suelos pesados, ricos en arcilla. Otras características de las huertas se indican en el Cuadro 1.

**Colecta de muestras y aislamiento.** Se colectaron muestras de raíces y suelo de la rizósfera, una muestra por árbol y cinco árboles por huerta, con síntomas de amarillamiento, defoliación y muerte descendente. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas en una hielera y se transportaron al laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Con la finalidad de obtener un mayor porcentaje de aislados a partir de raíces, se modificaron los protocolos de Erwin y Ribeiro (1996) y Rodríguez-Padrón *et al.* (2018). Se seleccionaron raíces laterales parcialmente necrosadas, se lavaron con agua corriente y se secaron con toallas de papel estériles. Cortes de tejido de aproximadamente 2 cm, con una parte sana y una necrosada se colocaron en *cassettes* de inclusión, los cuales se sumergieron en cloro comercial al 2% (v/v) durante 45 s y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Se retiró el exceso de agua de los cortes de tejido con toallas de papel, estériles y se colocaron en cajas Petri con medio selectivo NARPH-V8 (Natamicina 0.02 g L<sup>-1</sup>, PCNB (Pentacloronitrobenceno) 0.10 g L<sup>-1</sup>, Ampicilina 0.27 g L<sup>-1</sup>, Rifampicina 0.01 g L<sup>-1</sup>, Himexazol 0.075 g L<sup>-1</sup>).

**Table 1. Characteristics of the avocado root-collecting sites in Zitácuaro Michoacán.**  
**Cuadro 1. Características de los sitios de colecta de raíces de aguacate en Zitácuaro Michoacán.**

Huerta	Localidad	Altura msnm	Latitud	Longitud	Humedad	Total de muestras
Benedicto	San Felipe	1890	19° 49' 00" N	100° 37' 41" W	Temporal	5
Los llanos	San Felipe	1890	19° 49' 08" N	100° 37' 52" W	Temporal	5
Los llanos 2	Macutzio	1900	19° 49' 17" N	100° 35' 50" W	Riego	5
El Martín	Carpinteros	2176	19° 49' 05" N	100° 31' 58" W	Temporal	5
El dorado	La soledad	2266	19° 46' 80" N	100° 29' 50" W	Riego	5

a NARPH-V8 (Natamycin 0.02 g L<sup>-1</sup>, PCNB (Pentachloronitrobenzene) 0.10 g L<sup>-1</sup>, Ampicillin 0.27 g L<sup>-1</sup>, Rifampicin 0.01 g L<sup>-1</sup>, Hymexazol 0.075 g L<sup>-1</sup>) selective medium. The dishes were incubated at 25 °C in the dark for 24 to 48 h, until the growth of cenocytic mycelium and with the characteristic *P. cinnamomi* swellings were observed. The cultures were purified by the successive cultivation of hyphal tips on corn meal agar (HMA, Fluka®) culture medium.

**Compatibility type.** The compatibility of the isolates obtained was determined using the reference *P. cinnamomi* isolate A1 (camellia isolate) and A2 (avocado isolate) which were donated by the University of California, Riverside to the Plant Pathology Laboratory (IIAF). In a Petri dish containing scV8 agar medium (900 mL distilled water, 100 mL Campbell's V8 juice, 1 g CaCO<sub>3</sub>), a mycelium disc of the isolate with compatibility type A1 was placed, and in another dish, the type A2. Likewise, in each dish, a mycelium disc of the isolate of interest was placed, approximately one centimeter away. The dishes were incubated at 25 °C in the dark for 10 days. The isolates that formed oospores were assigned the complementary compatibility type in the cross.

**Morphological characterization.** The pure cultures were cultivated on HMA medium and cV8 agar medium (10 g of CaCO<sub>3</sub>, 1 L of V8 juice, centrifuged at 4,000 rpm for 20 min) (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). The shape of the culture was characterized, along with the appearance of the mycelium. For the production of sporangia, the protocol by Hwang *et al.* (1975) was modified. Three 5 mm mycelium discs from each isolate were plated in triplicate in Petri dishes measuring 60 x 15 mm with 10 mL of V8 agar medium over a sheet of transparent cellophane and exposed to light for

Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad de 24 a 48 h, hasta que se observó el crecimiento de micelio cenocítico y con hinchamientos característico de *P. cinnamomi*. Las colonias se purificaron por cultivo sucesivo de punta de hifa en medio de cultivo harina de maíz agar (HMA, Fluka®).

**Tipo de compatibilidad.** La compatibilidad de los aislados obtenidos se determinó usando los aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate) que fueron donados por la Universidad de California de Riverside al Laboratorio de Patología Vegetal (IIAF). En una caja Petri con medio scV8 agar (900 mL de agua destilada, 100 mL de jugo V8 Campbell's, 1 g CaCO<sub>3</sub>), se colocó un disco de micelio de un aislado con tipo de compatibilidad A1 y en otra caja el tipo A2. Asimismo, en cada una de las cajas se colocó un disco de micelio del aislado de interés aproximadamente a un centímetro de distancia. Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 10 días. A los aislados que formaron oosporas se les asignó el tipo de compatibilidad complementario en la cruce.

**Caracterización morfológica.** Los cultivos puros se cultivaron en medio HMA y medio cV8 agar (10 g de CaCO<sub>3</sub>, 1 L de jugo V8, centrifugado a 4,000 rpm por 20 min) (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). Se caracterizó la forma de la colonia y la apariencia del micelio. Para la producción de esporangios se modificó el protocolo de Hwang *et al.* (1975); tres discos de micelio de 5 mm de cada aislado se cultivaron por triplicado en cajas Petri 60 x 15 mm con 10 mL de medio scV8 agar, sobre papel celofán transparente y expuestos a luz por 24 h. El papel celofán con el micelio se transfirió a una caja Petri, se le agregaron 10 mL de medio líquido scV8 (900 mL de agua destilada, 100 mL jugo-V8, 1 g CaCO<sub>3</sub>), se incubaron durante 24 h a 18 °C en os-

24 h. The cellophane paper with the mycelium was transferred to new Petri dishes, 10 mL of liquid scV8 medium (900 mL of distilled water, 100 mL of V8 juice, 1 g  $\text{CaCO}_3$ ), were added and incubated for 24 h at 18 °C in the dark. The liquid medium was then poured out, they were rinsed three times and were flooded with a salt solution, following the protocol by Chen and Zentmyer, (1970) (1.64 g of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.05 g of  $\text{KNO}_3$  and 0.48 g of  $\text{MgSO}_4$  were dissolved in one liter of distilled water and the solution was sterilized for 20 min at a pressure of 15 lb). They were then exposed to white light at 25 °C every 24 h, rinsed three times with the salt solution for two consecutive days and the reproductive structures observed were registered (Erwin and Ribeiro, 1996; Abad *et al.*, 2019).

**Pathogenicity tests.** To perform the pathogenicity tests, four isolates were chosen to be inoculated on avocado fruits with physiological maturity; they were washed with soap and tap water and sprayed with alcohol at 75% to disinfect them. Two mycelium discs, 6 mm in diameter, from isolates ZITR-1-3, ZITR-2-5, ZITR-3-4 and ZITR-5-3, four days old and grown on HMA, were placed on the sides of the fruits; the discs were then covered in Janel™ brand masking tape. Three fruits were used for every isolate, and after inoculation, they were placed in a moist chamber and incubated at 25 °C. As controls, three fruits were inoculated with HMA discs.

**Sensitivity to fungicides.** The sensitivity of 15 isolates to potassium phosphite (Fp) (Nutriphite plus magnum 40% Gowan®) were evaluated, at final concentrations of 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 and 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a. and metalaxyl-M (Mtx) (Ridomil Gold® 480SL) 0, 0.5, 1, 3 and 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a. A completely randomized experimental design was used with a factorial arrangement with three

curidad, se decantó el medio líquido, se enjuagaron tres veces y se inundaron con una solución de sales de acuerdo con el protocolo de Chen y Zentmyer, (1970) (se disolvieron en un litro de agua destilada: 1.64 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.05 g de  $\text{KNO}_3$  y 0.48 g de  $\text{MgSO}_4$ , la solución se esterilizó 20 min a 15 lb de presión); a continuación se expusieron a luz blanca a 25 °C, cada 24 h, se enjuagaron tres veces con la solución salina, por dos días consecutivos y se registraron las estructuras reproductivas observadas (Erwin y Ribeiro, 1996; Abad *et al.*, 2019).

**Pruebas de patogenicidad.** Para realizar las pruebas de patogenicidad se seleccionaron cuatro aislados que se inocularon en frutos de aguacate con madurez fisiológica, se lavaron con jabón y agua corriente y se asperjaron con alcohol al 75% para desinfectarlos. Dos discos de micelio de 6 mm de diámetro de los aislados ZITR-1-3, ZITR-2-5, ZITR-3-4 y ZITR-5-3, de cuatro días de crecimiento desarrollados en medio harina de maíz, se colocaron en los costados de los frutos, los discos se cubrieron con cinta masking tape Janel™, se usaron tres frutos por aislado, una vez inoculados se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 25 °C. Como testigos tres frutos fueron inoculados con discos de medio harina de maíz.

**Sensibilidad a fungicidas.** Se evaluó la sensibilidad de 15 aislados a fosfito de potasio (Fp) (Nutriphite plus magnum 40 % Gowan®) a concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 y 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. y a metalaxil-M (Mtx) (Ridomil Gold® 480SL) 0, 0.5, 1, 3 y 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, con tres réplicas. La concentración efectiva a la cual se inhibió el 50% del crecimiento micelial (valor de  $\text{CE}_{50}$ ) se calculó utilizando el método tradicional de dilución en agar (Gray *et al.*, 2018). El fungicida se agregó en medio cV8-A al



replications. The effective concentration at which 50% of the mycelial growth was inhibited (value of  $EC_{50}$ ) was calculated using the traditional method of dilution in agar (Gray *et al.*, 2018). The fungicide was added to the cV8-A medium at 10% to obtain the final concentrations. Discs measuring 6 mm with the mycelium from the four-day-old isolates cultivated on HMA were placed in the center of the Petri dishes containing the different concentrations. After three days of incubation in the dark at 22 °C, the growth of the culture was measured in two perpendicular directions, the measurement of the inoculum disc was subtracted and the average was obtained. The growth was calculated by dividing the diameter of the culture in the Petri dishes with fungicide by the average growth of the control dishes and it was expressed as a percentage (Hu *et al.*, 2010).

**Effect of the temperature and culture medium on the growth of the mycelium.** Six isolates were selected, based on the percentage of inhibition to Fp, along with three isolates with low percentage of inhibition and three with high percentage of inhibition (an A [high] and a B [low] were added at the end of the identification code of each isolate used in this test), to determine whether there was or was not a relationship between the velocity of growth and sensitivity. Growth rate (mm per day) was determined at 22 and 25 °C in the cV8 agar and HMA media, following the methodology described by Belisle *et al.* (2019b). Agar discs, 7 mm in diameter, were cut from the edge of the 4-day-old cultures plated on HMA medium, transferred to the dishes with the corresponding media and incubated in the dark for four days at both temperatures. The diameter of the culture was measured every day.

To calculate the values of the  $EC_{50}$ , the average percentage of inhibition of both repetitions was estimated for each concentration of the fungicides

10% para obtener las concentraciones finales. Discos de 6 mm de micelio de los aislados de cuatro días de crecimiento cultivados en HMA, se colocaron en el centro de las cajas Petri que contenían las diferentes concentraciones. Después de tres días de incubación en oscuridad a 22 °C, se midió el crecimiento de la colonia en dos direcciones perpendiculares, se restó la medida del disco de inóculo y se obtuvo el promedio. El crecimiento se calculó dividiendo el diámetro de la colonia en las cajas Petri con fungicida, entre el promedio de crecimiento de las cajas testigo y se expresó como porcentaje (Hu *et al.*, 2010).

**Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio.** Se seleccionaron seis aislados con base en el porcentaje de inhibición a Fp; tres aislados con bajo porcentaje de inhibición y tres con alto porcentaje de inhibición (se agregó una A (alto) y una B (bajo) al final del código de identificación de cada aislado usado en esta prueba), para determinar si existía o no una relación entre velocidad de crecimiento y sensibilidad. La tasa de crecimiento (mm por día) se determinó a 22 y 25 °C en los medios de cV8 agar y HMA, siguiendo la metodología descrita por Belisle *et al.* (2019b). Se cortaron discos de agar de 7 mm de diámetro del margen de las colonias de 4 días desarrolladas en medio HMA, se transfirieron a las cajas con los medios correspondientes y se incubaron en la oscuridad durante cuatro días a las dos temperaturas. El diámetro de la colonia se midió diariamente.

Para calcular los valores de la  $CE_{50}$  se estimó el porcentaje promedio de inhibición de las dos repeticiones para cada concentración de los fungicidas en función del porcentaje observado en el grupo testigo, utilizando la siguiente fórmula  $ICR (\%) = (CRT - CRF) / CRT \times 100$ , donde ICR es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, CRT es el crecimiento radial del testigo y CRF es el crecimiento

based on the percentage observed in the control group, using the formula  $ICR (\%) = (CRT - CRF) / CRT \times 100$ , where ICR is the percentage of inhibition of the radial growth, CRT is the radial growth of the control, and CRF is the radial growth in each of the concentrations. To obtain the  $EC_{50}$ , the natural logarithm of each of the studied concentrations was included and a probit analysis was carried out for each isolate related to 50% of its inhibition (Adaskaveg *et al.*, 2015). The experiments were carried out in duplicate.

To determine the effect of the temperature and of the medium on the isolate, the final growth was taken into consideration; the average was obtained and with these values, an analysis of variance and a multiple comparison of averages were carried out (Tukey, 0.05) for a 2x2 factorial experiment. Using the information on the final growth, interaction graphs were created to observe the effect of the factor over the variable. The analyses were carried out and graphs created using R version 4.0.1 (2020-06-06).

**Molecular characterization.** Isolates ZITR-1-3 and ZITR-5-3 were grown in a green bean medium (green bean and zucchini baby food: Gerber Nestlé®, 339 g, agar 15 g and water 646 mL) for five days. The mycelium was collected, dehydrated at 39 °C for 24 h, stored at -20 °C for 24 h, ground, and the genomic DNA extracted following an extraction protocol based on CTAB (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). The DNA was quantified in a spectrophotometer (Varioskan Flash Thermo Scientific NanoDrop 2000®) and diluted to obtain a concentration of 12 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . The DNA was amplified by PCR using oligonucleotides for the region of the internal transcribed spacer (ITS). The reactions contained 6.25  $\mu\text{L}$  of GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 0.0675  $\mu\text{L}$  of each of the oligonucleotides

radial en cada una de las concentraciones. Para obtener la  $CE_{50}$  se incluyó el logaritmo natural de cada una de las concentraciones examinadas; se hizo el análisis probit para cada aislado asociado con el 50% de su inhibición (Adaskaveg *et al.*, 2015). Los experimentos se hicieron por duplicado.

Para determinar el efecto de la temperatura y del medio en los aislados, se tomó en consideración el crecimiento final; se obtuvo el promedio y con estos valores se procedió a realizar un análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, 0.05) para un experimento factorial 2x2. Con la información del promedio de crecimiento final se construyeron gráficos de interacción para observar el efecto del factor sobre la variable. Los análisis y gráficos se realizaron con R versión 4.0.1 (2020-06-06).

**Caracterización molecular.** Los aislados ZITR-1-3 y ZITR-5-3 se crecieron en medio de ejote (papa de ejote y calabacita: Gerber Nestlé®, 339 g, agar 15 g y agua 646 mL) por cinco días. El micelio se colectó, deshidrató a 39 °C durante 24 h, almacenó a -20 °C por 24 h, molió y se extrajo el ADN genómico siguiendo un protocolo de extracción con base en CTAB (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Varioskan Flash Thermo Scientific NanoDrop 2000®) y diluyó para obtener una concentración de 12 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . El ADN se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos para la región del espaciador interno transcrito (ITS). Las reacciones contenían 6.25  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 0.0675  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos ITS4 (TCCTCCgCTTATTgATATgC) e ITS6 (gAAGAAggTgAAGTCgTAA-CAAgg) (100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (30 ng) y agua destilada ultrapura hasta tener un volumen final de 13  $\mu\text{L}$ . Las reacciones de amplificación se hicieron en las siguientes condiciones:

ITS4 (TCCTCCgCTTATTgATATgC) and ITS6 (gAAgAAggTgAAgTCgTAACAagg) (100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  of genomic DNA (12 ng) and ultrapure distilled water, until a final volume of 13  $\mu\text{L}$  was obtained. The amplification reactions were carried out in the following conditions: an initial denaturalization for 2 min at 94 °C, 35 denaturalization cycles for 1 min at 94 °C, alignment for 1 min at 53 °C, extension for 1 min at 72 °C, and a final extension for 10 min at 72 °C. The products of the PCR were sequenced (Macrogen, Seoul, South Korea) and the sequences were edited using the programs PreGap and Gap (<http://staden.sourceforge.net>). The consensus sequences obtained were analyzed with the BLAST program, from the NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] to compare with other sequences of oomycetes from this database.

## RESULTS

**Isolates obtained.** Plating was carried out for every root sample out of a total of 25 samples. Fifteen isolates were obtained (Table 2) with morphological characteristics of *P. cinnamomi*, and in the rest of the dishes, bacterial growth was observed, therefore they were discarded.

**Compatibility Type.** The crosses of the isolates with a *P. cinnamomi* strain with compatibility type A1 produced plerotic oospores with amphigynous antheridia. The crosses of the isolates with a strain with compatibility type A2 only produced globose chlamydospores (Figure 1D). The results indicate that the isolates are compatibility type A2.

**Morphological and molecular characterization.** The isolates developed rosaceous shaped cultures with wavy edges, with abundant, cotton-like,

una desnaturalización inicial durante 2 min a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización durante 1 min a 94 °C, alineación durante 1 min a 53 °C, extensión durante 1 min a 72 °C, y una extensión final durante 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR se secuenciaron (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) y las secuencias fueron editadas usando los programas PreGap y Gap (<http://staden.sourceforge.net>). Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con el programa Blast de NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] para comparar con otras secuencias de Oomicetes de esta base de datos.

## RESULTADOS

**Aislados obtenidos.** Se hizo una siembra por cada muestra de raíces de un total de 25 muestras. Se obtuvieron 15 aislados (Cuadro 2) con características morfológicas de *P. cinnamomi*, en el resto de las cajas se observó crecimiento bacteriano, por lo que se descartaron.

**Tipo de compatibilidad.** Las cruces de los aislados con una cepa de tipo de compatibilidad A1 de *P. cinnamomi*, produjeron oosporas pleróticas con anteridios anfíginos. Las cruces de los aislados con una cepa de tipo de compatibilidad A2 solamente produjeron clamidosporas globosas (Figura 1D). Los resultados indican que los aislados corresponden al tipo de compatibilidad A2.

**Caracterización morfológica y molecular.** Los aislados desarrollaron colonias de forma rosácea y bordes ondulados, con micelio abundante, algodonoso, coraloides, hifas cenocíticas con hinchamientos, con clamidosporas globosas, en medio de cultivo HMA, en medio sV8-A las colonias presentaron forma estrellada (Figuras 1F-G). Los aislados produjeron esporangios sin papila, ovoides, elipsoides,

**Table 2. Comparison of averages (Tukey, 0.05) of growth diameter and inhibition (%) of isolates of *P. cinnamomi* collected in Zitácuaro, Michoacán, exposed to potassium phosphite and metalaxil-M.**

**Cuadro 2. Comparación de medias (Tukey, 0.05) de diámetro de crecimiento e inhibición (%) de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Zitácuaro, Michoacán, expuestos a fosfito de potasio y metalaxil-M.**

Fosfito de potasio (Fp)			Metalaxil-M (Mtx)		
Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)	Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)
0	16.4 a	0.0 a <sup>z</sup>	0	17.7 a	0 a
5	16.5 a	-0.7 a	0.5	5.0 b	72.3 b
10	11.2 b	31.5 b	1	2.3 c	87.1 c
25	8.7 c	46.8 c	3	0.66 c	96.3 d
50	3.9 d	75.1 d	5	0.46 c	97.4 d
100	1.0 e	93.7 e			
300	0.2 e	98.6 e			
600	0.0 e	99.6 e			

<sup>z</sup>Means with the same letter are statistically equal. / <sup>z</sup>Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

coraloid mycelia, coenocytic hyphae with swellings, with globose chlamydospores on HMA culture medium, whereas in the sV8-A medium, the cultures were star-shaped (Figures 1F-G). The isolates produced sporangia without papillae, ovoid, ellipsoid, persistent and with internal proliferation in the cultures flooded with a salt solution (Figure 1A-E). The characteristics observed coincide with those reported for *P. cinnamomi* (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005; Abad *et al.*, 2019). The analyzed sequences of the ITS region of the isolates selected for molecular identification ZITR-1-3 and ZITR-5-3 coincide with those reported for *P. cinnamomi*.

**Pathogenicity tests.** The tests on the avocado fruits turned out positive. Seventy-two hours after inoculation (hai) dark circular lesions with irregular edges were found on the epidermis. At 96 hai, the

con proliferación interna y persistentes, en los cultivos inundados con una solución de sales (Figura 1A-E). Las características observadas concuerdan con las reportadas para *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005; Abad *et al.*, 2019). Las secuencias analizadas de la región ITS de los aislados seleccionados para la identificación molecular ZITR-1-3 y ZITR-5-3, coinciden con las reportadas para *P. cinnamomi*.

**Pruebas de patogenicidad.** Las pruebas en frutos de aguacate resultaron positivas, a las 72 h posinoculación (hpi) se observaron lesiones oscuras, circulares, con bordes irregulares en la epidermis. A las 96 hpi las lesiones tenían entre 3 y 6 cm de diámetro. Los frutos testigos no presentaron daños y todos los aislados fueron reaislados de los frutos inoculados, demostrándose así la patogenicidad al completarse los postulados de Koch (Figura 1H).





**Figure 1. Morphological characteristics and pathogenicity of *P. cinnamomi*.** A) Coraloid mycelium; B-C) Sporangia without papillae, ovoid-ellipsoid; D) Globose chlamydospores in groups; E) Internal proliferation of sporangia; F) Cotton-like, star-shaped culture, in a cV8A medium; G) Rosaceous-shaped culture in a HM medium; H) Pathogenicity in fruits of the isolates (downwards) ZITR-2-5, ZITR-3-4, ZITR-5-3, ZITR-1-3 and control.

**Figura 1. Características morfológicas y patogenicidad de *P. cinnamomi*.** A) Micelio coraloide; B-C) Esporangios sin papilas ovoides-elipsoides; D) Clamidosporas globosas en grupos; E) Proliferación interna de esporangios; F) Colonia en forma estrellada, algodonosa en medio cV8A; G) Colonia rosácea en medio HM; H) Patogenicidad en frutos de los aislados (de arriba hacia abajo) ZITR-2-5, ZITR-3-4, ZITR-5-3, ZITR-1-3 y testigo.



diameter of the lesions were between 3 and 6 cm. The control fruits displayed no symptoms and all the isolates were reisolated from the inoculated fruits, thus proving the pathogenicity completing Koch's postulates (Figure 1H).

**Sensitivity to fungicides.** The effect of fungicides Fp and Mtx on the growth of the culture and the percentage of inhibition of the isolates between treatments was significant ( $P > 0.001$ ). No fungicide-resistant isolates were found. With Fp, no statistical differences were found between isolates for growth ( $P > 0.63$ ) or for inhibition ( $P > 0.982$ ) of the mycelium, unlike with the different concentrations, in which significance was found. Additionally, something in particular that was observed was the promotion of the growth of eight isolates (ZITR-1-3, ZITR-1-5, ZITR-2-1, ZITR-2-4, ZITR-3-2, ZITR-3-4, ZITR-5-1, ZITR-5-3) by Fp at  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1.15-18.61%) (Figure 2). In the comparison of averages, six groups were formed; no significant difference was found in growth between the control (16.76 mm) and the first concentration (16.02 mm). Growth was mainly inhibited at 100, 300 and  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , with these concentrations it resulted statistically equal, for both growth and for inhibition (Table 2). The values of the effect of Fp on the inhibition of growth ranged between 54.7 and 74.2 % regarding the control, and for the  $EC_{50}$ , between 11.8 and  $37.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  with a mean of  $24.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  for potassium phosphite. For Mtx, a lower variation was observed between treatments regarding Fp; at concentrations of 3 and  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , the mycelium was mostly inhibited; the percentage of inhibition ranged between 80.4 and 100% and the values of  $EC_{50}$  ranged from 0.08 to  $0.34 \mu\text{g mL}^{-1}$  with a mean of  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  of metalaxyl-M. There was no significance in the growth ( $P > 0.996$ ) or inhibition ( $P > 1.0$ ) of the mycelium among isolates (Table 3).

**Sensibilidad a fungicidas.** El efecto de los fungicidas Fp y Mtx en el crecimiento de la colonia y porcentaje de inhibición de los aislados entre tratamientos resultó significativo ( $P > 0.001$ ). No se detectaron aislados resistentes a los fungicidas. Con Fp no se observaron diferencias estadísticas entre aislados para crecimiento ( $P > 0.63$ ) ni para inhibición ( $P > 0.982$ ) del micelio, caso contrario fue entre las diferentes concentraciones donde si hubo significancia. Además, algo particular que se observó fue la promoción del crecimiento de ocho aislados (ZITR-1-3, ZITR-1-5, ZITR-2-1, ZITR-2-4, ZITR-3-2, ZITR-3-4, ZITR-5-1, ZITR-5-3) por Fp a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1.15-18.61%) (Figura 2). En la comparación de medias se formaron seis grupos, no se observó diferencia significativa de crecimiento entre el control (16.76 mm) y la primera concentración (16.02 mm); el crecimiento fue mayormente inhibido a 100, 300 y  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando estas concentraciones estadísticamente iguales, tanto para crecimiento como para inhibición (Cuadro 2). Los valores del efecto de Fp en la inhibición del crecimiento oscilaron entre 54.7 y 74.2 % con respecto al testigo y para la  $CE_{50}$  entre 11.8 y  $37.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  con una media de  $24.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfito de potasio. Para Mtx, se observó menor variación entre los tratamientos con respecto a Fp, a concentraciones de 3 y  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  el micelio fue mayormente inhibido, el porcentaje de inhibición osciló entre 80.4 y 100% y los valores de  $CE_{50}$  oscilaron entre 0.08 y  $0.34 \mu\text{g mL}^{-1}$  con una media de  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil-M. Entre los aislados no hubo significancia en el crecimiento ( $P > 0.996$ ) ni en la inhibición ( $P > 1.0$ ) del micelio (Cuadro 3).

**Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio.** Los análisis mostraron un efecto significativo ( $P > 0.001$ ) en la tasa de crecimiento del micelio a las dos temperaturas y en los dos medios nutritivos y sus interacciones; en la

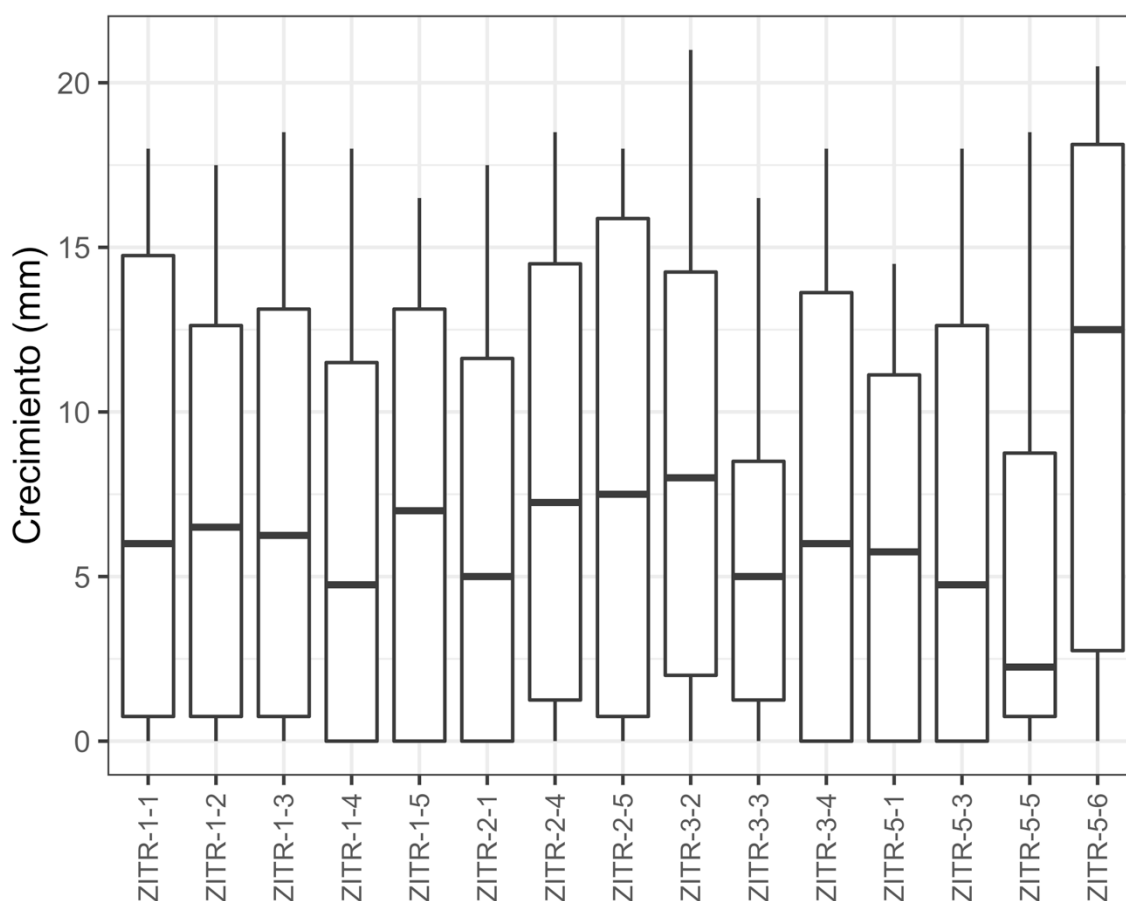


Figure 2. Inhibition of the mycelial growth of *P. cinnamomi* isolates collected in Zitácuaro, Michoacán against potassium phosphite.

Figura 2. Inhibición del crecimiento micelial de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Zitácuaro, Michoacán ante fosfito de potasio.

### Effect of the temperature and culture medium on the growth of the mycelium.

The analyses displayed a significant ( $P > 0.001$ ) effect on the mycelium growth rate at both temperatures, in both nutrient media and their interactions. In the test for the comparison of means, six groups were formed and the isolates with the greatest inhibition (%) to Fp presented a greater growth speed than those with the lowest inhibition. However, isolate ZITRA-3-3, with the highest inhibition (%) displayed the lowest

prueba de comparación de medias se formaron seis grupos, los aislados con mayor inhibición (%) a Fp presentaron una mayor velocidad de crecimiento que los de menor inhibición; sin embargo, en el aislado ZITRA-3-3 con mayor inhibición (%) se observó la menor tasa de crecimiento (11.25 mm) y ZITRB-1-5 con menor inhibición (%) una mayor (21.75 mm), aunque éste último también presentó mayor variación en los datos (Figura 3). El crecimiento de los aislados ZITRA-1-4, ZITRA-5-5, ZI-

**Table 3. Compatibility type, EC<sub>50</sub> and inhibition (%) to potassium phosphite and metalaxyl-M of *P. cinnamomi* isolates collected in the municipality of Zitácuaro, Michoacán.**  
**Cuadro 3. Tipo de compatibilidad, CE<sub>50</sub> e inhibición (%) a fosfito de potasio y a metalaxil-M de aislados de *P. cinnamomi* colectados en el municipio de Zitácuaro, Michoacán.**

Aislados	Tipo de compatibilidad	% de inhibición (Fp)	CE <sub>50</sub> (Fp) (µg mL <sup>-1</sup> )	% de inhibición (Mtx)	CE <sub>50</sub> (Mtx) (µg mL <sup>-1</sup> )
ZITR-1-1	A2	63.3	24.5	88.7	0.18
ZITR-1-2	A2	65.3	21.6	90.7	0.15
ZITR-1-3	A2	62.3	37.7	87.7	0.26
ZITR-1-4	A2	71.1	15.7	87.8	0.20
ZITR-1-5	A2	60.8	26.4	88.3	0.15
ZITR-2-1	A2	63.2	21.8	83.3	0.35
ZITR-2-4	A2	56.5	31.6	85.8	0.17
ZITR-2-5	A2	61.4	26.9	88.2	0.25
ZITR-3-2	A2	54.7	34.7	83.9	0.34
ZITR-3-3	A2	72.7	11.8	100.0	----
ZITR-3-4	A2	63.2	23.8	80.4	0.22
ZITR-5-1	A2	63.3	24.0	88.2	0.26
ZITR-5-3	A2	66.8	18.7	93.3	0.24
ZITR-5-5	A2	74.2	12.4	87.1	0.08
ZITR-5-6	A2	55.0	37.7	90.2	0.17

growth rate (11.25 mm) and ZITRB-1-5, with the lowest inhibition (%), presented a higher one (21.75 mm), although the latter also displayed a greater variation in data (Figure 3). The growth of isolates ZITRA-1-4, ZITRA-5-5, ZITRB-3-4 and ZITRB-2-4 fluctuated between 18.66 and 15.91 mm. A higher growth rate was observed in cultures at 25 °C and in the cV8-A culture medium, with the exception of isolate ZITRB-1-5, which displayed a higher growth rate at 22 °C (Figure 4). The morphology of the culture varied according to the culture medium. In the isolates in cV8-A, they displayed star-shaped cultures, and in HMA, rosaceous-shaped cultures.

## DISCUSSION

This is the first study on *P. cinnamomi* isolates related to wilt in avocado in eastern Michoacán, in the municipality of Zitácuaro. Other studies

TRB-3-4 y ZITRB-2-4 osciló entre 18.66 y 15.91 mm. Se observó una tasa de crecimiento mayor de las colonias a 25 °C y en medio de cultivo cV8-A, a excepción del aislado ZITRB-1-5, que presentó mayor crecimiento a 22 °C (Figura 4). La morfología de la colonia varió de acuerdo con medio de cultivo, los aislados en cV8-A, presentaron colonias de forma estrellada y en HMA de forma rosácea.

## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de aislados de *P. cinnamomi* asociados con la marchitez del aguacate en la región oriente de Michoacán, que incluye el municipio de Zitácuaro. Otros estudios sobre esta enfermedad han reportado la presencia de *P. cinnamomi* en otras áreas del estado (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). La superficie cultivada de aguacate en

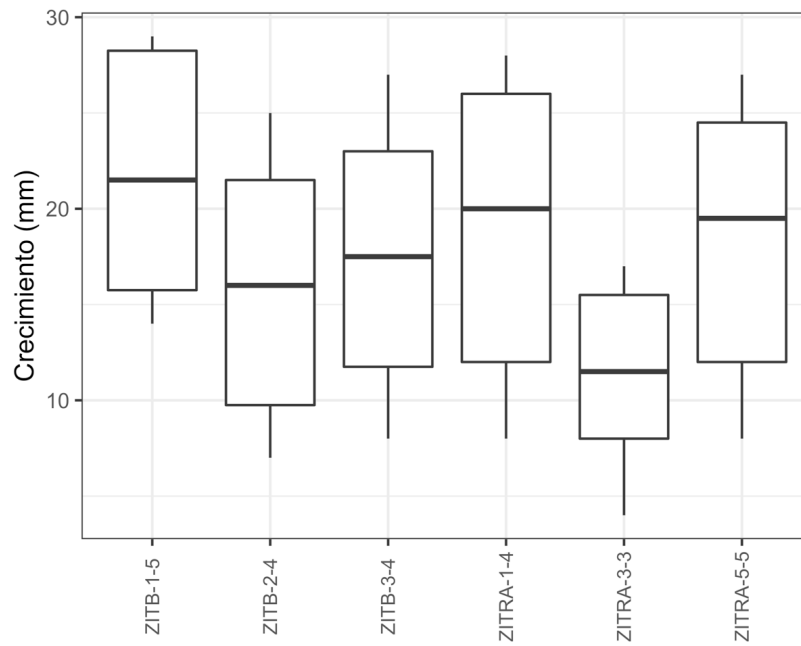


Figure 3. Effect of the temperature and culture medium on the mycelial growth of six *P. cinnamomi* isolates obtained from avocado roots with rotting.

Figura 3. Efecto de temperatura y medio de cultivo en el crecimiento micelial de seis aislados de *P. cinnamomi* obtenidos de raíces de aguacate con pudrición.

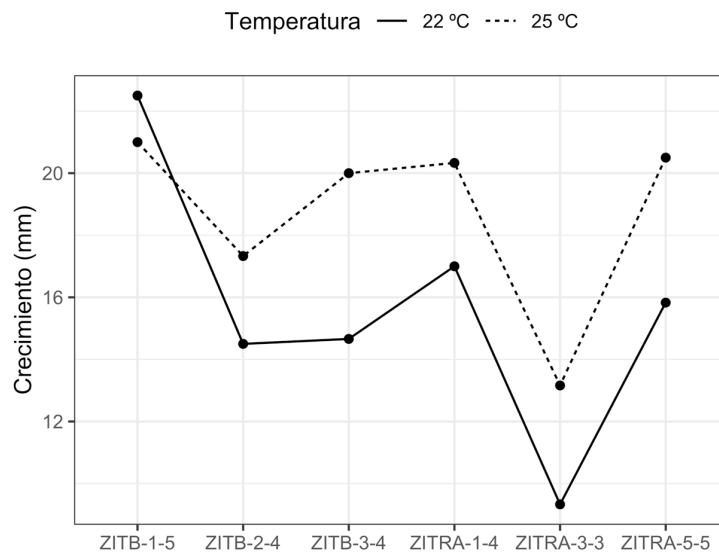


Figure 4. Effect of 22 and 25 °C temperatures on six *P. cinnamomi* isolates from avocado roots with rotting.

Figura 4. Efecto de las temperaturas 22 y 25 °C en seis aislados de *P. cinnamomi* aislados de raíces de aguacate con pudrición.

on this disease have reported the presence of *P. cinnamomi* in other areas of the state (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). The surface with avocado plantations in Zitácuaro has increased in recent years and could potentially be an important production area in the future. However, the presence of the pathogen *P. cinnamomi* represents a threat to the crop. This area displays certain agroclimatic characteristics, such as the presence of Acrisol soils, which promote the development of this disease (Zentmyer, 1980; Guillén-Andrade *et al.*, 2007). The sampled trees were adults, established in orchards with high contents of clay and poor drainage, which contributed to the presence of the disease (Zentmyer, 1980; Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005). Although in this study only isolates with morphological characteristics of *P. cinnamomi* in trees with root rot were recovered, the presence of other oomycetes is not discarded.

All isolates corresponded to compatibility type A2, which indicates that the oomycete is reproducing asexually. Despite Ochoa-Fuentes *et al.* (2005) reporting both compatibility types with molecular markers in Michoacán, they did not prove it with crosses, as performed in this study, which is considered the most accurate way to determine them. The morphological characteristics observed in the isolates coincide with those described for *P. cinnamomi* according to Abad *et al.* (2019). This identity was verified with the amplification of the ITS region in selected isolates and the pathogenicity was proven on avocado fruits. *P. cinnamomi* is one of the 10 main phytopathogenic oomycetes, it infects over 5000 species (Hardham, 2005) and its pathogenicity has been proven (Linde *et al.*, 1999; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018; Belisle *et al.*, 2019b).

For many years, phosphites have been used to control root rot. Avocado producers use potassium phosphite more frequently than metalaxyl-M, due

Zitácuaro se ha incrementado en los últimos años y potencialmente podría ser un área importante de producción en el futuro; sin embargo, la presencia del patógeno *P. cinnamomi* representa una amenaza para el cultivo. Esta zona presenta ciertas características agroclimáticas, como es la presencia de suelos de tipo Acrisol, que favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Zentmyer, 1980; Guillén-Andrade *et al.*, 2007). Los árboles muestreados fueron adultos, establecidos en huertos con suelos con alto contenido de arcilla y poco drenaje, factores que contribuyeron a la presencia de la enfermedad (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). Aun cuando en este trabajo se recuperaron solamente aislados con características morfológicas de *P. cinnamomi* en árboles con pudrición de raíces, no se descarta la presencia de otros oomicetes.

Todos los aislados correspondieron al tipo de compatibilidad A2, lo que es indicativo de que el oomiceto se está reproduciendo de manera asexual. Aunque en Michoacán, Ochoa-Fuentes *et al.* (2005) reportaron los dos tipos de compatibilidad mediante marcadores moleculares, no lo demostraron mediante cruces, como se hizo en el presente estudio, que se considera la forma más precisa para determinarlos. Las características morfológicas observadas en los aislados concuerdan con las descritas para *P. cinnamomi* de acuerdo a Abad *et al.* (2019), identidad que se corroboró, con la amplificación de la región ITS en aislados seleccionados y cuya patogenicidad se demostró en frutos de aguacate. *P. cinnamomi* se encuentra entre los 10 principales oomicetos patógenos de plantas, que infecta más de 5000 especies (Hardham, 2005) y su patogenicidad ha sido demostrada (Linde *et al.*, 1999; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018; Belisle *et al.*, 2019b).

Desde hace años, los fosfitos se han utilizado para el control de la pudrición de raíz, los productores de aguacate utilizan con mayor frecuencia el fosfito de potasio que el metalaxil-M, debido a que



to its higher efficiency and lower cost than others (Adaskaveg *et al.*, 2015; Belisle *et al.*, 2019b). Our results prove that there are no resistant isolates to the fungicides evaluated in Zitácuaro, Michoacán. However, regarding potassium phosphite, a lower sensitivity was observed in the isolates than towards metalaxyl-M. The values obtained for  $EC_{50}$  fluctuated between 11.8 and 37.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of potassium phosphite, and for growth inhibition, between 54.7 and 74.2% in comparison with the control, which are similar to those obtained by Wilkinson *et al.* (2001), who obtained inhibition values ranging from 59 to 100%. Eight of the isolates displayed an enhancement in growth when they were exposed to the concentration of 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a of potassium phosphite, and these results coincide with those by Wilkinson *et al.* (2001) and Hunter *et al.* (2018). This may be due to the possibility that, at low potassium phosphite concentrations, in the cV8 nutrient-rich medium, it may be easier for *P. cinnamomi* to alter its growth as a survival strategy, along with the fungistatic effect not affecting the mycelial growth (Guest and Grant, 1991; Hunter *et al.*, 2018). Another reason is the loss in sensitivity of the isolates due to the frequent exposure to the fungicide, since they undergo a pressure of selection, which may eventually lead to the development of resistance, even if there is no sexual recombination (Dobrowolski *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2018). Not only has *P. cinnamomi*, been reported as sensitive to potassium phosphite, also *P. syringae* and *P. citrophthora*, although the inhibition of growth of the species *in vitro* is not indicative of the disease control held in the field as being effective (Hao *et al.*, 2021).

On the other hand, although Marin *et al.* (2021) reported the development of resistance in *Phytophthora* species to metalaxyl-M (mefenoxam), our study observed an average growth inhibition of 88.24% and a  $EC_{50}$  value of 0.08

es eficaz y de menor costo que otros (Adaskaveg *et al.*, 2015; Belisle *et al.*, 2019b). Nuestros resultados demuestran que no hay aislados resistentes a los fungicidas evaluados en Zitácuaro Mich; sin embargo, por lo que respecta a fosfito de potasio se observó menor sensibilidad de los aislados con respecto a metalaxil-M. Los valores obtenidos de  $CE_{50}$  oscilaron entre 11.8 y 37.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfito de potasio y para la inhibición del crecimiento entre 54.7 y 74.2 % comparado con el testigo, los cuales resultan similares a los obtenidos por Wilkinson *et al.* (2001), quienes obtuvieron valores de inhibición que oscilaron entre 59 y 100 %. En ocho de los aislados se observó una promoción de crecimiento cuando fueron expuestos a la concentración de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a de fosfito de potasio, resultados que concuerdan con los de Wilkinson *et al.* (2001) y Hunter *et al.* (2018). Lo anterior podría deberse a que, a bajas concentraciones de fosfito de potasio, en medio rico en nutrientes cV8, sea más fácil para *P. cinnamomi* alterar el crecimiento como una estrategia de supervivencia, además que por su efecto fungistático no afecta el crecimiento micelial (Guest y Grant, 1991; Hunter *et al.*, 2018). Otra razón es la pérdida de sensibilidad de los aislados debido a la posible exposición frecuente al fungicida ya que son sometidos a una presión de selección, situación que eventualmente podría generar el desarrollo de resistencia, incluso aunque no exista recombinación sexual (Dobrowolski *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2018). Además de *P. cinnamomi*, se ha reportado la sensibilidad a fosfito de potasio de *P. syringae*, *P. citrophthora*, sin embargo, la inhibición del crecimiento de las especies *in vitro*, no es indicativo de que en campo el control de la enfermedad sea efectivo (Hao *et al.*, 2021).

Por otro lado, aunque Marin *et al.* (2021) reportaron desarrollo de resistencia de especies de *Phytophthora* a metalaxil-M (mefenoxan), en el presente estudio se observó en promedio un

and 0.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of metalaxyl-M  $\text{mL}^{-1}$ , suggesting that the *P. cinnamomi* populations obtained from avocado are sensitive to the fungicide. In a similar study, the isolates obtained from ornamental plants in nurseries were less sensitive, with a  $\text{EC}_{50}$  value of 0.01-0.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of metalaxyl (Hu *et al.*, 2010). This may be due to the applications being more controlled and less frequent in the nurseries than in the field. In North Carolina, sensitivity tests performed on *P. cinnamomi* isolated from Christmas trees gave percentages of inhibition that fluctuate between 89 and 100%, despite metalaxyl-M applications being carried out in the region two or three times a year (Benson and Grant, 2000). This confirms that *P. cinnamomi* is sensitive to metalaxyl-M, along with the fact that high percentages of inhibition of mycelial growth by metalaxyl-M have also been observed in other species such as *P. nicotianae* (73.5%) and *P. × pelgrandis* (97.5%) (Pánek and Tomšovský *et al.*, 2017).

On the other hand, González *et al.* (2014) indicated that the V8 culture medium promotes the growth of *Phytophthora* in regard to other media. These results are consistent with those obtained in this work, since the isolates with the most growth were those plated on V8. A difference in growth was found between both temperatures, with 25 °C being more favorable, since it is within the optimum growth temperature range of *P. cinnamomi* that ranges between 24 and 28 °C (Erwin and Ribeiro 1996).

In Mexico, the sensitivity studies performed on *P. cinnamomi* isolates to fungicides are scarce. The results of this work provide an estimation of the range of sensitivity to potassium phosphite and metalaxyl-M of *P. cinnamomi* isolates that cause root rot in avocado produced in the municipality of Zitácuaro, Michoacán. However, it is necessary to carry out further studies which include a greater number of isolates from the main producing

88.24% de inhibición del crecimiento y un valor de  $\text{CE}_{50}$  de 0.08 y 0.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil-M  $\text{mL}^{-1}$  lo que sugiere que las poblaciones de *P. cinnamomi* obtenidas de aguacate son sensible al fungicida. En un estudio similar, los aislados obtenidos de plantas ornamentales de vivero fueron menos sensibles con valores de  $\text{CE}_{50}$  de 0.01-0.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil (Hu *et al.*, 2010). Lo anterior puede deberse a que en los viveros las aplicaciones son más controladas y con menor frecuencia que en campo. En Carolina del Norte, en pruebas de sensibilidad de *P. cinnamomi* aislada de árboles de navidad a metalaxil se obtuvieron porcentajes de inhibición que oscilan entre 89 y 100 %, esto a pesar de que en el lugar se hacen aplicaciones de metalaxil dos o tres veces al año (Benson y Grant, 2000). Lo anterior confirma que *P. cinnamomi* es sensible a metalaxil-M, además los altos porcentaje de inhibición de crecimiento micelial por metalaxil-M, también se han observado en otras especies como *P. nicotianae* (73.5%) y *P. × pelgrandis* (97.5%) (Pánek y Tomšovský *et al.*, 2017).

Así mismo, González *et al.* (2014) indicaron que el medio de cultivo V8 promueve el crecimiento de *Phytophthora* respecto a otros medios. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo ya que los aislados con mayor crecimiento fueron los cultivados en V8. Se observó diferencia de crecimiento entre las dos temperaturas, favoreciéndoles la de 25 °C, la cual se encuentra dentro del rango de temperatura óptima de crecimiento de *P. cinnamomi* que oscila entre 24 y 28 °C (Erwin y Ribeiro 1996).

En México, los estudios de sensibilidad de aislados de *P. cinnamomi* a fungicidas son escasos. Los resultados de este trabajo dan una estimación del rango de sensibilidad a fosfito de potasio y metalaxil-M de aislados de *P. cinnamomi* causando pudrición de raíz en aguacate en el municipio de Zitácuaro, Michoacán; sin embargo, es necesario hacer más estudios que incluyan un mayor número

municipal areas, in order to help us determine if the populations of the pathogen are becoming tolerant to these fungicides.

## CONCLUSIONS

The results of this work indicate that in Zitácuaro, Michoacán, *P. cinnamomi* is the main oomycete present in avocado roots with rot. Out of 25 root samples, 15 isolates were obtained with the morphological characteristics of *P. cinnamomi*. The isolates were inhibited by more than 98% at concentrations of 300 and 600 µg mL<sup>-1</sup> of potassium phosphite and over 96 % at 3 and 5 µg mL<sup>-1</sup> with metalaxyl- M.

## LITERATURE CITED

- Abad ZG, Burgess T, Bienapfl JC, Redford AJ, Coffey M and Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for *Phytophthora* Science and Management, and World *Phytophthora* Collection. [https://idtools.org/id/phytophthora/about\\_authors.php](https://idtools.org/id/phytophthora/about_authors.php)
- Adaskaveg JE, Hao W and Forster H. 2015. Postharvest strategies for managing *Phytophthora* brown rot of citrus using potassium phosphite in combination with heat treatments. *Plant Disease* 99 (11): 1477-1482. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0040-RE>
- Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Ruíz HA, Pintado MM and Aguilar C. 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology* 80: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Belisle RJ, Hao W, McKee B, Arpaia ML, Manosalva P and Adaskaveg JE. 2019a. New Oomycota fungicides with activity against *Phytophthora cinnamomi* and their potential use for managing avocado root rot in California. *Plant Disease* 103 (8): 2024-2032. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1698-RE>
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019b. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0326-R>
- Benson DM and Grand L. F. 2000. Incidence of *Phytophthora* root rot of Fraser fir in North Carolina and sensitivity of isolates of *Phytophthora cinnamomi* to metalaxyl.

de aislados provenientes de los principales municipios productores, que nos permita determinar si las poblaciones del patógeno están desarrollando tolerancia a dichos fungicidas.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que, en Zitácuaro, Michoacán, *P. cinnamomi* es el principal oomicete presente en raíces de aguacate con pudrición, de 25 muestras de raíces, se obtuvieron 15 aislados con características morfológicas de *P. cinnamomi*. Los aislados se inhibieron más del 98% a concentraciones de 300 y 600 µg mL<sup>-1</sup> de fosfito de potasio y arriba de 96% a 3 y 5 µg mL<sup>-1</sup> con metalaxil- M.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Plant Disease* 84(6): 661- 664. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.661>.
- Chen D and Zentmyer GA. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62 (2): 397-402. <https://doi.org/10.2307/3757597>
- Coffey MD. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. Pages 423-444. *in: Plant diseases of international importance. Volumen III. Diseases of fruit crops.* Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadhyay AN. eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. 456 pp
- Dann EK, Cooke AW, Forsberg LI, Pegg KG, Tan YP and Shivas RG. 2012. Pathogenicity studies in avocado with three necrotrophic 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 and McLeod A. 2021. Phosphonic acid: A long-standing and versatile crop protectant. *Pest Management Science* 77(5): 2197-2208. <https://doi.org/10.1002/ps.6156>
- Darvas J and Becker O. 1984. Failure to control *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium splendens* with metalaxyl after its prolonged use. *Avocado Growers' Association Yearbook* 7: 77-78.
- Dobrowolski M, Shearer B, Colquhoun I, O'Brien P and Hardy G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57(5): 928-936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01883.x>

- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Am. Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- FAOSTAT. 2020. FAO Statistics División 2020. (<http://faostat.fao.org>; accesada agosto 2020).
- Fernández-Pavía S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Abad GZ, Félix-Gastélum R, Ochoa-Ascencio S, Garay-Serrano E, Mondragón-Flores A, Soto-Plancarte A, Grünwald NJ y Santillán-Mendoza R. 2020. Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84p
- García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación de Köppen. 3ª Edición. Instituto de Geografía. UNAM. México, D.F.
- González PFD, Costales MD and Falcón RAB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal 29 (1): 33-41. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&tlng=es).
- Gray MA, Hao W, Forster H and Adaskaveg JE. 2018. Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from citrus in California. Plant Disease 102 (4): 734-742. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1155-RE>
- Guest D and Grant BR. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biological Reviews 66 (2):159-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x>
- Guillén-Andrade H, Lara-Chávez BN, Gutiérrez-Contreras M, Ortiz-Catón M y Ángel-Palomares E. 2007. Cartografía Agroecológica del cultivo del aguacate en Michoacán. Morevallado editores de Morelia, Michoacán, México. Primera edición. 141p.
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6 (6): 589–604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hernández-Pérez A, Cerna-Chávez E, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM and Ochoa-Fuentes YM. 2019. First report of *Phytophythium vexans* causing the “avocado sadness” in Michoacan, Mexico. Revista Internacional de Botánica Experimental 88 (1): 11-13. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.04608>
- Hao W, Förster H and Adaskaveg. 2021. Resistance to potassium phosphite in *Phytophthora* species causing citrus brown rot and integrated practices for management of resistant isolates. Plant Disease 105(4): 972-977. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1414-RE>
- Hu J, Hong C, Stromberg E and Moorman G. 2010. Mefenoxam sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* isolates. Plant Disease 94 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0039>
- Hunter S, Williams N, McDougal R, Scott P and Garbelotto M. 2018. Evidence for rapid adaptive evolution of tolerance to chemical treatments in *Phytophthora* species and its practical implications. PLoS ONE 13(12): e0208961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208961>
- Hwang J and Benson DM. 2005. Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 89 (2):185-190. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0185>
- Hwang SC, Ko WH and Aragaki M. 1975. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia 67(6): 1233-1234. <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019873>
- Linde C, Kemp GHJ and Wingfield MJ. 1999. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Plant Pathology 105 (3): 231-239 <https://doi.org/10.1023/A:1008780429770>
- Marin MV, Seijo TE, Zuchelli E and Peres NA. 2021. Resistance to mefenoxam of *Phytophthora cactorum* and *P. nicotianae* causing crown and leather rot in Florida strawberry. Plant Disease <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2474-RE>
- Müller U and Urich G. 2012. Newest aspects of nucleic acid synthesis inhibitors: Metalaxyl-M. Pages 901-908 in: Modern Crop Protection Compounds, 2nd ed. W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke, and M. Witschel eds. Wiley, Weinheim, German. 1608 pp
- O’Gara E, Howard K, McComb J, Colquhoun IJ and Hardy GESJ. 2015. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 64 (1): 207-215. <https://doi.org/10.1111/ppa.12244>
- Ochoa-Fuentes YM, Hernandez FD, Landeros J, Olalde V, Cerna E, Morales JL and Flores A. 2005. Compatibilidad sexual de *Phytophthora cinnamomi* Rands en Michoacán México. Phytón 54: 79-85.
- Ochoa-Fuentes YM, Hernández-Pérez A, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM, Hernández-Bautista O and Cerna-Chávez E. 2018. First report of avocado tree wilt by *Pythium sp. amazonianum* in Mexico. Ciencia e Investigación Agraria 45(3): 301-305. <https://dx.doi.org/10.7764/rcia.v45i3.1905>
- Ochoa-Fuentes YM, Martínez-de la Vega O, Olalde-Portugal V, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Castillo FD and Flores-Olivas A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 25 (2):161-166.
- Olalde-Lira G, Raya-Montañón YA, Apérez-Barrios P, Vargas-Sandoval M, Pedraza-Santos M, Raymundo T, Valenzuela-Garza R and Lara-Chávez MBN. 2020. Characterization of *Fusarium* spp., a phytopathogen of avocado (*Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schltdl. and Cham.) in Michoacán, México. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 52 (2): 301-316. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/3875>
- Pánek M and Tomšovský M. 2017. *In vitro* growth response of *Phytophthora cactorum*, *P. nicotianae* and *P. × pelgrandis* to antibiotics and fungicides. Folia Microbiol (Praha) 62(4): 269-277. doi: 10.1007/s12223-017-0493-z.
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. Revista Ceres 61(1): 50-61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2017. Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* under different management regimes. Plant Pathology 66(4): 623-632. <https://doi.org/10.1111/ppa.12620>

- Robin C, Smith I and Hansen EM. 2012. *Phytophthora cinnamomi*. Forest *Phytophthoras* 2(1). <https://doi.org/10.5399/osu/fp.2.1.3041>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthium vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (1): 89-106. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-22022](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022)
- Ruano-Rosa D and López Herrera CJ. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. *Biological Control* 51(1): 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.005>
- SIAP (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2019. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 p.
- Vitale A, Aiello D, Guarnaccia V, Perrone G, Stea G and 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>.
- Wilkinson CJ, Shearer BL, Jackson TJ and Hardy GESJ. 2001. Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant Pathology* 50 (1): 83-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00539.x>
- Zentmyer GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul, Minnesota. 96 p.