



Artículo Científico

Bacillus sp. A8a reduce la marchitez por *Phytophthora* y modifica la acumulación de taninos en aguacate

Edgar Guevara-Avenidaño, Itzel Anayansi Solís-García, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec 351, Xalapa, Veracruz; **Alfonso Méndez-Bravo**, CONAHCYT—Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Morelia, Michoacán; **Fernando Pineda-García**¹; **Guillermo Angeles-Alvarez**, **Carolina Madero-Vega**, Red de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec 351, Xalapa, Veracruz; **Sylvia P. Fernández-Pavía**, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Carretera Morelia Zinapécuaro km 9.5, Tarímbaro, Michoacán; **Alejandra Mondragón-Flores**, Campo Experimental Valle de Apatzingán-INIFAP, Carretera Apatzingán-Cuatro caminos km 17.5, Antúnez, Michoacán; **Frédérique Reverchon***, Red de Diversidad Biológica del Occidente Mexicano, Centro Regional del Bajío, Instituto de Ecología, A.C., Av. Lázaro Cárdenas 253, Pátzcuaro, Michoacán.

*Autor de
correspondencia:
Frédérique Reverchon
frederique.reverchon@inecol.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
17 Septiembre, 2023

Aceptado:
06 Noviembre, 2023

Publicado:
08 Diciembre, 2023

Cita:
Guevara-Avenidaño E,
Solís-García IA, Méndez-
Bravo A, Pineda-García
F, Angeles-Alvarez
G, Madero-Vega C,
Fernández-Pavía SP,
Mondragón-Flores
A y Reverchon F.
2024. *Bacillus* sp. A8a
reduce la marchitez
por *Phytophthora* y
modifica la acumulación
de taninos en aguacate.
Revista Mexicana de
Fitopatología 42(1).<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2309-2>



RESUMEN

Objetivo/Antecedentes. El objetivo fue corroborar la capacidad como agente de biocontrol de la cepa *Bacillus* sp. A8a en árboles de aguacate (*Persea americana*) infectados por *Phytophthora cinnamomi*.

Materiales y Métodos. Se implementó un experimento en invernadero con cuatro tratamientos: 1) plantas control; 2) plantas infectadas por *P. cinnamomi*; 3) plantas inoculadas con *Bacillus* sp. A8a; 4) plantas infectadas por *P. cinnamomi* e inoculadas con *Bacillus* sp. A8a. Se evaluaron distintas variables morfo-fisiológicas durante el experimento, hasta 25 días después de la infección (ddi). Además, se analizó la densidad de taninos en cortes de tallo a los 25 ddi, para determinar la respuesta de defensa de los árboles ante la enfermedad.

Resultados. La inoculación de la cepa A8a redujo los síntomas de marchitez en un 49% a los 25 ddi, en comparación con las plantas no inoculadas. No se encontraron diferencias en las variables morfo-fisiológicas registradas entre tratamientos. Sin embargo, se detectó una mayor acumulación de taninos en el xilema de tallos de plantas infectadas, mientras que las plantas inoculadas con la cepa A8a mostraron una mayor densidad de taninos en el córtex.

Conclusión. Nuestros resultados confirman la actividad de biocontrol de *Bacillus* sp. A8a en aguacate e indican que la acumulación diferencial de taninos en el córtex de plantas inoculadas con la bacteria podría contribuir a la mayor tolerancia de las plantas de aguacate ante la marchitez por *Phytophthora*.

Palabras clave: Biocontrol; Defensa química; *Persea americana*; *Phytophthora cinnamomi*; Potencial hídrico.

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor y exportador de aguacate (*Persea americana*) a nivel mundial, con una producción anual de 2,393,849 toneladas (FAOSTAT, 2020). A nivel nacional, Michoacán es el estado con mayor producción (SIAP, 2019). Sin embargo, la incidencia de plagas y enfermedades ha restringido la productividad del cultivo (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020). Una de las enfermedades más destructivas de los huertos de aguacate a nivel global es la marchitez o pudrición de la raíz ocasionada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* (Van den Berg *et al.*, 2021). En México, *P. cinnamomi* se encuentra presente en las principales zonas productoras de aguacate con una incidencia estimada entre el 5 y el 90 %, considerándose así uno de los principales factores limitantes de la producción de este fruto (Agapito-Amador *et al.*, 2022; Mondragón-Flores *et al.*, 2022).

Phytophthora cinnamomi afecta a todas las variedades de aguacate, teniendo mayor incidencia en suelos con bajo drenaje debido a su mecanismo de infección, la cual ocurre a través de zoosporas motiles (Hardham, 2005) o de clamidosporas (Hwang y Ko, 1978). *P. cinnamomi* causa necrosis en las raíces finas, limitando así la adquisición de agua y nutrientes, la marchitez a nivel foliar y, finalmente, la muerte regresiva de los árboles (Hardham, 2005). Entre las respuestas estructurales y/o bioquímicas de defensa del hospedante a la infección por *P. cinnamomi*, se ha reportado la acumulación de lignina o de calosa para reforzar la pared celular, la acumulación de compuestos fenólicos en raíces y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (van der Berg *et al.*, 2018; Camisón *et al.*, 2019). En otros hospedantes, las respuestas de defensa ante *P. cinnamomi* incluyen la acumulación de taninos (Camisón *et al.*, 2019). Sin embargo, es necesario seguir investigando los mecanismos de defensa de variedades de *P. americana* ante la infección, para ampliar nuestro entendimiento de este patosistema (van der Berg *et al.*, 2021).

Las estrategias de manejo de la marchitez por *Phytophthora* suelen incluir prácticas culturales encaminadas a reducir la saturación en agua de los suelos, el uso de porta-injertos tolerantes o resistentes al patógeno y la aplicación de fungicidas (Belisle *et al.*, 2019; Ramírez-Gil y Morales-Osorio, 2020). Factores como el incremento en la resistencia a fungicidas por parte del fitopatógeno, así como las restricciones establecidas en torno a la aplicación de agroquímicos para la exportación de aguacate, han favorecido la búsqueda de estrategias alternativas de control que sean más amigables con el medio ambiente (Cortazar-Murillo *et al.*, 2023). En este contexto, el uso de microorganismos como agentes de control biológico de *P. cinnamomi* ha ganado interés. La mayoría de los reportes disponibles sobre el biocontrol de *P. cinnamomi* se ha enfocado en evaluar cepas de *Trichoderma* spp., por ser hongos que presentan diferentes mecanismos de antagonismo (López-Herrera *et al.*, 1999;

Martins *et al.*, 2022). También se ha sugerido el uso de bacterias como *Serratia* sp. ARP5.1 o *Pseudomonas fluorescens* como agentes promisorios de biocontrol, por la actividad antagónica de sus metabolitos contra *P. cinnamomi* (Granada *et al.*, 2018; Sumida *et al.*, 2020). Estos antecedentes demuestran el potencial de bacterias como agentes de biocontrol de *P. cinnamomi*.

En un estudio previo, Méndez-Bravo *et al.* (2018) aislaron la cepa *Bacillus* sp. A8a a partir de suelo rizosférico de aguacate. Dicha cepa presentó actividad antagónica contra *P. cinnamomi* en ensayos de antagonismo directo y a través de la emisión de compuestos volátiles; además, los extractos crudos de *Bacillus* sp. A8a inhibieron totalmente el crecimiento de *P. cinnamomi* (Cortazar-Murillo *et al.*, 2023). La capacidad promotora de crecimiento vegetal de *Bacillus* sp. A8a fue confirmada en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en tomatillo (*Physalis ixocarpa*) (Méndez-Bravo *et al.*, 2018, 2023). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de biocontrol de *Bacillus* sp. A8a, determinando el efecto de su inoculación sobre variables morfo-fisiológicas y porcentaje de marchitez en plantas de aguacate infectadas por *P. cinnamomi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó como agente potencial de biocontrol la cepa bacteriana *Bacillus* sp. A8a, la cual se aisló a partir de suelo rizosférico de un árbol de aguacate asintomático en un huerto de Huatusco, Veracruz (Méndez-Bravo *et al.*, 2018). Como agente patógeno se usó la cepa TGR-1-5 de *P. cinnamomi*, donada por el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y proveniente de raíces de aguacate con pudrición de un huerto en Tinguindín, Michoacán. Se determinó su virulencia en ensayos en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Mondragón-Flores, 2022).

Preparación de inóculo bacteriano y de la suspensión de zoosporas de *P. cinnamomi*

Para generar el inóculo bacteriano, la cepa *Bacillus* sp. A8a fue cultivada en medio Luria Bertani (LB) – agar e incubada durante 24 h a 26 °C. Transcurrido este tiempo, se suspendió una asada de biomasa bacteriana en agua estéril. La concentración del inóculo bacteriano se ajustó a aproximadamente 1.5×10^8 UFC mL⁻¹, de acuerdo al punto 0.5 de la escala de McFarland.

La suspensión de zoosporas de *P. cinnamomi* se preparó de acuerdo a lo descrito por Zentmyer y Chen (1969) con ligeras modificaciones. Brevemente, la cepa *P. cinnamomi* TGR 1-5 se cultivó en cajas Petri con agar harina de maíz durante seis días a 25 °C.

Posteriormente, se realizaron cortes cuadriculares de micelio de aproximadamente 0.5 cm². Los cuadros de micelio se distribuyeron de forma equitativa en dos cajas Petri nuevas, a cada caja se agregaron 10 mL de medio de cultivo líquido V8 clarificado (0.01 g de CaCO₃, 10 mL de jugo V8 Campbell's® y 990 mL de agua destilada) y se incubaron 24 h a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se decantó el medio V8, el micelio se lavó con 10 mL de solución de Zentmyer (1.64 g de Ca(NO₃)₂, 0.05 g KNO₃ y 0.48 g de MgSO₄ en 1 L de agua tridestilada) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con exposición a luz fluorescente. El lavado con solución mineral se repitió seis veces. Posteriormente, el micelio se incubó a 23 °C con exposición a luz fluorescente durante 10 h, seguido de 8 h en oscuridad. Para promover la liberación de zoosporas, se retiró la solución de sales y el micelio se lavó con 10 mL de agua tridestilada a 4 °C. Se agregó nuevamente agua al micelio y se incubó la mezcla durante 20 min a 4 °C. Tras este periodo, se recuperó el agua con las zoosporas de *P. cinnamomi*. Finalmente, las zoosporas se tiñeron con azul de lactofenol (2 gotas en 750 mL de solución) para poder realizar el conteo en una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración de la suspensión a 2.5×10^4 zoosporas mL⁻¹.

Implementación del experimento en invernadero

Para evaluar el potencial de *Bacillus* sp. A8a como agente de biocontrol de *P. cinnamomi*, se utilizaron 90 plantas de aguacate de la variedad Méndez de aproximadamente dos años de edad, las cuales fueron adquiridos en el vivero “Piedras Blancas” (Lagunillas, Michoacán, México). El experimento consistió en cuatro tratamientos: 1) 30 plantas “control”, únicamente tratadas con agua [C]; 2) 30 plantas infectadas por *P. cinnamomi* [Pc]; 3) 15 plantas inoculadas con *Bacillus* sp. A8a [B]; y 4) 15 plantas infectadas por *P. cinnamomi* e inoculadas con *Bacillus* sp. A8a [BPc] (Reverchon *et al.*, 2023). El día 1, definido como el día de inicio del experimento (t₀), la mitad de las plantas (n=45) se infectó con la suspensión de zoosporas de *P. cinnamomi*, de acuerdo a lo descrito por Aveling (1999) y Masikane *et al.* (2019). Primero, las plantas se extrajeron de sus bolsas de cultivo y se retiró el exceso de suelo adherido a sus raíces. Posteriormente, su sistema radical se sumergió durante dos horas en una suspensión con una concentración de 4.9×10^2 zoosporas mL⁻¹, la cual se preparó diluyendo 1.6 L de la suspensión de zoosporas de partida en 80 L de agua potable. En el caso de la otra mitad de las plantas, sus raíces fueron sumergidas en 80 L de agua potable con 1.6 L de agua tridestilada (plantas sin infectar). Cada planta fue trasplantada a una bolsa de plástico negro de 10 L, con una mezcla de sustrato compuesto de turba (PRO-MIX®)-perlita-vermiculita (proporciones 3:1:1, v/v/v) esterilizado a 121 °C durante 1 h, con 1 volumen de suelo del vivero. Después de 48 h, las plantas se sometieron a condiciones de anegamiento (saturación del sustrato) durante cinco días para favorecer el proceso infeccioso de *P. cinnamomi*. Posteriormente, se drenó el exceso de agua y se continuó con el riego de las plantas con agua potable para mantener la humedad del sustrato. La inoculación de *Bacillus* sp. A8a se llevó a cabo 15 días antes de la infección de las plantas con *P. cinnamomi*. Para ello, 30 plantas fueron inoculadas con 250 mL de la suspensión de *Bacillus* sp.

A8a, aplicada en la base del tallo. Quince de estas plantas fueron asignadas al tratamiento [B], las otras 15 plantas al tratamiento [BPc]. La suspensión bacteriana fue aplicada nuevamente el día posterior a la infección (día 2) y de nuevo 15 días después (día 16). Las plantas de aguacate se distribuyeron de forma aleatoria sobre una cama metálica en el invernadero de la Escuela Nacional de Estudios Superiores de la UNAM – Morelia. El experimento se desarrolló durante los meses de marzo y abril del 2021 a una temperatura promedio de 31 °C registrada a las 11:00 am.

Medición de variables morfológicas y fisiológicas en plantas de aguacate

La medición de variables morfológicas y fisiológicas se realizó a los días 1 (t0), 4 (t1), 7 (t2), 13 (t3) y 25 (t4) después de la inoculación (ddi) de *P. cinnamomi*. En el caso de las variables morfológicas, se registraron mediciones de altura (cm), diámetro (cm), y número de hojas a partir de seis individuos para los tratamientos C y Pc, en cada tiempo; para los tratamientos B y BPc, se realizaron mediciones de tres individuos. Se calculó el porcentaje de marchitez de cada planta con la fórmula siguiente:

$$\text{Marchitez (\%)} = \frac{\text{No. de hojas marchitas}}{\text{No. de hojas totales}} \times 100$$

de acuerdo a lo reportado en Wang *et al.* (2006) y Azil *et al.* (2021).

En el caso de las variables fisiológicas, se llevaron a cabo mediciones de tres plantas por tratamiento. La conductancia estomática (mol CO₂/m²/s), la tasa fotosintética (μmol/m²/s) y la transpiración (mmol/m²/s) se midieron utilizando el sistema portátil de intercambio de gases Li-Cor 6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). La medición se realizó en dos hojas extendidas y sin daño aparente por planta seleccionada, entre las 8:00 h y a las 11:00 h, con una intensidad de luz de 1500 μmol/m²/s y CO₂ ambiental. El potencial hídrico (MPa) de la planta se midió en el pre-amanecer (5:00 h) y al medio día (14:00 h) con una cámara de presión Scholander 1000 (PMS Instrument Co., Albany, OR, EE.UU.), en dos hojas por cada planta, las cuales fueron cubiertas con papel aluminio media hora antes de la medición para permitir la homogenización del potencial hídrico de la hoja con el tallo (Aguilar-Romero *et al.*, 2017).

Análisis histoquímicos de cortes de tallo y determinación de la presencia de calosa y taninos

Para llevar a cabo la determinación de calosa y de taninos en tallos de aguacate al final del proceso de infección (25 ddi), se cortó un fragmento de tallo de 1.5 cm de longitud en la parte basal de tres plantas por tratamiento, utilizando una tijera de poda. Los fragmentos se procesaron de acuerdo a la metodología descrita en Johansen (1940). Los fragmentos se fijaron durante 24 h en una solución fijadora FAA (alcohol al 70%, formaldehído y agua

destilada en proporción 5:5:90). Transcurrido el tiempo de fijación, se retiró la solución FAA y se agregó una solución de etanol–glicerol (1:1, v/v) para preservar las muestras. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (30, 50 y 70 %) y se pasaron por una serie de concentraciones crecientes de alcohol terbutílico (Sandoval, 2005). Los fragmentos de tallo se colocaron en parafina histológica (Hycel) y se realizaron cortes de 15-20 μm de grosor de las caras transversal y radial, utilizando un micrótopo rotatorio (Leica RM2125 RTS). Los cortes se tiñeron con una combinación de ácido tánico al 1 % (en agua); cloruro férrico al 3 % (en agua) y lacmoide al 3 % (en solución de etanol 50 % y agua 50 %) de acuerdo con Gurr (1965). Después, los cortes se lavaron con una solución de bicarbonato de sodio al 1 % (en etanol al 50 %), se deshidrataron en concentraciones graduales de alcohol al 70, 80, 90 y 100 % y se aclararon los tejidos con xileno absoluto. Finalmente, los cortes se montaron en resina sintética y se observaron en un microscopio compuesto (Leica DM750M). La cuantificación de taninos se llevó a cabo utilizando imágenes capturadas con el objetivo 20 \times , en campo claro. Se tomaron imágenes de los cortes transversales de tallos de aguacate de los cuatro tratamientos a los 25 ddi. Las imágenes obtenidas se analizaron con el Software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Análisis estadísticos

El análisis de los resultados se realizó en RStudio, v. 2022.12.0. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianza con la prueba de Bartlett. Los datos obtenidos a partir de las mediciones de variables morfológicas y fisiológicas, así como de la cuantificación del contenido de taninos, se analizaron mediante análisis de varianza de dos y de una vía respectivamente, seguidas por una prueba de comparaciones pareadas de Tukey para datos con una distribución normal. Los datos que no presentaron distribución normal se analizaron con un análisis de Kruskal-Wallis y suma de rangos de Wilcoxon con ajuste de Bonferroni-Holm. Los resultados fueron considerados como significativos con una $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Cambios en las variables morfo-fisiológicas de plantas de aguacate en respuesta a la inoculación de *Bacillus* sp. A8a y la infección por *P. cinnamomi*

Nuestros resultados muestran que la inoculación de *Bacillus* sp. A8a en plantas infectadas con *P. cinnamomi* (tratamiento BPC) disminuyó el porcentaje de marchitez hasta en un 49 % a los 25 ddi, en comparación con plantas infectadas y no inoculadas con la bacteria (tratamiento Pc) (Figura 1). Adicionalmente, se observó que la marchitez en plantas infectadas con *P. cinnamomi* incrementó a través del tiempo, pasando de 2.9 % (1 ddi) a 50

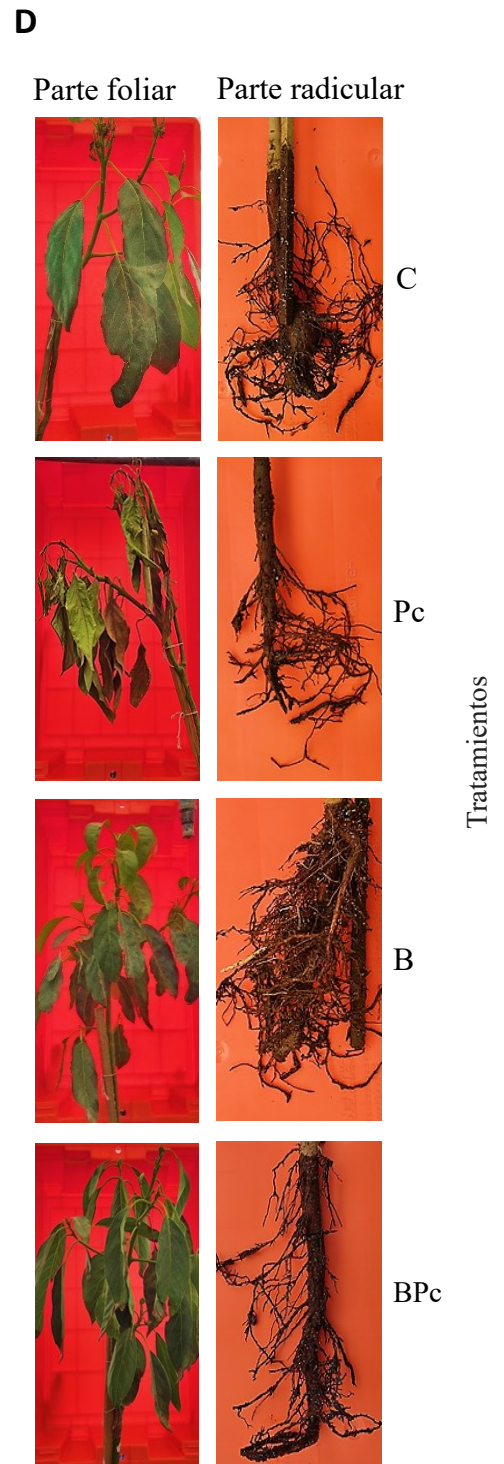
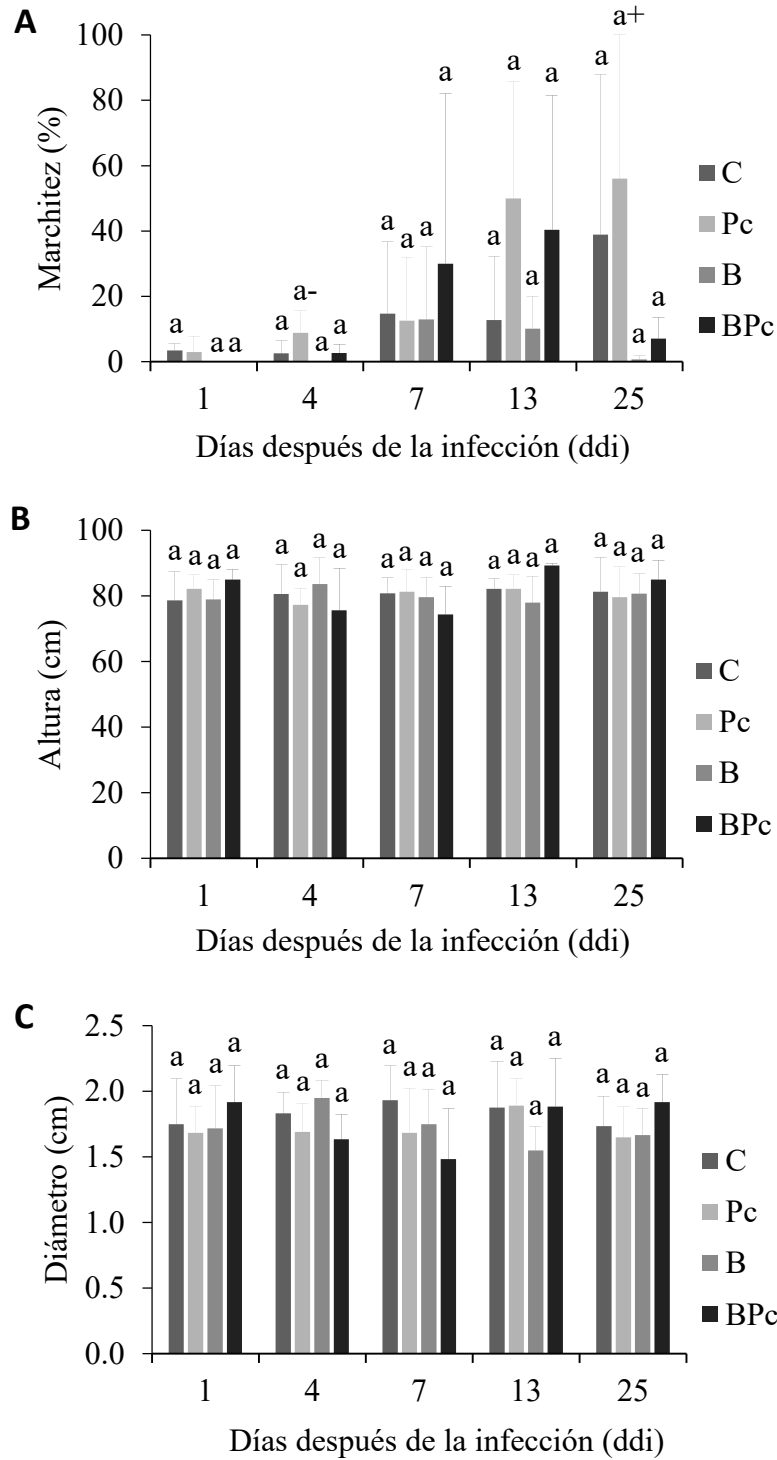


Figura 1. Efecto de la inoculación de *Bacillus* sp. A8a y *P. cinnamomi* en árboles de aguacate a los 1, 4, 7, 13 y 25 ddi. A) Porcentaje de marchitez causada por *P. cinnamomi*; B) altura de los árboles (cm); C) diámetro del tallo (cm). Las barras muestran el promedio de los datos (n = 6, tratamientos C y Pc; n = 3, tratamientos B y BPc) ± d.e. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de dos vías, $P \leq 0.05$). En la figura 1A, (+) representa diferencia significativa en relación con (-) entre tiempos, para el tratamiento Pc (ANOVA, $P \leq 0.05$). D) Fotografías representativas de la parte aérea y del sistema radical de árboles de aguacate a los 25 ddi, en los cuatro tratamientos. C: control; Pc: infectado con *P. cinnamomi*; B: inoculado con *Bacillus* sp. A8a; BPc: infectado con *P. cinnamomi* e inoculado con *Bacillus* sp. A8a.

% al final del experimento (25 ddi). En contraste, el porcentaje de marchitez disminuyó en plantas infectadas e inoculadas con *Bacillus* sp. A8a a lo largo del experimento, pasando de 40.4 % a los 13 ddi a 7.1 % a los 25 ddi (Figura 1A). No obstante, estas diferencias no fueron significativas, probablemente debido a la variación existente dentro de los tratamientos. No se observaron diferencias significativas en la altura de las plantas y diámetro de su tallo entre tratamientos para un mismo tiempo, ni en la interacción del tiempo con el tratamiento (Figuras 1B, C). Tampoco se observaron diferencias significativas en la conductancia estomática, tasa fotosintética y transpiración entre los distintos tratamientos, independientemente de los tiempos de medición (Cuadro 1). Sin embargo, el potencial hídrico a los 25 ddi fue significativamente menor en plantas infectadas con *P. cinnamomi* (tratamientos Pc y BPc) en comparación con plantas no infectadas (tratamientos C y B), tanto en su medición a las 5:00 h (Figura 2A) como a las 14:00 h (Figura 2B). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos Pc y BPc en cuanto al potencial hídrico (Figura 2).

Cuadro 1. Tasa fotosintética, conductancia estomática y transpiración en árboles de aguacate infectados con *P. cinnamomi* e inoculados con *Bacillus* sp. A8a

Variables fisiológicas	Tratamientos	Días después de la infección (ddi)				
		1	4	7	13	25
Tasa fotosintética ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	C	0.7 ± 1.1a	2.8 ± 4.4a	4.1 ± 3.6a	1.1 ± 0.6a	4.4 ± 1.9a
	Pc	0.7 ± 0.7a	1.8 ± 3.0a	0.9 ± 1.7a	1.5 ± 1.8a	3.7 ± 1.9a
	B	0.8 ± 1.1a	1.7 ± 2.7a	3.4 ± 2.8a	2.4 ± 2.0a	0.7 ± 1.0a
	BPc	1.0 ± 0.9a	2.1 ± 1.1a	4.3 ± 3.3a	1.8 ± 2.1a	1.8 ± 2.2a
Conductancia estomática ($\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$)	C	0.5 ± 0.5a	5.2 ± 6.9a	5.0 ± 4.5a	0.9 ± 0.4a	3.7 ± 2.2a
	Pc	0.3 ± 0.1a	2.9 ± 3.6a	1.1 ± 1.1a	1.3 ± 1.8a	2.8 ± 1.8a
	B	0.2 ± 0.1a	2.3 ± 2.4a	4.5 ± 3.8a	3.5 ± 4.6a	0.7 ± 0.8a
Transpiración ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$)	BPc	0.4 ± 0.1a	2.0 ± 0.8a	3.6 ± 2.9a	1.4 ± 1.5a	2.0 ± 2.3a
	C	0.2 ± 0.2a	1.2 ± 1.6a	1.2 ± 1.0a	1.0 ± 1.0a	1.1 ± 0.6a
	Pc	0.1 ± 0.0a	0.7 ± 0.8a	0.3 ± 0.3a	0.4 ± 0.1a	0.8 ± 0.5a
	B	0.0 ± 0.0a	0.6 ± 0.6a	1.4 ± 1.1a	1.6 ± 1.3a	0.2 ± 0.2a
	BPc	0.1 ± 0.0a	0.6 ± 0.2a	1.0 ± 0.8a	0.4 ± 0.4a	0.6 ± 0.6a

Los valores reportados muestran el promedio de tres réplicas ± e.e. Los datos de conductancia estomática se encuentran expresados como su valor real multiplicado por 100. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada tiempo (ANOVA, $P \leq 0.05$).

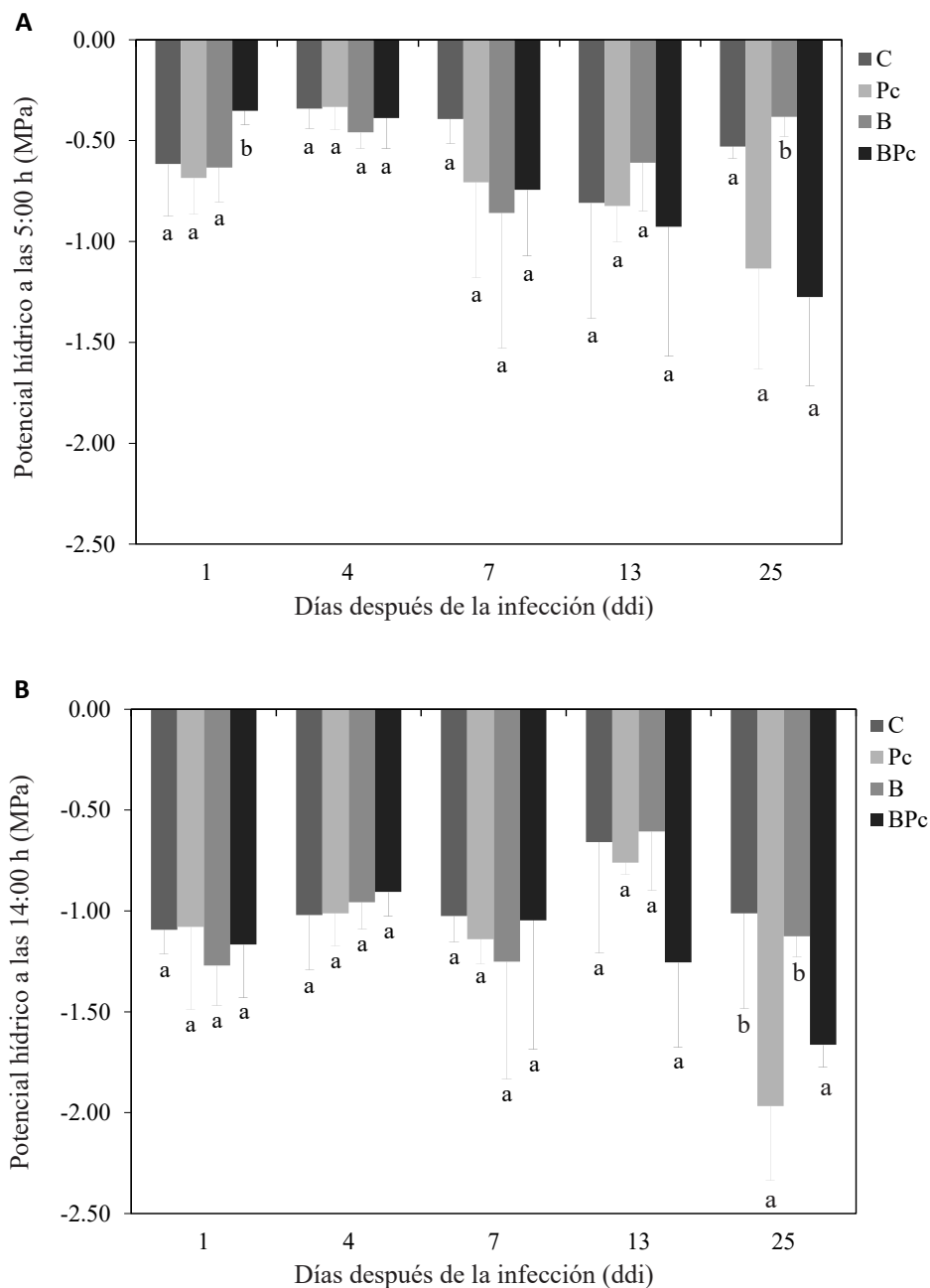


Figura 2. Potencial hídrico foliar en árboles de aguacate a los días 1, 4, 7, 13 y 25 ddi. A) Potencial hídrico foliar (MPa) a las 5:00 am; B) potencial hídrico foliar a las 14:00 pm. Las barras muestran el promedio de los datos ($n = 3 \pm d.e$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo. El potencial hídrico medido a los 1, 4 y 25 ddi se analizó con un ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos obtenidos a los 7 y 13 ddi se analizaron con un análisis de varianza de Kruskal-Wallis y suma de rangos de Wilcoxon por ser datos no paramétricos ($P \leq 0.05$).

Acumulación de taninos en tallos de aguacate en respuesta a la infección por *P. cinnamomi* y a la inoculación de *Bacillus* sp. A8a

Se cuantificó el porcentaje del área ocupada por taninos a los 25 ddi. La infección por *P. cinnamomi* triplicó el área de taninos en el xilema interno y externo, comparado con las plantas del control (Cuadro 2). En contraste, la inoculación de *Bacillus* sp. A8a indujo una mayor acumulación de taninos en el córtex, aunque ésta no fue estadísticamente significativa. La inoculación de *Bacillus* sp. A8a multiplicó por dos la acumulación de taninos en el córtex de las plantas no infectadas por el patógeno (37.5 % en el tratamiento B), e indujo un incremento del 16.9 % en el área de taninos en el córtex de las plantas infectadas (tratamiento BPc), comparado con plantas infectadas pero no inoculadas con la bacteria. Adicionalmente, en plantas infectadas, la inoculación de la cepa A8a redujo la acumulación de taninos en el xilema externo e interno (Cuadro 2; Figura 3), evidenciando un cambio en el patrón de acumulación de taninos inducido por la cepa de biocontrol. En cuanto a la determinación de calosa, no se encontró en ninguno de los tejidos analizados.

Cuadro 2. Porcentaje del área de taninos ocupada a los 25 ddi en las diferentes secciones de tallo de árboles de aguacate infectados por *P. cinnamomi* e inoculados con *Bacillus* sp. A8a.

Tratamientos	Porcentajes del área de taninos (%)		
	Córtex	Xilema externo	Xilema interno
C	17.9 ± 16.0a	16.5 ± 0.9a	16.0 ± 4.2a
Pc	24.5 ± 10.6a	55.0 ± 26.2a	50.3 ± 25.1a
B	37.5 ± 9.0a	26.1 ± 16.1a	17.1 ± 3.8a
BPc	41.4 ± 1.4a	15.1 ± 1.1a	27.4 ± 0.7a

Los valores reportados muestran el promedio de dos mediciones ± e.e. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma área del tallo (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

A través de un experimento curso temporal en invernadero, encontramos que la inoculación de *Bacillus* sp. A8a en plantas de aguacate infectadas con *P. cinnamomi* redujo hasta en un 49 % la marchitez por *Phytophthora*, 25 días después de la infección, en comparación con plantas infectadas pero no inoculadas con la bacteria. En trabajos previos, reportamos el potencial de *Bacillus* sp. A8a para inhibir a *P. cinnamomi* en pruebas *in vitro* y su capacidad para producir compuestos antimicrobianos volátiles del grupo de las pirazinas y cetonas, así como compuestos difusibles como macrolactina, difucidina, bacileno y bacilisina (Méndez-Bravo *et al.*, 2018; Cortazar-Murillo *et al.*, 2023). El presente estudio permitió corroborar la

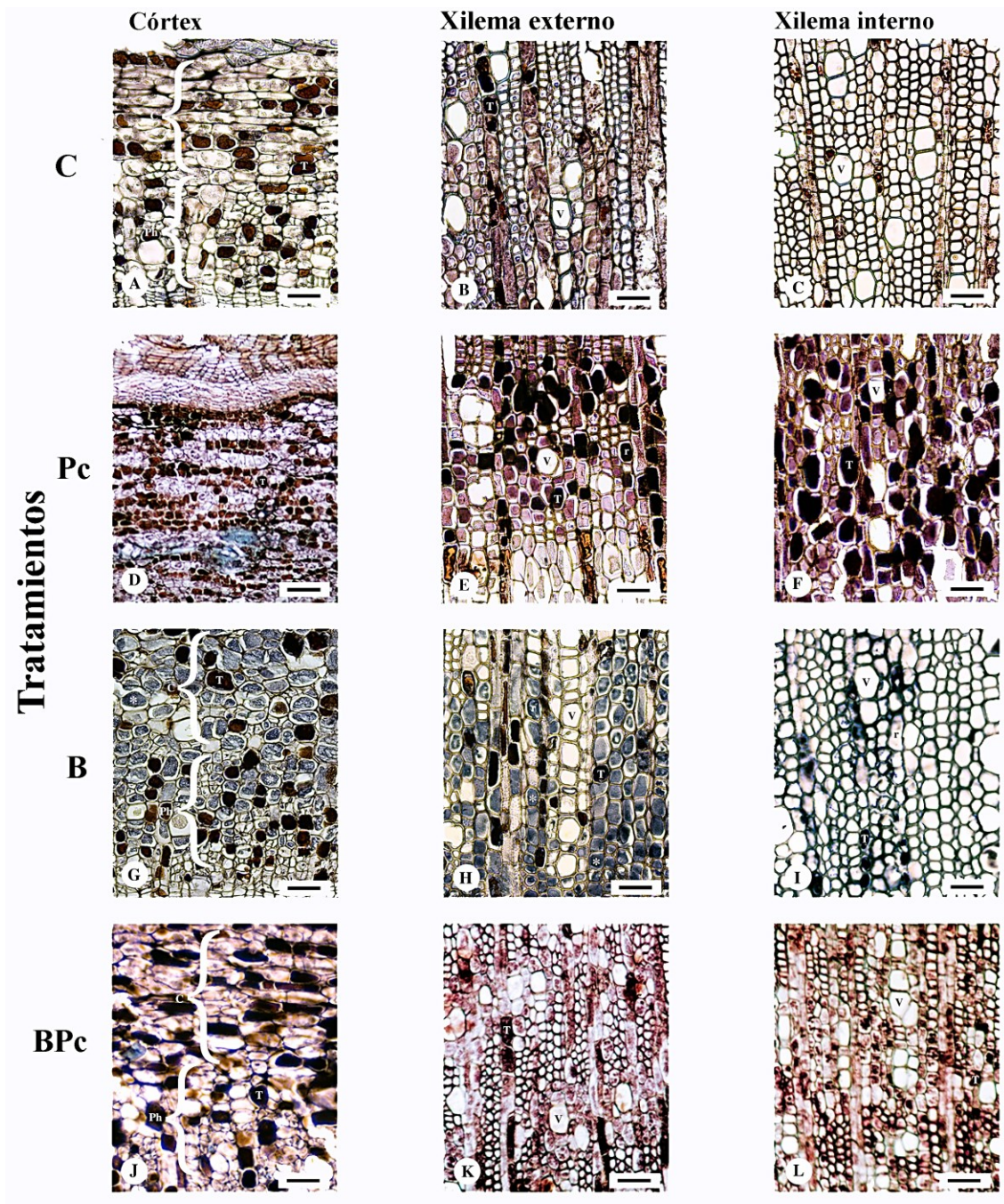


Figura 3. Acumulación de taninos en secciones transversales del córtex (C), xilema externo y xilema interno de tallos de aguacate de los cuatro tratamientos a los 25 ddi. **Figuras A – C:** Tratamiento Control. **A.** Se observan pocas células taníferas (T) dispersas en el tejido. **B.** Las células taníferas (T) se observan en el parénquima radial. Se indican los vasos (V) y el parénquima radial (r). **C.** Se observan pocas células taníferas (T) en el parénquima axial y radial (r). Ph = floema secundario. Escala: A-C. 30 µm. **Figuras D – F:** Tratamiento Pc. **D.** Se observan abundantes células taníferas (T). **E.** Las células taníferas (T) se observan tanto en el parénquima radial como axial. V = vasos. **F.** Las células taníferas (T) se concentran en las células radiales. Escala: D. 60 µm. E y F. 30 µm. **Figuras G – I:** Tratamiento B. **G.** Sección transversal a través del floema (Ph) y del córtex (C). Se observan algunas células taníferas (T) en medio de células del parénquima llenas de almidón (asteriscos). **H.** Una larga cadena de vasos (V) se observa en el centro de la imagen. Sólo se observan algunas células taníferas (T) en el parénquima radial. **I.** Las células taníferas (T) son aún menos frecuentes que en el xilema externo. Escala: G. 25 µm. H y I. 30 µm. **Figuras J – L:** Tratamiento BPc. **J.** Se observan células taníferas (T). **K.** Se observan vasos (V) agrupados o aislados y algunas células taníferas (T) en el parénquima radial. **L.** Algunas células taníferas (T) se observan de manera aislada en el parénquima axial. Los vasos (V) se agrupan en cadenas radiales o en grupos de cuatro. Escala: J - L. 35 µm.

capacidad de la cepa A8a para el control de la marchitez por *Phytophthora* en su hospedante natural, *P. americana*. Nuestros resultados enfatizan el potencial de las rizobacterias para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi* y los daños ocasionados por la marchitez por *Phytophthora*, confirmando lo previamente descrito por Ramírez-Gil y Morales-Osorio (2020) con la cepa *Bacillus* sp. BC3 o por Ramírez-Restrepo *et al.* (2021) con *Serratia plymuthica* AED38. Aunque la reducción en la incidencia de síntomas de marchitez en el tratamiento BPc no fue estadísticamente significativa, la elevada variación intra-tratamiento, independientemente de la actividad de biocontrol de *Bacillus* sp. A8a, podría haber repercutido en la ausencia de diferencias significativas. Esta alta variación podría estar asociada a la plasticidad fenotípica que suele observarse en aguacate y en sus porta-injertos (Ashworth y Clegg, 2003), y podría controlarse aumentando el número de réplicas o la duración del experimento. Un monitoreo más largo de los efectos de la cepa A8a en las plantas inoculadas es por lo tanto necesario, ya que, al ser plantas leñosas, las respuestas del aguacate a tratamientos biológicos enfocados a mejorar su crecimiento y productividad pueden tardar en observarse (Barra *et al.*, 2016). En este experimento, no fue posible extender la duración del experimento debido a la muerte de las plantas del tratamiento Pc después de los 25 ddi.

Phytophthora cinnamomi ataca las raíces secundarias de los árboles de aguacate, responsables de la absorción de nutrientes y agua, provocando marchitez, defoliación, reducción en la productividad y, consecuentemente, la muerte del árbol (Hardham, 2005; Méndez-Bravo *et al.*, 2018). Estos síntomas pueden estar asociados en parte al desarrollo de un estrés hídrico severo en la planta infectada. En nuestro estudio, la infección por *P. cinnamomi* generó mayor estrés hídrico en las plantas infectadas (Pc y BPc) que en las no

infectadas (C y B) a los 25 ddi, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Sterne *et al.* (1978). De forma interesante, la marchitez en plantas infectadas (Pc) fue hasta un 49 % superior a los síntomas en plantas infectadas pero inoculadas con *Bacillus* sp. A8a (BPc), lo que sugiere que la cepa A8a reduce el daño ocasionado por *P. cinnamomi* sin compensar el estrés hídrico. Adicionalmente, no se detectaron diferencias significativas en la conductancia estomática y transpiración, ni en la tasa fotosintética, entre plantas sanas y plantas infectadas. Ploetz y Schafeer (1989) sugieren que el efecto de *P. cinnamomi* en la asimilación de CO₂, la transpiración y la conductancia estomática en árboles de aguacate no es consistente, a menos de que se agregue otro factor de estrés como condiciones de anegamiento, lo cual induce consistentemente estrés hídrico en árboles infectados. Los valores más bajos de las variables fisiológicas observados a los 7 ddi en el tratamiento Pc (Cuadro 1), aunque no significativamente, podrían confirmar esta hipótesis, ya que se mantuvieron condiciones de anegamiento durante cinco días en nuestro experimento.

La infección por *P. cinnamomi* y la inoculación con *Bacillus* sp. A8a indujeron modificaciones en la acumulación de taninos presentes en las diferentes secciones del tallo de aguacate a los 25 ddi. En el tratamiento Pc, se observó la acumulación de taninos en los xilemas externo e interno. Los compuestos fenólicos, entre ellos los taninos, desempeñan una función importante en los mecanismos de defensa vegetal ante el estrés biótico (Gallardo *et al.*, 2019), a través de mecanismos que involucran la inhibición de enzimas fúngicas extracelulares, reducción de la disponibilidad de nutrientes e inhibición de la fosforilación oxidativa (Rashad *et al.*, 2020). La acumulación de taninos en el xilema, en respuesta a la infección por *P. cinnamomi*, probablemente forma parte de la respuesta de defensa de la planta y contribuye a su resistencia ante la marchitez por *Phytophthora* (Phillips *et al.*, 1987). Por otro lado, las plantas inoculadas con la cepa A8a (tratamientos B y BPc) presentaron una mayor acumulación de taninos en el córtex que las plantas no inoculadas (tratamientos C y Pc, respectivamente). La acumulación de compuestos fenólicos en tejidos vegetales como efecto positivo de la inoculación de agentes de biocontrol también ha sido demostrada en otros patosistemas. Por ejemplo, Javed *et al.* (2021) describieron que la inoculación con *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens* incrementó la deposición de compuestos fenólicos en secciones vasculares de tallos y raíces de frijol mungo (*Vigna radiata*) infectados por *Macrophomina phaseolina*, lo que impidió la colonización del micelio en el lumen de los vasos xilemáticos, a diferencia de las plantas no tratadas con estas bacterias. La observación de una mayor densidad de taninos en los cortes histológicos de córtex provenientes de los tratamientos inoculados con *Bacillus* sp. A8a sugiere una acción del agente de biocontrol sobre una de las primeras barreras físicas de defensa vegetal y su posible contribución en la tolerancia de las plantas de aguacate ante la marchitez por *Phytophthora*. Sin embargo, investigaciones futuras deberán enfocarse en elucidar los mecanismos que rigen la capacidad de biocontrol de la cepa A8a.

CONCLUSIONES

En este trabajo se confirma la actividad de biocontrol de *Bacillus* sp. A8a ante la marchitez por *Phytophthora*, actividad previamente reportada *in vitro*, y sugiere que dicha actividad puede deberse en parte a la acumulación diferencial de taninos en el córtex de las plantas inoculadas con la bacteria. Futuros estudios podrían corroborar el potencial de biocontrol de *Bacillus* sp. A8a en condiciones de campo. Finalmente, para garantizar su máxima eficiencia en campo, es importante verificar la colonización exitosa de la cepa A8a en la rizósfera de *P. americana* y mejorar nuestro entendimiento de sus interacciones con la microbiota rizosférica nativa del aguacate, para poder contribuir a un manejo integral más sustentable de la marchitez por *Phytophthora*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto FOSEC-SEP-CONAHCYT no. A1-S-30794. También agradecemos el apoyo de CONAHCYT mediante una beca postdoctoral otorgada al primer autor (Programa “Estancias Posdoctorales por México” no. 417707). Agradecemos a Silvana Martén Rodríguez por el uso del invernadero; a Alejandro Méndez Bravo y a Yareli Pérez-Bautista por su apoyo durante el muestreo; a Marlene Díaz Celaya por su apoyo técnico en el proceso de liberación de zoosporas de *P. cinnamomi* y a Gerardo Rodríguez Alvarado por su contribución en el aislamiento de la cepa de *P. cinnamomi*.

LITERATURA CITADA

- Agapito-Amador ME, Cibrián-Llenderal VD, Gutiérrez Rojas M, Ruiz-Juárez D, López Corona BE and Rueda-Puente EO. 2022. *Phytophthora cinnamomi* Rands en aguacate. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 13(SPE28):331-341. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3287>
- Aguiar-Romero R, Pineda-García F, Paz H, González-Rodríguez A and Oyama K. 2017. Differentiation in the water-use strategies among oak species from central Mexico. Tree Physiology 37:915-925. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx033>
- Ashworth VETM and Clegg MT. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. Journal of Heredity 94:407-415. <https://doi.org/10.1093/jhered/esg076>
- Aveling TAS. 1999. A comparative study of the free carbohydrates in healthy and *Phytophthora cinnamomi*-infected avocado root tips. South African Journal of Botany 65:247-249. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30983-2](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30983-2)
- Azil N, Stefańczyk E, Sobkowiak S, Chihat S, Bouregghda H and Śliwka J. 2021. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tuber dry rot and wilt of potato in Algeria. European Journal of Plant Pathology 159:495-509. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02177-5>
- Barra PJ, Inostroza NG, Acuña JJ, Mora ML, Crowley DE and Jorquera MA. 2016. Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. Applied Soil Ecology 102:80-91. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.014>
- Belisle RJ, Hao W, McKee B, Arpaia ML, Manosalva P and Adaskaveg JE. 2019. New oomycota fungicides with activity against *Phytophthora cinnamomi* and their potential use for managing avocado root rot in California. Plant Disease 103:2024-2032. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1698-RE>

- Camisón Á, Martín MÁ, Sánchez-Bel P, Flors V, Alcaide F, Morcuende D, Pinto G and Solla A. 2019. Hormone and secondary metabolite profiling in chestnut during susceptible and resistant interactions with *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of Plant Physiology* 241:153030. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153030>
- Cortazar-Murillo EM, Méndez-Bravo A, Monribot-Villanueva JL, Garay-Serrano E, Kiel-Martínez AL, Ramírez-Vázquez M, Guevara-Avenidaño E, Méndez-Bravo A, Guerrero-Analco JA and Reverchon F. 2023. Biocontrol and plant growth promoting traits of two avocado rhizobacteria are orchestrated by the emission of diffusible and volatile compounds. *Frontiers in Microbiology* 14:1152597. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1152597>
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (consulta, abril 2023)
- Gallardo A, Morcuende D, Solla A, Moreno G, Pulido F and Quesada A. 2019. Regulation by biotic stress of tannins biosynthesis in *Quercus ilex*: Crosstalk between defoliation and *Phytophthora cinnamomi* infection. *Physiologia Plantarum* 165(2):319-329. <https://doi.org/10.1111/pl.12848>
- Granada SD, Ramírez-Restrepo S, López-Luján L, Peláez-Jaramillo CA and Bedoya-Pérez JC. 2018. Screening of a biological control bacterium to fight avocado diseases: from agroecosystem to bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14:109-115. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.005>
- Gurr E. 1965. The rational use of dyes in biology and general staining methods. First Edition. Leonard Hill, London. 422p.
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6(6):589-604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hwang SC and Ko WH. 1978. Biology of chlamydospores, sporangia, and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology* 68:726-731. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n05_726.pdf
- Javed S, Javaid A, Hanif U, Bahadur S, Sultana S, Shuaib M and Ali S. 2021. Effect of necrotrophic fungus and PGPR on the comparative histochemistry of *Vigna radiata* by using multiple microscopic techniques. *Microscopy Research and Technique* 84(11):2737-2748. <https://doi.org/10.1002/jemt.23836>
- Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. First Edition. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, USA. 523p.
- López-Herrera CJ, Pérez-Jiménez R, Llobel A, Monte-Vázquez E and Zea-Bonilla T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:261-265. https://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p261.pdf
- Martins J, Veríssimo P and Canhoto J. 2022. Isolation and identification of *Arbutus unedo* L. fungi endophytes and biological control of *Phytophthora cinnamomi* *in vitro*. *Protoplasma* 259:659-677. <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01686-2>
- Masikane S, Jolliffe J, Swart L and McLeod A. 2019. Novel approaches and methods for quantifying *Phytophthora cinnamomi* in avocado tree roots. *FEMS Microbiology Letters* 366:fnz199. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz199>
- Méndez-Bravo A, Cortazar-Murillo EM, Guevara-Avenidaño E, Ceballos-Luna O, Rodríguez-Haas B, Kiel-Martínez AL, Hernández-Cristóbal O, Guerrero-Analco JA and Reverchon F. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PloS One* 13:e0194665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194665>
- Méndez-Bravo A, Herrera-Cornelio LC, García-Toscano DF, Kiel-Martínez AL, Guevara-Avenidaño E, Ramírez-Vázquez M, Pérez-Bautista Y, Méndez-Bravo A and Reverchon F. 2023. Beneficial effects of selected rhizospheric and endophytic bacteria, inoculated individually or in combination, on non-native host plant development. *Rhizosphere* 26:100693. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100693>
- Mondragón-Flores A. 2022. Caracterización y comparación de poblaciones de *Phytophthora cinnamomi* aisladas de raíz de aguacate con pudrición en México y Estados Unidos. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/8332/IIAF-D-2022-0778.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 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 Zitácuaro, Michoacán. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(1):59-81. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>

- Phillips D, Grant R and Weste G. 1987. Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 77:691-698. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n05_691.PDF
- Ploetz RC and Schaffer B. 1987. Effects of flooding and *Phytophthora* root rot on photosynthetic characteristics of avocado. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 100:290-294. https://www.avocadosource.com/Journals/FSHSP/FSHSP_VOL_100_PG_290-294_1987.pdf
- Ramírez-Gil JG and Morales-Osorio JG. 2020. Integrated proposal for management of root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado cv. Hass crops. *Crop Protection* 137:105271. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105271>
- Ramírez-Restrepo S, Calle-Henao C, Arbeláez-Galvis LM, Bedoya-Pérez JC, Hoyos-Sánchez RA and Granada-García SD. 2021. Siderophore containing extract from *Serratia plymuthica* AED38 as an efficient strategy against avocado root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Biocontrol Science and Technology* 31:284-298. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1846162>
- Rashad Y, Aseel D and Hammad S. 2020. Phenolic compounds against fungal and viral plant diseases. Pp:201-219. *In: Lone R, Shuab R and Kamili A (eds.). Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore. 465p. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_9
- Reverchon F, García-Meléndez M, Guevara-Avendaño E, Mora-Chávez O, Solís-García IA, Dáttilo W, Guerro-Analco JA, Méndez-Bravo A, Monribot-Villanueva JL, Patiño-Conde V, Pineda-García F and Rebollar EA. 2023. Shifts in the rhizosphere microbiome and exudation profile of avocado (*Persea americana* Mill.) during infection by *Phytophthora cinnamomi* and in presence of a biocontrol bacterial strain. *CABI Agriculture and Bioscience* 4(1):23. <https://doi.org/10.1186/s43170-023-00167-1>
- Sandoval ZE. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. *Cuadernos del Instituto de Biología* 38. Universidad Nacional Autónoma de México. 278p.
- SIAP - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Panorama agroalimentario 2019. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019 (consulta, abril 2023)
- Sterne RE, Kaufmann MR and Zentmyer GA. 1978. Effect of *Phytophthora* root rot on water relations of avocado: interpretation with a water transport model. *Phytopathology* 68(4):595-602. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n04_595.pdf
- Sumida CH, Fantin LH, Braga K, Canteri MG and Homechin M. 2020. Control of root rot (*Phytophthora cinnamomi*) in avocado (*Persea americana*) with bioagents. *Summa Phytopathologica* 46:205-211. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/192195>
- Tapia-Rodríguez A, Ramírez-Dávila JF, Figueroa-Figueroa DK, Salgado-Siclan ML and Serrato-Cuevas R. 2020. Análisis espacial de antracnosis en el cultivo de aguacate en el Estado de México. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1):132-145. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-1>
- Van den Berg N, Mahomed W, Olivier NA, Swart V and Crampton BG. 2018. Transcriptome analysis of an incompatible *Persea americana-Phytophthora cinnamomi* interaction reveals the involvement of SA-and JA-pathways in a successful defense response. *PloS One* 13(10):e0205705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205705>
- Van den Berg N, Swart V, Backer R, Fick A, Wienk R, Engelbrecht J and Prabhu SA. 2021. Advances in understanding defense mechanisms in *Persea americana* against *Phytophthora cinnamomi*. *Frontiers in Plant Science* 12:636339. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.636339>
- Wang Y, Jiang J, Zhao X, Liu G, Yang C and Zhan L. 2006. A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science* 171:655-662. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.011>
- Zentmyer GA and Chen DW. 1969. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in pure culture. *California Avocado Society Yearbook* 53:103-107. https://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_53_1969/CAS_1969_PG_103-107.pdf