

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**



**“CARACTERIZACIÓN Y CONTROL DEL AGENTE CAUSAL DE LA
MANCHA FOLIAR EN FRESA (*Fragaria ananassa*) EN
INVERNADERO”**

Presentada por:

CARLOS MANUEL ORELLANA UZHO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA**

Lima– Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres, Ángel y María por su gran amor, cuidado y aliento.

A mi hija Carla Priscila, por ser mi motivación para culminar con mis estudios.

A mi esposa Ángela, por ser mi compañera y por su apoyo en la culminación de mis estudios.

A mis tíos: Libia y Carlos, por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque en este proceso fue mi guiador y orientador para cumplir con el objetivo propuesto.

A mi hermano Alexander y su esposa Lily que siempre estuvieron allí pendientes de mis estudios.

A los profesores de la Especialidad de Fitopatología de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina por sus enseñanzas y consejos.

A la Dra. Mg. Sc. Ing. Leonor Mattos Calderón, por su amistad, paciencia, enseñanza, confianza y estímulo, que ayudaron a culminar mis estudios.

A los miembros del comité consejero por sus valiosos consejos.

Al Ing. Carlos Huamán y a la empresa SILVESTRE por su colaboración para el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Raúl Blas Sevillano, por su permitir capacitarme en el Instituto de Biotecnología Molecular.

Al Ing. Joel Flores por compartir sus conocimientos y por entrenarme en los temas de Biología molecular.

A la Srta. Inés Torres, por su amistad, guía y orientación en las prácticas en el Instituto de Biotecnología Molecular.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 La Fresa (<i>Fragaria ananassa</i>).....	2
2.1.1 Origen.....	2
2.1.2 Taxonomía y morfología.....	2
2.1.3 Requerimientos climáticos.....	3
2.1.4 Fresa Variedad Camino Real.....	4
2.2 Enfermedades causadas por hongos de suelo.....	4
2.2.1 Pudrición de la corona.....	4
2.2.2 Podredumbre de la raíz y del cuello.....	4
2.2.3 Rhizoctoniasis.....	5
2.2.4 Fusariosis.....	5
2.2.5 Pudrición carbonosa.....	5
2.2.6 Marchitez.....	6
2.3 Enfermedades foliares.....	7
2.3.1 Antracnosis.....	7
2.3.2 Oídio (<i>Sphaerotheca macularis</i> f. sp. <i>fragariae</i>).....	7
2.3.3 Tizón de la hoja.....	7
2.3.4 Viruela.....	8
2.3.5 Enfermedad de corona y peciolo.....	8
2.3.6 Quemadura de hoja.....	9
2.3.7 Mancha de la hoja.....	9
2.3.8 Moho gris.....	9
2.4 Enfermedades ocasionadas por virus.....	10
2.4.1 Strawberry Mild Yellow Edge Virus (SMYEV).....	10
2.4.2 Encrespamiento “Strawberry crinkle virus” – SCV.....	10
2.4.3 Virus de las bandas de la nervadura (Strawberry vein banding virus).....	10
2.4.4 Mosqueado virus.....	11
2.5 Enfermedades ocasionadas por bacterias.....	11
2.5.1 Mancha angular.....	11

2.6	Síntomas de <i>Corynespora cassiicola</i> en diferentes cultivos.....	12
2.7	El control biológico.....	13
2.7.1	Competencia.....	14
2.7.2	Micoparasitismo.....	15
2.7.3	Antibiosis.....	15
2.8	Parasitismo y Patogenicidad.....	15
2.9	Productos biológicos que se emplearon para el control de la mancha foliar en fresa	16
2.9.1	Biosplent 70 WP.....	16
2.9.2	T-22.....	16
2.9.3	Biodelta.....	17
2.10	Productos químicos que se emplearon para el control de la mancha foliar.....	17
2.10.1	Stronsil.....	17
2.10.2	Zetron 720.....	17
2.10.3	Difeconasil 250 EC.....	18
2.10.4	Mertect 500 SC.....	18
2.10.5	Aliette.....	18
2.11	Identificación molecular de microorganismos.....	18
2.11.1	El ADN.....	19
2.11.2	La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1	Ubicación del experimento.....	21
3.2	Aislamiento e identificación del agente causal.....	21
3.2.1	Recolección de muestras.....	21
3.2.2	Muestras en cámara húmeda.....	21
3.2.3.	Aislamiento y purificación del patógeno.....	22
3.2.4	Identificación del patógeno.....	22
3.3	Determinación de las características culturales y cantidad de esporas según el medio de cultivo.....	23
3.4	Prueba “ <i>in vitro</i> ” de Biocontroladores.....	24
3.5	Prueba “ <i>in vitro</i> ” de fungicidas.....	25
3.6	Fase de Invernadero.....	26
3.6.1	Preparación del sustrato y trasplante de las plántulas.....	26

3.6.2 Obtención de Inóculo.....	27
3.6.3 Prueba de Patogenicidad.	27
3.6.4 Reaislamiento del patógeno.....	27
3.6.5 Inoculación de las plantas de fresa en invernadero.....	27
3.7 Diseño estadístico.....	28
3.8 Tratamientos, dosis y frecuencia de aplicación de biocontroladores y fungicidas.....	28
3.9 Evaluación de los biocontroladores y fungicidas.....	29
3.10 Ensayo comparativo de crecimiento radial de <i>Corynespora cassiicola</i> en condiciones de invernadero y laboratorio.	30
3.11 Identificación Molecular.....	30
3.11.1 Extracción de ADN del patógeno.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Aislamiento e identificación.	32
4.1.1 Muestras en cámara húmeda.....	32
4.1.2 Aislamiento y purificación del patógeno.....	33
4.1.3 Identificación del patógeno.....	33
4.2 Determinación de las características culturales y cantidad de esporas según el medio de cultivo.....	34
4.3 Prueba “ <i>in vitro</i> ” de Biocontroladores.	37
4.4 Prueba “ <i>in vitro</i> ” de fungicidas.	41
4.5 Fase de Invernadero.	44
4.5.1 Prueba de patogenicidad.....	44
4.5.2 Reaislamiento del patógeno.	47
4.5.3 Evaluación de la eficiencia de los biocontroladores y fungicidas.....	48
4.5.4 Comparaciones entre tratamientos.....	51
4.6 Ensayo comparativo de crecimiento radial de <i>Corynespora cassiicola</i> en condiciones de invernadero y laboratorio.	52
4.7 Identificación molecular.....	54
4.7.1 Extracción del ADN de <i>Corynespora cassiicola</i>	54

V. DISCUSIÓN.....	57
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. RECOMENDACIONES.....	64
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
IX. ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Biocontroladores que se emplearon en la prueba “ <i>in vitro</i> ” para el control del hongo aislado.....	25
Cuadro 2: Fungicidas empleados en la Prueba del alimento envenado para el hongo Aislado.....	26
Cuadro 3: Tratamientos y dosis de aplicación que se emplearon para el control de la mancha foliar de fresa en invernadero.....	28
Cuadro 4: Escala de evaluación para determinar la severidad de la Mancha foliar en fresa (<i>Fragaria ananassa</i>).....	29
Cuadro 5: Dimensiones de las estructuras fructificantes del aislamiento de <i>Corynespora</i> sp. obtenidos a partir de manchas foliares en hojas de fresa.....	34
Cuadro 6: Crecimiento radial de micelio, Ritmo promedio de crecimiento (mm) y esporulación de <i>Corynespora cassiicola</i> en diferentes medios de cultivo.....	35
Cuadro 7: Análisis de variancia para el crecimiento diario de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en diferentes medios de cultivo.....	37
Cuadro 8: Prueba de comparación de medias Tukey (0.05) para el crecimiento diario de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en diferentes medios de cultivo.....	37
Cuadro 9: Cultivo dual de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	38
Cuadro 10: Análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	39
Cuadro 11: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	39
Cuadro 12: Cultivo dual de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	40
Cuadro 13: Análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	41
Cuadro 14: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	41

Cuadro 15: Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en la prueba del alimento envenenado.....	42
Cuadro 16: Análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en la prueba del alimento envenenado.....	44
Cuadro 17: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de inhibición de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en la prueba del alimento envenenado.....	44
Cuadro 18: Promedios de medidas de conidióforo y conidia del reislamiento obtenidos a partir de las plantas de fresa en la prueba de patogenicidad.....	48
Cuadro 19: Promedio del porcentaje de severidad del área foliar por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero	49
Cuadro 20: Promedios de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.....	50
Cuadro 21: Análisis de variancia de los valores promedios de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.....	50
Cuadro 22: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para los valores de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.....	51
Cuadro 23: Promedios de crecimiento radial de <i>Corynespora cassiicola</i> en PDA 9 días después de la siembra en incubadora e invernadero.....	53
Cuadro 24: Promedios de Temperatura y Humedad relativa en el interior del invernadero correspondiente a los meses de Diciembre (2016) a Enero del (2017).....	53
Cuadro 25: Análisis de variancia para el ensayo comparativo de crecimiento radial de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en PDA colocados en incubadora en Invernadero.....	54
Cuadro 26: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el ensayo comparativo de crecimiento radial de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en PDA colocados en incubadora e Invernadero.....	54
Cuadro 27: Análisis comparativo de identidad de la secuencia de <i>Corynespora cassiicola</i> con otras reportadas en diferentes partes del mundo	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mancha foliar. A) Campo de fresa afectado por mancha foliar. B) Hoja con síntoma de mancha foliar. C) Síntoma de mancha foliar a los 15 días de incubación en cámara húmeda. D) Estructuras del patógeno desarrolladas sobre el síntoma de mancha foliar.....	32
Figura 2: Muestras de hoja sembradas en medio PDA. A) Micelio del hongo aislado a los cuatro días de siembra. B) Cultivo puro en medio PDA a los 13 días de siembra.....	33
Figura 3: Estructuras de fructificación observadas a través del microscopio: A) Conidióforo y conidia en formación. B) Conidia con septas transversales.....	34
Figura 4: <i>Corynespora cassiicola</i> sembrado en diferentes medios de cultivo: (A) PDA, (B) APG, (C) A-V8, (D) AEM, a los 23 días después de la siembra.....	35
Figura 5: Ritmo promedio de crecimiento (mm/día) de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en diferentes medios de cultivo, a los 16 días después de la siembra.....	36
Figura 6: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de <i>Corynespora cassiicola</i> en diferentes medios de cultivo, a los 16 días después de la siembra.....	36
Figura 7: Cultivo dual a los 8 días del enfrentamiento. A) <i>Bacillus subtilis</i> . B) <i>Pseudomonas fluorescens</i>	38
Figura 8: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	39
Figura 9: Cultivo dual de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i> a los 5 días de enfrentamiento.....	40
Figura 10: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	41
Figura 11: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de <i>Corynespora cassiicola</i> frente a fungicidas evaluados.....	42
Figura 12: Alimento envenenado de <i>Corynespora cassiicola</i> a los 11 días después de la siembra A) Azoxystrobin (Stronsil). B) Clorotalonil (Zetron 720). C) Difenconazol (Difeconasil). D) Tiabendazol (Mertect). E) Fosetil Aluminio (Aliette). F) Testigo (PDA).....	43
Figura 13: Porcentaje de inhibición de micelio (PIM) de <i>Corynespora cassiicola</i> frente a los fungicidas evaluados.....	43
Figura 14: Síntomas de mancha foliar en el haz de hojas de fresa.....	45
Figura 15: Planta de fresa mostrando manchas necróticas a los 4 días después de inoculadas con <i>Corynespora cassiicola</i>	45

Figura 16: Planta de Fresa mostrando las manchas necróticas y amarillamiento a los 11 días después de inoculadas con <i>Corynespora cassiicola</i>	46
Figura 17: Necrosis en el peciolo de hoja de fresa originada por <i>Corynespora cassiicola</i>	46
Figura 18: Planta de fresa Testigo (sin inocular) sin síntomas de mancha foliar.....	47
Figura 19: Colonias desarrolladas en medio APG de los síntomas de mancha foliar en hoja (A) y peciolo (B) a los 7 días después de la siembra	48
Figura 20: Promedios de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar de fresa en invernadero.....	49
Figura 21: Comparación del Tratamiento 4 (Azoxystrobin) frente al Testigo inoculado...51	51
Figura 22: Comparación del Tratamiento 8 (Fosetil Aluminio) frente al Testigo inoculado	52
Figura 23: Comparación del Testigo sin inocular frente al Testigo inoculado.....	52
Figura 24: Aislamiento de <i>Corynespora cassiicola</i> sembrado en PDA a los 9 días después de la siembra. A) Placas colocadas en Invernadero. B) Placas colocadas en Incubadora 28 °C.....	53
Figura 25: ADN de <i>Corynespora cassiicola</i>	54
Figura 26: Dilución de ADN de <i>Corynespora cassiicola</i> en gel de agarosa al 1 %.....	55
Figura 27: Árbol filogenético de las relaciones entre especies de <i>Corynespora cassiicola</i> ...	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Mediciones de conidióforo y conidia para determinar la especie del género: <i>Corynespora</i>	77
Anexo 2: Medios de cultivo para determinar las características culturales del agente causal de la mancha foliar en fresa (<i>Fragaria ananassa</i>).....	78
Anexo 3: Crecimiento diario de micelio (mm) de <i>Corynespora cassiicola</i> los diferentes medios de cultivo.....	79
Anexo 4: Crecimiento diario de micelio (mm) de <i>Corynespora cassiicola</i> los diferentes medios de cultivo.....	80
Anexo 5: Ritmo promedio de crecimiento de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> en los diferentes medios de cultivo.....	81
Anexo 6: Conidias en los diferentes medios de cultivo.....	82
Anexo 7: Medio de cultivo empleado para el crecimiento dual de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	83
Anexo 8: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	84
Anexo 9: Crecimiento radial diario de micelio (mm/día) de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	85
Anexo 10: Porcentaje de Inhibición de micelio <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente <i>Corynespora cassiicola</i>	86
Anexo 11: Ritmo promedio de crecimiento diario de micelio (RPC) de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	87
Anexo 12: Crecimiento diario de micelio (mm/día) de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	88
Anexo 13: Crecimiento acumulado de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente <i>Corynespora cassiicola</i>	89
Anexo 14: Ritmo promedio de crecimiento (RPC) diario de micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	90
Anexo 15: Porcentaje de Inhibición de micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i>	91
Anexo 16: Promedio de crecimiento micelial (mm/día) de <i>Corynespora cassiicola</i> en la prueba del alimento envenenado.....	92

Anexo 17: Promedio de crecimiento micelial acumulado (mm/día) de <i>Corynespora cassiicola</i> en la prueba del alimento envenenado.....	93
Anexo 18: Porcentaje de Inhibición de micelio de los fungicidas probados.....	94
Anexo 19: Datos de severidad de las evaluaciones realizadas en el control de la mancha foliar de fresa en invernadero.....	95
Anexo 20: Protocolo de Extracción de ADN según Aamir <i>et al.</i> 2015.....	96
Anexo 21: Documento de respaldo de Macrogen USA, que indica que el proceso de secuenciación se ha realizado.....	97
Anexo 22: Factura que verifica el lugar en el cual se ha realizado la secuenciación de producto de PCR.....	98
Anexo 23: Mediciones de crecimiento radial de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> colocadas en incubadora e Invernadero.....	99
Anexo 24: Mediciones de conidióforo y conidia de reislamiento de mancha foliar de plantas que se realizaron la prueba de patogenicidad.....	100

RESUMEN

Plantas de fresa (*Fragaria ananassa*) mostrando síntomas de mancha foliar fueron encontradas en las áreas productoras de Manchay bajo, Distrito de Pachacamac, Lima. Después del aislamiento, observaciones bajo el microscopio, de sus características morfológicas y tamaño de sus estructuras, el patógeno fue identificado como el hongo *Corynespora cassiicola*. Las plantas de fresa sanas inoculadas en invernadero, produjeron lesiones después de tres días. Los síntomas consistieron en manchas de color marrón oscuro con el centro de marrón claro, rodeados por un halo amarillo, que coalescen y posteriormente causaron la necrosis de toda la hoja. El hongo *Trichoderma harzianum* cepa T-22 mostró una actividad antagónica contra *C. cassiicola* causando una inhibición de micelio en un 41.8 %. En los ensayos «In vitro», los fungicidas Fosetil aluminio (Aliette) y Tiabendazol (Mertect) inhibieron el crecimiento micelial de *C. cassiicola* en un 100 y 96.32 %, respectivamente. En invernadero, el fungicida Azosystrobim (Stronsil) a una concentración de 0.75 g/L tuvo el mejor control sobre *C. cassiicola* y el menor ABCPE (área bajo la curva de progreso de enfermedad), seguido de Tiabendazol (Mertect) a una concentración de 1.5 ml/L.

Palabras clave: Mancha foliar, *Corynespora cassiicola*, Cultivo de fresa (*Fragaria ananassa*).

ABSTRACT

Strawberry plants (*Fragaria ananassa*) showing symptoms of leaf spot were found in the producing areas of Manchay Bajo, Pachacamac district, Lima. After isolation, observations under the microscope of its morphological characteristics and size of its structures, the pathogen was identified as the fungus *Corynespora cassiicola*. Healthy strawberry plants inoculated in a greenhouse, produced lesions after three days. The symptoms consisted of dark brown spots with a light brown center, surrounded by a yellow halo, that coalesced and subsequently caused the necrosis of the whole leaf. The fungus *Trichoderma harzianum* strain T-22 showed an antagonistic activity against *C. cassiicola* causing a micelial inhibition of 41.8 %. In «In vitro» tests, the fungicides Fosetil aluminum (Aliette) and Thiabendazole (Mertect) inhibited the mycelial growth of *C. cassiicola* by 100 and 96.32 %, respectively. In greenhouse, the fungicide Azosystrobim (Stronsil) at a concentration of 0.75 g/L had the best control over *C. cassiicola* and the lowest ABCPE (area under the disease progress curve), followed by Thiabendazole (Mertect) at a concentration of 1.5 ml/L.

Key words: Leaf spot, *Corynespora cassiicola*, Strawberry cultivation (*Fragaria ananassa*).

I. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) es una especie hortícola que se ha cultivado desde hace varios siglos en Europa, Asia y los Estados Unidos de América. En el Perú, el cultivo de la fresa se ha convertido en una actividad productiva a tener muy en cuenta, principalmente en dos regiones, Lima y La Libertad, tanto en lo económico como en lo social. El crecimiento de la actividad es notable por el aumento en los niveles de producción y comercialización de fresa en presentaciones para consumo en fresco, así como en productos procesados diversos, debido a que hay condiciones de clima y suelo adecuados para el establecimiento de este cultivo.

En Pachacamac se viene sembrado el cultivo de fresa debido a que se ha adaptado a esa zona, ya que reúne las condiciones ambientales propicias para su desarrollo, pero se ha presentado una enfermedad caracterizada por la presencia de manchas necróticas en las hojas principalmente, las que bajo condiciones favorables adquieren tonos parduscos rápidamente. Las manchas foliares son pequeñas, circulares de color marrón oscuro rodeados por un halo púrpura o rojizo, con el centro de color marrón claro; mientras que, en los tallos se muestran lesiones de color negro, forma alargada y hundida rodeada de un halo rojizo. La enfermedad afecta en cualquier estado fenológico de la planta y si no se realiza una estrategia de control a tiempo puede afectar y llegar a destruir el cultivo.

Durante la campaña 2015, en la zona de Manchay bajo, perteneciente al Distrito de Pachacamac, se presentó muerte total de plantas por la presencia de manchas foliares de borde púrpura y de agente causal desconocido; por ello, se planteó el presente trabajo de investigación a fin de determinar el agente causal y su posible control. Los objetivos del presente trabajo fueron:

- ✓ Identificar el agente causal de la mancha foliar en Fresa (*Fragaria ananassa*).
- ✓ Determinar el mejor tratamiento de control químico o biológico contra la mancha foliar en Fresa (*Fragaria ananassa*) en condiciones de invernadero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La Fresa (*Fragaria ananassa*)

2.1.1 Origen

El origen de la fresa es de la región alpina de Europa, en ese entonces era una fruta pequeña y de sabor intenso. En el siglo XVIII se descubrió en Chile una fresa más grande, la cual conocemos hoy como fresón o frutilla y que es la que comúnmente se siembra en todo el mundo por sus altos rendimientos y que actualmente recibe el nombre genérico de “fresa” (MINAGRI 2008).

Es probable, que agricultores ingleses, utilizando una misma parcela de terreno, plantaron entremezcladas las especies *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*. Las plántulas originadas de la semilla de este cruce interespecífico, al azar dieron frutos relativamente grandes los cuales originaron a la denominada *Fragaria ananassa*, fresa que en los últimos 160 años ha dado las variedades comerciales más importantes del mundo (INIA 1997).

2.1.2 Taxonomía y morfología

El género *Fragaria* (*Fragaria spp.* del latín *fragans*, oloroso), pertenece a la familia Rosaceae, agrupa unas 3000 especies de 107 géneros diferentes, distribuidas en su mayor parte en las zonas cálidas del hemisferio Norte. La fresa es una planta dicotiledónea del género *fragaria* (Bonet 2010)

La clasificación taxonómica de la fresa es la siguiente (Bonet 2010):

- Reino: Plantae
- Subreino: Embryobionta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Superorden: Rosanae

- Orden: Rosales
- Familia: Rosaceae
- Subfamilia: Rosoideae
- Género: *Fragaria*

La planta de fresa es de tipo herbáceo y perenne, con estolones que enraízan en el ápice y hojas compuestas trifoliadas. El follaje es de color verde oscuro, brillante o grisáceo. La hoja consta de tres folíolos de forma oval o redonda, de bordes aserrados, emergen de un tallo de entrenudos cortos al que se conoce como la corona. De la corona surgen crecimientos, algunos de ellos diferencian inflorescencias y otros de tipo vegetativo que son los estolones e hijuelos que son coronas secundarias. Estos últimos utilizados para la propagación. Las flores en conjunto forman inflorescencias tipo corimbo, suspendidos por pedúnculos florales delgados (Patiño *et al.* 2014).

El fruto de la fresa constituye un agregado en el cual el receptáculo es el asiento de los aquenios o frutos verdaderos. Estos al inicio del crecimiento se tornan de color negro y destacan por su prominencia. La parte comestible es el receptáculo que desarrolla en interacción con los aquenios y madura con una pulpa suave y aromática. El receptáculo carnoso puede adoptar formas, color y tamaños variables. Aquí los aquenios son determinantes para la formación apropiada del receptáculo. Los aquenios son frutos monospermos e indehiscentes, es el material de propagación por vía sexual (INIA 1997).

2.1.3 Requerimientos climáticos

La planta de fresa es termo y fotoperiódica, es decir que su crecimiento depende de las condiciones de luz y temperatura. Las altas temperaturas y los días largos (más de doce horas de luz) provocan un crecimiento vegetativo excesivo; las bajas temperaturas y días cortos inducen la floración. En condiciones donde todos los días tienen menos de 12 horas de luz, el factor determinante para producir la fruta, es la temperatura, siendo la óptima en promedio de 14 °C, pero se adapta bien entre los 10 °C y 20 °C (IIFT 2011). En el Perú la fresa se da en Costa, Sierra y Selva; sin embargo, algunos manejos artificiales ayudan a darle un medio más propicio, congruente con los 23 °C como temperatura óptima para su crecimiento, sin dejar de necesitar determinado número de horas de frío que ayuda a formar un número adecuado de hojas para obtener una buena producción (Albensur 1998).

2.1.4 Fresa Variedad Camino Real

Planta pequeña y erecta, cual permite grandes densidades de plantación y facilita la recolección. Produce una fruta de primera calidad superior a Camarosa y Gaviota. Es originaria de California, resistente al ataque de ácaros, con muy buena productividad y excelente calidad de los frutos, llega a producir 4 libras por planta en el ciclo de 18 meses que dura la planta en producción, se pueden sembrar 206 plantas por cama de 31 m, es decir entre 30 y 35 cm entre plantas, al sexto mes comienza la producción, cosecha promedio de 3 libras por planta en el ciclo de 18 meses, es tolerante al ataque de *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp., y *Phytophthora* sp. (Angulo 2009).

2.2 Enfermedades causadas por hongos de suelo

Las enfermedades que afectan frecuentemente a esta especie frutal son las siguientes:

2.2.1 Pudrición de la corona

Producida por el pseudohongo *Phytophthora fragariae*. La planta detiene su crecimiento, se marchitan las hojas y presenta manchas de color rojizo, el patógeno que es un habitante del suelo, se propaga fácilmente cuando se presentan bajas temperaturas en la noche, bastante calor en el día y alta humedad relativa. Para su control se requiere desinfestación del suelo y la utilización de variedades tolerantes a la enfermedad (Angulo 2009).

2.2.2 Podredumbre de la raíz y del cuello

Los síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora cactorum* dependen de la etapa del sistema de producción y de la época del año. A comienzos de la estación, en los viveros o en las plantaciones, las plantas infectadas pueden verse atrofiadas. A medida que el clima se pone más cálido, el síntoma más notable de infección, por lo menos en cultivares susceptibles, es el colapso de la planta relacionado con la podredumbre del cuello. Sin embargo, es difícil hacer una clara distinción entre la necrosis del cuello provocada por *P. cactorum* y la inducida por *Colletotrichum acutatum* u otros patógenos, especialmente en las últimas etapas de la enfermedad.

En las primeras etapas posteriores a la infección, la podredumbre del cuello ocasionada por *P. cactorum* puede estar limitada a regiones o sectores externos del cuello de la planta. Se requieren pruebas de diagnóstico para determinar con certeza cuál es el patógeno o los patógenos asociados con el problema. En los viveros, *P. cactorum* provoca lesiones en los estolones además de podredumbre de la raíz y del cuello. Muchas de las raíces de las plantas hijas infectadas por *P. cactorum* exhiben regiones de necrosis oscura, que pueden estar limitadas al exterior (cortical) o extenderse al interior (estela) de la raíz. El patógeno también puede estar presente en plantas de viveros sin síntomas claros de enfermedad (Browne 2011).

2.2.3 Rhizoctoniasis

Producido por *Rhizoctonia solani*, las plantas presentan subdesarrollo y necrosis en la región apical, destacándose de las sanas. Los pecíolos y los estolones muestran coloración enrojecida o rojiza; la base de los pecíolos con lesiones necróticas profundas y oscuras, de forma alargada y extensiones variables. Las hojas nuevas exhiben, por lo general, pecíolos alargados y folíolos curvados. Al ser arrancadas, las raíces presentan lesiones marrón - oscuras, principalmente cerca de su inserción con el rizoma. (De Souza *et al.* 1995).

2.2.4 Fusariosis

La enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, es un importante patógeno de suelo de los cultivos de fresa. Los síntomas constan del crecimiento atrofiado, el secado de las hojas más viejas, la raíz y la corona negra (Mansor *et al.* 2015).

2.2.5 Pudrición carbonosa

Enfermedad causada por el hongo *Macrophomina phaseolina*. La pudrición del carbón vegetal en la fresa suele ocurrir después de que las plantas están bien establecidas y empiezan a producir frutos. Las raíces se vuelven necróticas, inicialmente las hojas más viejas se marchitan, se vuelven grisáceas y se secan, pero con el tiempo todo el follaje decae y se seca. Las secciones transversales de las coronas de las plantas de fresa con estos síntomas mostraron tejido necrótico y zonas marrón rojo a marrón oscuro de los tejidos vasculares y corticales (Hajlaoui *et al.* 2015).

2.2.6 Marchitez

Enfermedad causada por *Verticillium dahliae*. *Verticillium* forma una estructura de sobrevivencia, el microesclerocio lo cual permite al patógeno sobrevivir en condiciones no favorables y persistir entre cultivos hospederos. Los microesclerocios de *Verticillium* germinan en el suelo cuando son activados por exudados de la planta hospedera (Bolda y Koike 2013).

Una vez penetrado en la raíz, el hongo avanza en el xilema (las vías de agua en la planta), degradando las paredes de células y muy probablemente soltando elementos tóxicos. Esta clase de colonización se llama infección sistémica. Estas infecciones sistémicas interfieren con la capacidad de la planta de conducir agua por lo cual las plantas infectadas se marchitan en episodios de alta necesidad de agua, por ejemplo durante el tiempo cálido, seco y riegos insuficientes. Las plantas enfermas mostrando síntomas de decaimiento pueden recuperarse en cuanto las condiciones difíciles disminuyan, pero todavía es muy probable que tales plantas no vuelvan a ser tan productivas al nivel de las plantas no afectadas (Bolda y Kolke 2007).

El control de esta enfermedad se debe hacer con variedades tolerantes. Así mismo, se recomienda la rotación de cultivos, evitando establecer los fresales donde se ha cultivado recientemente, tomate, ají, algodón, melón, etc. (INIA 1997). El manejo de la marchitez por *Verticillium* debe manejarse a través de la prevención, debido a que no existen medidas que funcionen. Esto puede lograrse asegurándose que no existen niveles perjudiciales de este patógeno en el suelo y que los trasplantes de fresa no están infectados. El control del patógeno en el suelo rutinariamente se ha logrado con la fumigación al suelo antes del trasplante con una fumigación de bromuro de metilo y cloropicrina (MB:CP). Una formulación común sería aproximadamente 2 partes de MB por una de CP (2 MB: 1 CP) (wt/wt.) a 350 lbs por acre. Se han probado muchos tratamientos alternativos y muchos han probado dar resultados satisfactorios, pero ninguno ha sido lo suficientemente empleado para determinar si ciertamente pueden compararse a aquellos que han sido usados históricamente por la industria (Gordon y Krishna 2007).

Se puede usar la Cloropicrina sola, pero aún a dosis tan altas como 200 lbs. por acre pueden no ser completamente efectivas. La Cloropicrina en combinación con telone puede ser más efectiva. En un estudio el producto comercial Inline (35 % cloropicrin y 65 % telone) a 425 lbs/acre mostró que pudo controlar la marchites por *Verticillium* al igual que MB:CP. La eficacia de estos tratamientos puede mejorar con el uso de cubiertas de plástico VIF (plástico virtualmente impermeable) (Gordon y Krishna 2007).

2.3 Enfermedades foliares

2.3.1 Antracnosis

El agente causal es *Colletotrichum gloeosporioides*. Los síntomas son: Manchas de forma redondeada y formando círculos concéntricos, en hojas tallos, flores y frutos, en el caso de la fresa los frutos son sus preferidos por su alto contenido de agua. Entre los factores que favorecen su desarrollo tenemos: Alta humedad relativa, deficiente aireación, exceso de agua, malos drenajes, suelos que se encharcan, mal manejo de desechos contaminados deficiencias nutricionales, la presencia de artrópodos plaga (insectos, ácaros y moluscos) (Angulo 2009).

2.3.2 Oídio (*Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*)

El principal síntoma visual observado en los cultivares estudiados fue el desarrollo de un micelio de coloración blanquecina de *Sphaerotheca macularis* f.sp. *fragariae* en la superficie de las hojas, siendo el área cubierta con las estructuras del hongo directamente proporcional al grado de susceptibilidad del cultivar. Las hojas de los cultivares más susceptibles también presentan síntomas de marchitamiento, enrollamiento de los bordes hacia la nervadura central, se seca y consecuentemente origina su caída (Ucker *et al.* 2005). Como medida de control para esta enfermedad se recomienda evitar realizar plantaciones en lugares sombreados o en suelos con drenaje defectuoso. Cuando sea necesario realizar controles a base de productos químicos, puede aplicarse compuestos a base de azufre, Benomyl al 0,1 % (INIA 1997).

2.3.3 Tizón de la hoja

Enfermedad ocasionada por *Phomopsis obscurans*. Las manchas al inicio son de forma circular y de color rojizo-púrpura, difícil de distinguir de otras manchas foliares. Las

manchas típicas, más desarrolladas, son de forma elíptica o en V, con tres zonas bien definidas, una central de color marrón oscuro, una intermedia de color marrón claro y una exterior de color púrpura o roja. Esta enfermedad puede observarse también en pecíolos y estolones produciendo manchas alargadas, hundidas, de color marrón claro, que en principio pueden ser confundidas con los síntomas de antracnosis. En ataques severos, puede ocasionar la muerte del estolón. Las manchas provocadas por *Phomopsis*, en los estolones se distinguen de antracnosis por tener un color marrón más claro y porque en la fase más avanzada, los mismos quedan más resacos, como si estuvieran quemados (Giménez *et al.* 2003).

2.3.4 Viruela

Enfermedad ocasionada por *Mycosphaerella fragariae*. Los síntomas se inician en hojas jóvenes como manchas púrpuras circulares. En la medida que avanza el ciclo, las manchas se agrandan y el centro de la lesión toma un color gris claro o blanco característico, quedando los bordes de color rojizo. El mismo tipo de manchas aunque más alargadas, puede aparecer en las inflorescencias, en pecíolos y en los cálices florales (Giménez *et al.* 2003).

El control es básicamente preventivo; la renovación frecuente del material de propagación impide la difusión de la enfermedad. Puede ayudar, también el uso de variedades resistentes si están adaptadas a las condiciones de cultivo en las áreas respectivas. Cuando la incidencia de la enfermedad en una zona es elevada, conviene seguir un adecuado programa de pulverizaciones. En las plantaciones nuevas, se recomienda aplicar a intervalos mensuales durante el otoño y primavera, compuestos orgánicos tales como zineb y maneb a las dosis de 0,25 % o fungicidas cúpricos al 0,4 %. En la primavera, antes de la fructificación, son suficientes generalmente 1 a 2 pulverizaciones (INIA 1997).

2.3.5 Enfermedad de corona y peciolo

Ocasionada por el hongo *Coniella fragariae* ha sido aislado en Suiza, como hongo potencialmente patógeno de la corona y peciolo de plantas de fresa visualmente sanas (Rigotti *et al.* 2003) y de otras partes de las plantas como flores y bayas (Sesan 2006).

2.3.6 Quemadura de hoja

Ocasionada por el hongo *Diplocarpon earlianum*, produce manchas irregulares de color rojizo-púrpura en hojas de mediana edad y viejas. El centro de las lesiones puede adquirir un color marrón pero nunca blanco ni gris como en la viruela. Las manchas pueden unirse abarcando grandes porciones de la hoja. En la última etapa, las hojas se secan, se enrollan y quedan como quemadas. Además de la hoja puede afectar inflorescencias, en especial puede secar el cáliz de la flor o del fruto, lo cual desmerece la apariencia de los mismos (Giménez *et al.* 2003).

2.3.7 Mancha de la hoja

Ocasionada por el hongo *Gnomonia comari*. La enfermedad produce en las hojas manchas de color marrón claro o grises, a veces con apariencia de círculos concéntricos difusos por la presencia de estructuras del hongo que contienen las esporas. Ciertas manchas, pueden ser similares al tizón, por lo cual puede ser confundida con dicha enfermedad. Ataca en general hojas jóvenes y sus pecíolos, llegando a secarlas completamente. Asimismo el patógeno puede afectar frutos, pedúnculos y el cáliz (Giménez *et al.* 2003).

En los frutos produce una pudrición blanda de color marrón claro, generalmente en la zona del cáliz, en las cuales se forman las estructuras que contienen las esporas. El ataque de este hongo puede predisponer a la invasión del fruto por parte de otro patógeno: *Botrytis cinerea*, el cual produce rápidamente un moho gris que cubre las manchas, por lo cual muchas veces no se visualizan los síntomas causados por *Gnomonia* en los frutos (Giménez *et al.* 2003).

2.3.8 Moho gris

Una de las principales enfermedades es el moho gris causado por *Botrytis cinerea*, que aparece como una mancha marrón claro o amarillenta hacia el final del cáliz y a los pocos días cubre de un moho gris, de apariencia polvosa, toda la superficie de la fruta (Baraona y Sancho 1992). Este patógeno es capaz de afectar el 95 % de los frutos después de 48 horas de cosechados (Kurozawa y Pavan 2006).

Según Kurozawa y Pavan (2006) los factores que favorecen su desarrollo son:

- Alta humedad relativa.
- Temperaturas entre 15 a 20° C.

- La luz cumple un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo del hongo, principalmente en la fase de esporulación.

El moho gris es considerado como una de las enfermedades más importantes de la fresa. En algunos casos, se han reportado pérdidas del 50 % o más de la producción (Farrera *et al.* 2007).

Entre las medidas de control podemos mencionar, la densidad de siembra, buen manejo del drenaje y adecuada ventilación en el cultivo. Con el sistema de hidroponía se disminuye notoriamente los niveles de esta enfermedad. Además se utilizan productos como el: Fenhexamid, Pyrimethanyl, Carbendazin+Iprodione, Carbendazin, Fenhexamid+Tebuconazole (Angulo 2009).

2.4 Enfermedades ocasionadas por virus

2.4.1 Strawberry Mild Yellow Edge Virus (SMYEV)

La planta indicadora “Alpine” injertada con el foliolo central de plantas sintomáticas mostró hojas anormales en tamaño y forma, moteado, pérdida de vigor, hojas enanas y pequeñas. En algunas ocasiones se observó necrosis y epinastia. En otras se observó el moteado de uno o más folíolos de la hoja más joven y pecíolo más cortos de lo normal (Conci *et al.* 2009).

2.4.2 Encrespamiento “Strawberry crinkle virus” – SCV

El virus de encrespamiento de fresa de forma aislada o en complejo con otros virus causa una enfermedad del mismo nombre, caracterizada por síntomas de manchas cloróticas o necróticas, asociadas a nervaduras provocando en casos severos encrespamiento o distorsión de folíolos (Kimati 1997).

2.4.3 Virus de las bandas de la nervadura (Strawberry vein banding virus)

El virus de las bandas de nervaduras de fresa, causa síntomas foliares de clorosis, seguido de nervaduras en algunos cultivares, generalmente más visibles en la fase aguda de infección como observado en Sau Paulo; en algunos aislados de virus en el cultivar IAC Campinas. En Clones de *Fragaria vesca* y *Fragaria virginiana* los síntomas característicos del virus de las nervaduras son aclaramiento de las nervaduras y amarillamiento en las nervaduras de

hojas. En la fase crónica, los síntomas son cíclicos. Las hojas sin síntomas comúnmente aparecen tras los trasplantes o después de la aplicación de los fertilizantes (Kimati 1997).

2.4.4 Mosqueado Virus

El virus del mosqueado (manchas pequeñas y redondas) de la fresa es latente en cultivares comerciales, pero presenta una interacción sinérgica, con encrespamiento y clorosis marginal. En *Fragaria vesca*, este virus causa inicialmente aclaramiento de nervaduras, manchas pequeñas y redondas, mosaico, clorosis y epinastia de una o más hojas. En la fase crónica, produce manchas pequeñas y redondas, reducción del tamaño de los folíolos de la planta y distorsión foliar. Sus estirpes proporcionan una gran variación de síntomas desde muy débil hasta severos (Kimati 1997).

2.5 Enfermedades ocasionadas por bacterias

2.5.1 Mancha angular

Ocasionada por la bacteria *Xanthomonas fragariae*. Esta enfermedad se caracteriza por producir manchas en la cara inferior de las hojas, que al inicio son pequeñas, de color verde claro, con aspectos húmedos y delimitados por las nervaduras. Las lesiones se pueden ver fácilmente a trasluz. Posteriormente, las manchas aparecen en la cara superior de la hoja tomando un color marrón rojizo, a veces con un halo amarillo, fácilmente confundible con otras enfermedades foliares. El tejido afectado muere y las hojas toman un aspecto desflecado (Giménez *et al.* 2003).

En condiciones de alta humedad, con muchas horas de hoja mojada, se puede observar un exudado viscoso en la parte inferior de las hojas, constituido por bacterias. Cuando este exudado se seca queda como una lámina de escamas blancas. Estos elementos ayudan a la identificación de la enfermedad y distinguirla de otras lesiones foliares. La bacteria también puede afectar los tejidos vasculares de la corona, produciendo la muerte de la planta. El único síntoma visible en este caso son lesiones húmedas en la base de las hojas nuevas que van emergiendo (Giménez *et al.* 2003).

2.6 Síntomas de *Corynespora cassiicola* en diferentes cultivos

En las hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en Brasil, se presentaron manchas pequeñas, circulares a elípticas de color marrón claro rodeadas por un círculo de color púrpura que originaban necrosis, la misma que aparecía en las puntas de los brotes y en la descomposición del tallo. Además encontraron un hongo dematiáceo semejante a *Corynespora*, esporulando sobre los tejidos necróticos (Reis *et al.* 2014).

La enfermedad de la mancha foliar ocasionada por *Corynespora cassiicola* en plantas variegadas (cambio de coloración de las zonas verdes de las plantas) del arbusto (*Ligustrum sinense*) en Florida (USA), comenzaron como manchas diminutas, rojizas y circulares, que se agrandaban para formar lesiones de color marrón claro con márgenes púrpura. Las lesiones a menudo se unen, seguido de abscisión foliar. Así mismo se menciona que en plantas no variegadas de *L. sinense*, la mancha foliar es de color marrón tiznado con márgenes marrón oscuro, con halos amarillos prominentes y mide de 1 a 2 mm de diámetro (Miller y Alfieri 1974).

Un primer reporte de *C. cassiicola* se realizó, afectando plantas de *Codiaeum variegatum* (crotón) in Sri Lanka (Asia), en donde las lesiones inicialmente, aparecen como manchas rojizas, luego se vuelven elípticas a irregulares y marrón claro en el centro, dando lugar a una extensa necrosis. De la misma forma en el centro de la lesión, el hongo produjo estructuras de propagación (conidios) (Jayasuriya y Thennakoon 2007).

La mancha foliar de soja (*Glicine max*) causada por *C. cassiicola* se reportó en Corea del Sur, en donde los síntomas consistían en manchas marrones rojas en hojas y demostraron ser patógenas en las pruebas de inoculación (Ucker *et al.* 2005). Así mismo, se observaron manchas circulares irregulares con un centro de color café claro a blanquecino y una frontera marrón rojizo a marrón oscuro en árboles de caucho (*Hevea brasiliensis*) infectados por *C. cassiicola* en Manaos (Brasil) (Gasparotto *et al.* 1988). La mancha foliar causada por *C. cassiicola* en las hojas de betelvine (*Piper betle* L.) empezaron con la formación de pequeñas lesiones circulares a irregularmente circulares rodeadas inicialmente por halo clorótico en la lámina foliar, que aumentaron en tamaño hasta convertirse en centros de color tostado y margen marrón amarillento (Acharya *et al.* 2002).

La enfermedad de mancha foliar de papaya (*Carica papaya*) se reportó por primera vez en Nigeria. El síntoma se caracterizó por un centro como el papel, rodeado por un halo amarillo y su agente causal se mencionó como *C. cassiicola* (Oluma y Amuta 1999).

La enfermedad ocasionada por *C. cassiicola* en el árbol de caucho (*Hevea spp.*) en la región norte de Brasil, se manifiesta por lesiones en las hojas con halo amarillo, las cuales evolucionan hacia una coloración de color beige en el centro, seguida de abundante esporulación del hongo (Coehlo *et al.* 2013).

C. cassiicola afecta a las hojas maduras como inmaduras de las plantas de caucho. Los síntomas aparecen primero como manchas marrones grisáceas, que se agrandan en lesiones circulares o irregulares conspicuas de tamaños y formas variables; los puntos severos pueden coalescer para producir áreas marrones nítidas extensas en la hoja, algunas de las cuales pueden convertirse en lesiones irregulares parecidas al papel que dan una apariencia chamuscada. En las hojas maduras el rasgo característico de la enfermedad es el dorado o ennegrecimiento de las venas adyacentes a las lesiones que dan la apariencia a un esqueleto de un pescado. El área alrededor de las lesiones gradualmente se vuelve clorótica, debido a la destrucción de los cloroplastos; incluso una sola lesión en un folíolo puede resultar en defoliación. También se observan lesiones grisáceas negras en algunos pecíolos causando defoliación, incluso sin lesiones en la hoja (Liyanage *et al.* 1986).

2.7 El control biológico

El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos ha sido utilizado en la agricultura de manera empírica desde sus inicios. La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de control biológico: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos (Serrano y Galindo 2007).

Una de las limitantes más importantes para alcanzar el uso a nivel comercial de los agentes de control biológico es que, a diferencia de los pesticidas químicos que generalmente hacen disminuir rápidamente la densidad de la plaga o la severidad de la enfermedad, la eficacia

de los productos biológicos en el campo depende sensiblemente de factores ambientales difíciles de controlar (temperatura, humedad, acidez, exposición a luz ultravioleta, etc.). Además, su espectro de acción contra diferentes plagas o patógenos es menor que el de los plaguicidas químicos (Serrano y Galindo 2007).

El caso de los plaguicidas biológicos es el más estudiado: se comercializan varios productos de este tipo desde la década de los 60. Destacan los ejemplos de *Bacillus thuringiensis* y de hongos que atacan insectos (entomopatógenos). En el caso de agentes biológicos para el control de enfermedades (principalmente producidos por hongos), los éxitos comerciales son todavía limitados y están basados principalmente en hongos de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium* y *Candida*, y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Agrobacterium* (Serrano y Galindo 2007).

2.7.1 Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico, como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento, desarrollo y por otro lado, por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad y Baker 1987, Hjeljord y Tronsmo 1998).

La presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas, forestales, en barbechos) se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie Wardle *et al.* citado por Samuels (1996).

Trichoderma está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir fundamentalmente en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Hjeljord y Tronsmo 1998).

2.7.2 Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Díaz 1994, Lorito *et al.* 1990).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Carsolio *et al.* 1999).

El micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma spp.* ha sido ampliamente estudiado Chet *et al.* citados por Pérez (2004). No obstante, existen aspectos en el mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales (Chet y Benhamou 1998).

2.7.3 Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Ucker *et al.* 2005). En la práctica uno de los antecedentes ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* resistentes al Agrosin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* (Campbell 1989).

2.8 Parasitismo y Patogenicidad

Un parásito es el organismo que vive ya sea fuera o dentro de otro organismo del cual obtiene su alimento. A la relación que se establece entre un parásito y su hospedante se denomina parasitismo. Un fitoparásito es un organismo que se asocia de manera estrecha con una planta y que se reproduce o se desarrolla a expensas de ella (Agrios 1995).

La obtención de los nutrientes y agua de la planta hospedante por el parasito da origen a una menor eficiencia en el desarrollo normal de la planta y provoca un detrimento en su posterior desarrollo y reproducción, así en la mayoría de los casos el parasitismo se encuentra estrechamente relacionado con la patogenicidad, debido a que la capacidad que tiene el parasito de invadir y establecerse en su hospedante por lo general provoca el desarrollo de una enfermedad en este último (Agrios 1995).

2.9 Productos biológicos que se emplearon para el control de la mancha foliar en fresa

2.9.1 Biosplent 70 WP

Es un fungicida biológico de uso agrícola clasificado como ligeramente tóxico. Es un producto microbiano conteniendo esporas de cepas naturales de *Bacillus subtilis*. Una alternativa para disminuir la contaminación por el uso de agroquímicos sintéticos en el manejo de enfermedades del suelo, es el uso de antagonistas del género *Bacillus*, ya que son considerados los más eficaces por sus propiedades de inhibición de fitopatógenos del suelo así como en la promoción del crecimiento de las plantas e induciendo mayor rendimiento de cultivos (Aino *et al.* 1997).

Varias especies de *Bacillus spp.* incluyendo *B. subtilis* son antagonistas para hongos patógenos de plantas y bacterias. *Bacillus spp.* producen al menos 66 diferentes antibióticos, los cuales tienen efectos antagonistas contra diferentes hongos como *Ceratocystis ulmi* (Ferreira *et al.* 1990).

2.9.2 T-22

Trichoderma spp. es un género de hongos que se encuentra en muchas regiones del mundo. Estos hongos son ubicados en una amplia variedad de entornos, apareciendo en el suelo, bosques, madera y papel, entre otros lugares (Harman 2004.).

Entre las propiedades de *Trichoderma spp.* está la de inducir resistencia sistémica a enfermedades de las plantas. Estas características tienen ventajas potenciales significativas para el control de enfermedades de plantas. En primer lugar, proporciona oportunidades para el control de enfermedades y sin pulverizaciones foliares reales. Esto reduce las consecuencias ambientales de la aplicación de pesticidas y los usuarios ahorran dinero. En segundo lugar, los efectos pueden ser de larga duración (Harman 2004).

En un ensayo en donde se añadió *Trichoderma harzianum* cepa T-22 a los trasplantes de tomate en el inicio de la temporada, originó como resultado que las plantas eran sustancialmente menos susceptibles a la enfermedad foliar tizón temprano varios meses más tarde. La gama de patógenos controlados puede ser bastante grande y puede incluir hongos, bacterias e incluso virus (Harman 2004).

2.9.3 Biodelta

Es un producto a base de *Pseudomonas fluorescens*. Es una bacteria PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que posee la capacidad de disminuir la acción de fitopatógenos a través de la producción de sideróforos y antibióticos y puede emplear una gran variedad de sustratos en su metabolismo carbonado. Además, se conoce que cuando se inocula en el suelo modifica su potencial de reducción y la supervivencia aparece asociada con condiciones reductoras y ligeramente alcalinas en el suelo. Por las características mencionadas, se considera que la inoculación de esta bacteria podría disminuir el empleo de los agroquímicos que se emplean en la producción vegetal (Perotti *et al.* 2005).

2.10 Productos químicos que se emplearon para el control de la mancha foliar

2.10.1 Stronsil

Es un fungicida agrícola categorizado como Moderadamente peligroso, sistémico con propiedades protectoras, de amplio espectro, cuyo ingrediente activo es Azoxystrobin. El azoxystrobin se comenzó a vender por primera vez en 1998 y su actividad está dirigida contra los cuatro principales grupos de hongos patógenos: Ascomycetes (por ejemplo, el polvillo de moho), Basidiomycetes (ejem: tizón), Deutoromycetes (ej., necrosis del arroz) y Oomycetes (ejem: mildiú de la vid o polvo de azúcar) (Clough y Godfrey 1996).

2.10.2 Zetron 720

Es un fungicida agrícola categorizado como Moderadamente peligroso, cuyo ingrediente activo es Clorotalonil. En ensayos que se realizaron sobre el control de manchas foliares fungosas de la papa (*Solanum tuberosum* L.), se observaron los mayores rendimientos cuando los fungicidas clorotalonil, mancozeb y oxiclورو de cobre fueron aplicados cada 15 días en forma preventiva, que cuando se aplicaron de acuerdo al avance de la enfermedad (Navia y Parker 1991).

2.10.3 Difeconasil 250 EC

Es un fungicida agrícola categorizado como ligeramente peligroso, su ingrediente activo es Difeconazole. Ensayos con Difeconazole han sido probados con éxito en la enfermedad conocida como roya (*Melampsora hypericorum*) en *Hypericum calycinum* (Andrés 2015).

2.10.4 Mertect 500 SC

Es un fungicida sistémico de amplio espectro, cuyo ingrediente activo es el Tiabendazol. En ensayos “*in vitro*”, se evaluó el fungicida Tiabendazol contra *Fusarium solani*, aislado de necrosis de tallos y cotiledones de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum, en donde el producto inhibió el 100 % de crecimiento micelial del patógeno (Bacab *et al.* 2010).

2.10.5 Aliette.

Es un fungicida que contiene como ingrediente activo a Fosetil Aluminio. El fosetil se formula como polvo mojable al 80 %, es el primer fungicida comercial que es verdaderamente sistémico. Se transloca en forma acropétala y basipétala después de la aplicación foliar en una amplia variedad de cultivos tales como palto, piña, frutales, y algunos ornamentales. El transporte basipétalo después del tratamiento foliar es suficiente para alcanzar una completa protección de la base del tronco y del sistema radicular contra organismos (Pinto 1990).

2.11 Identificación molecular de microorganismos.

Los microorganismos juegan un rol muy importante para el humano dado que son benéficos para su salud o economía (Probióticos, fijadores de nitrógeno etc.) o bien patógenos para el humano, o bien de los animales y plantas económicamente importantes. Es por ello que se han desarrollado una serie de metodologías para poder diferenciar un microorganismo de otro y para poderlos identificar. Estas metodologías se han basado tradicionalmente en la observación de los síntomas que presentan los hospederos, en la observación macro o microscópica del microorganismo o bien de las estructuras reproductivas de los microorganismos, del desarrollo del patógeno en un medio de cultivo específico. Estas metodologías son buenas en algunos casos, pero deficientes en otros, por lo que en las últimas tres décadas se han desarrollado técnicas moleculares de detección e identificación de microorganismos; las cuales se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de

los microorganismos en forma directa o bien de una muestra conteniendo el microorganismo en cuestión. Dentro de las ventajas de las técnicas moleculares de detección se encuentran: Especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), 2. Sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), 3. Rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas) y 4. Pueden ser automatizadas (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos) (Rodríguez *et al.* 2009).

2.11.1 El ADN.

El ADN es la molécula que lleva codificada la información genética característica de los diferentes seres vivos. La molécula de ADN está constituida por una doble cadena en la que cada una de sus hebras está formada por uniones covalentes sucesivas entre un azúcar (desoxirribosa) y una molécula de fosfato. Cada azúcar de las dos cadenas está unido a una de las siguientes 4 bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Sin embargo, en la molécula del ácido ribonucleico (ARN), la timina (T) es substituida por el uracilo (U) (Martínez 2009).

2.11.2 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta es la técnica más utilizada para la detección de microorganismos, se basa principalmente en realizar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo. En esta técnica la cadena doble de ADN es separada en dos cadenas sencillas sometiéndola a temperaturas mayores a 92 grados centígrados, después se hibrida o alinean dos pequeños segmento de ADN complementarios uno a una cadena y el otro a la otra. Estos pequeños segmentos son llamados iniciadores, los cuales deben de ser diseñados de tal manera que solo se hibriden con el ADN del microorganismo que se desee y su tamaño generalmente va de 18 a 25 bases. Una vez que los iniciadores están unidos a las cadenas complementarias se adiciona a la reacción una ADN polimerasa la cual va a formar la nueva cadena tomando como bases la cadena sencilla y uno de los extremos del iniciador (3'). Después de este primer ciclo, si se partió de una sola cadena doble de ADN se tendrían dos cadenas dobles. Esta amplificación se incrementa en forma geométrica a medida que se repite el número de ciclos, así después de dos ciclos tendríamos cuatro cadenas dobles de ADN, y después de tres, ocho y así sucesivamente, después de treinta ciclos tendríamos una gran cantidad de ADN amplificado para ser visualizado a simple vista. Las

ventajas de PCR sobre otras técnicas de detección se han reportado en varias ocasiones. La detección de *Chlamydia trachomatis* por PCR resultó ser más precisa, con sensibilidad de 90-100 % y especificidad mayor al 97 % que la detección por ELISA (Louie *et al.* 2000). Así mismo, la PCR ha ayudado a identificar microorganismos infecciosos relacionados a enfermedades previamente identificadas como de origen no infeccioso (Ayala *et al.* 2004).

La técnica de PCR se ha utilizado para la identificación de virus, bacterias, hongos, fitoplasmas, nematodos etc. Un ejemplo es el método desarrollado por Ayala *et al.* (2004), para la identificación de la bacteria *Clavibacter michiganensis* spp. *nebraskensis*, la cual es causante de la enfermedad conocida como marchites bacteriana del maíz. En este caso se diseñaron iniciadores específicos a un segmento entre los genes de rRNA 16 S y 23 S. Dichos iniciadores se compararon con las secuencias de ADN reportadas en los bancos de genes para comprobar que solo se alinearían a la secuencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. La precisión y reproducibilidad de los ensayos de PCR depende de la experiencia técnica y experiencia de analista. La especificidad de la prueba puede ser afectada por la contaminación de la muestra durante su procesamiento. Si los iniciadores no son específicos o si las condiciones de la PCR no son óptimas, se pueden amplificar productos no específicos (Louie *et al.* 2000). Lo anterior puede guiar a la detección de falsos negativos, de la misma manera la contaminación de la muestra con inhibidores (ácidos húmicos, polifenoles, carbohidratos, etanol, etc.) de la enzima polimerasa puede ocasionar también falsos negativos. Sin embargo, esto se puede solucionar incorporando siempre controles positivos. La contaminación de la muestra con otro ADN o RNA, puede conducir a la detección de falsos positivos, esto se soluciona agregando siempre un control negativo (Ayala *et al.* 2004).

La identificación de microorganismos directamente de alimentos utilizando PCR presenta algunos retos como es la baja sensibilidad provocada por la inhibición debida a la matriz del alimento, esto puede ser parcialmente restablecido con una etapa de enriquecimiento pero se alarga el tiempo para el diagnóstico (Grant 1993). Aun con estas desventajas, la flexibilidad, automatización, rapidez y confiabilidad de las técnicas moleculares basadas en PCR son las técnicas moleculares con más aceptación en la actualidad para la detección de microorganismos en general (Ayala *et al.* 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases. La primera se realizó en el laboratorio del Departamento Académico de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, durante los meses de Enero a Abril del año 2016. La segunda fase se efectuó en el invernadero de la misma entidad, durante los meses de Octubre del 2016 a Enero del 2017.

3.2 Aislamiento e Identificación del agente causal

3.2.1 Recolección de muestras

Las muestras que se recolectaron fueron de plantas de fresa variedad Camino real de un campo del cultivo de la zona de Manchay bajo, perteneciente al Distrito de Pachacamac. Las plantas muestreadas fueron de 16 meses de edad y plantadas en el campo por medio de estolones.

Los síntomas de la enfermedad afectaron cualquier parte de la planta: tercio inferior, medio y superior. En los folíolos, en el haz se apreciaban manchas o lesiones redondeadas de color marrón oscuro con el centro de color marrón claro, rodeada por un halo de color púrpura o rojizo, con distintas dimensiones, de 2-6 mm aproximadamente. En el centro de la mancha la presencia de un área circular de coloración marrón claro y bordes de color marrón oscuro. En el envés de la hoja, las manchas con presencia de partes de color marrón oscuro y en los peciolo manchas de color marrón oscuro a negro con halos de color rojizo que después se convierten en un cancro. Las muestras de hojas y peciolo, se colocaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas, con lugar y fecha de muestreo, las cuales fueron inmediatamente transportadas al Laboratorio de Fitopatología de la UNALM.

3.2.2 Muestras en cámara húmeda

Las muestras de hojas y peciolo desinfectados se colocaron en placas descartables estériles y junto a dos motas de algodón humedecidas con agua destilada se introdujeron en una bolsa

de polipropileno, las mismas que se sellaron y se colocaron a temperatura ambiente, a 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad en el Laboratorio de Fitopatología.

3.2.3 Aislamiento y purificación del patógeno

En el laboratorio se realizó la observación, con un microscopio estereoscópico, de la superficie externa de los folíolos con síntomas de mancha foliar a fin de detectar la posible presencia de signos del agente causal. Las porciones de hojas y peciolo de las plantas enfermas, se lavaron con abundante agua a chorro continuo y luego por tres ocasiones, lavados con agua destilada estéril. En el interior de una cámara aséptica, las muestras fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante tres minutos. El material desinfectado fue cortado en trozos pequeños considerando los márgenes de avance de la lesión, luego colocados sobre papel filtro estéril, dejándolos orear hasta que estuvieran secos, para posteriormente sembrarlos en medio Papa dextrosa agar (PDA) previamente plaqueado. Todas las placas sembradas se sellaron lateralmente con parafilm y se incubaron a una temperatura de 28 – 30 °C, por 15 días.

Una vez obtenido el desarrollo de micelio del agente causal de la enfermedad, se realizaron repiques hasta obtener el cultivo puro. El aislamiento fue transferido a tubos de ensayo conteniendo PDA e incubados a 28 °C.

3.2.4 Identificación del patógeno

La identificación del patógeno se realizó en tres etapas. La primera consistió en identificar a nivel de género; para lo cual la cepa fue repicada en medio PDA y una vez obtenido el crecimiento y esporulación de las colonias, se realizaron los montajes para su observación a través del microscopio compuesto, a fin de determinar el tipo y forma de las estructuras vegetativas y de reproducción. Para la identificación se utilizó la clave de Barnett y Hunter (1972).

La segunda etapa, consistió en determinar la especie en base de las características morfológicas de las estructuras fructíferas del patógeno, se utilizó la clave Ellis (1971).

La tercera etapa consistió en realizar la confirmación de la identidad del patógeno por análisis biomolecular de ADN del hongo en el Instituto de Biotecnología Molecular de la

Universidad Nacional Agraria La Molina, según el protocolo desarrollado por Aamir *et al.* (2015), con algunas modificaciones. Los productos de PCR amplificados se enviaron a secuenciar en Macrogen USA Corp. (www.macrogenusa.com). Las secuencias se compararon en la Base de datos del Banco de Genes del National Center For Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) mediante el programa BLAST.

3.3 Determinación de las características culturales y cantidad de esporas según el medio de cultivo

El cultivo puro fue sembrado en cuatro diferentes medios, con el fin de observar el tipo de crecimiento, color de micelio, velocidad de desarrollo y esporulación. Los medios fueron: Papa dextrosa agar (PDA), Agar papa glucosa (APG), Agar jugo V8 (A-V8) y Agar extracto de malta (AEM), los cuales se prepararon y plaquearon siguiendo las respectivas indicaciones de French y Hebert (1980).

En la parte central del medio de cultivo contenido en las placas, se sembró un disco de 5 mm de diámetro conteniendo micelio del cultivo puro del hongo aislado. Las placas sembradas fueron colocadas en la incubadora a una temperatura de 28-30 °C y en alternancia de 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad; posteriormente, se midió diariamente el crecimiento de micelio y cuando la superficie del medio contenido en la placa Testigo (PDA) estuvo completamente cubierta por el micelio, se dio por terminada la prueba y se determinaron las características culturales como el tipo de crecimiento, color de micelio, velocidad de desarrollo y esporulación. Además, se determinó el Ritmo promedio de crecimiento; para ello, se dividió el incremento radial total por el tiempo (días) transcurrido (French y Hebert 1980).

Se determinó la cantidad de esporas en cada uno de los diferentes medios de cultivo. Para ello se utilizó el microscopio, la cámara de Neubauer y se guió por el procedimiento de French y Hebert (1980). Se emplearon 2 placas de cada medio con micelio activo del hongo aislado de 23 días de sembrado. Se colocó 80 ml de agua destilada en un vaso de precipitación al cual se le adicionó una gota de Tween 20, se homogenizó y con una pipeta se ubicó y disperso 20 ml de la solución sobre la superficie de micelio activo del hongo de cada placa; se friccionó ligeramente con un ansa de Kolle para desprender las conidias, se tomó el sobrenadante y se situó una gota en la cámara de Neubauer. Posteriormente se colocó

la cámara en el microscopio y se contó las conidias en la cámara de recuento, en los cuadrantes A,B,C,D y E (Cuadrantes principales). Se realizó la suma y el valor se multiplicó por el factor (2000) obteniendo el número de conidias/ml.

3.4 Prueba “*in vitro*” de Biocontroladores

En esta prueba se empleó la metodología de siembra dual, se evaluó el efecto de los productos biológicos frente el patógeno. Cada uno de los biocontroladores fue sembrado enfrentado al hongo aislado en 4 placas con medio de cultivo, se utilizó el medio Agar, papa, azúcar, peptona (APAP), para la siembra de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* y PDA para *Trichoderma harzianum* cepa T-22.

En las placas, el biocontrolador *Pseudomonas fluorescens* o *Bacillus subtilis* se ubicaron en un extremo sembrándolo mediante el método del estriado y en el otro extremo se colocó un disco de 5 mm conteniendo el micelio activo del hongo aislado. En el caso de *Trichoderma harzianum* cepa T-22, en un extremo se ubicó un disco de 5 mm de diámetro y en el otro extremo un disco de 5 mm conteniendo el micelio activo del hongo aislado. Para cada uno de los biocontroladores, se utilizaron 4 placas testigos. En un extremo se ubicó un estriado de la bacteria biocontroladora, dejando libre el otro extremo y en otra placa se situó en un extremo un disco de 5 mm de micelio del hongo biocontrolador, dejando libre el otro extremo. En una placa distinta se hizo algo semejante, se colocó en un extremo un disco de 5 mm de micelio activo del hongo aislado dejando libre el otro extremo. Todas las placas de los enfrentamientos se sellaron con parafilm y se incubaron a 28-30 °C.

En las siembras realizadas para las bacterias biocontroladoras, se observó el desarrollo de la colonia, se efectuaron las mediciones diarias y luego se comparó con los datos obtenidos en los testigos. Para el hongo biocontrolador, se observó el desarrollo del micelio y se siguió la misma metodología que se realizó para las bacterias. Se realizó el análisis de variancia y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) para los biocontroladores con el fin de establecer la significación de las variaciones respecto al crecimiento. Los productos biocontroladores utilizados, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Biocontroladores empleados en la prueba “*in vitro*” para el control del hongo aislado.

Trat.	Producto	Ingrediente activo	Dosis/ Ha	Dosis/ L.	Empresa
T1	Biosplent	<i>Bacillus subtilis</i>	2 k/ha	5 g/L	Silvestre
T2	Biodelta	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 k/ha	2.5 g/L	Silvestre
T3	T-22	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22	2 k/ha	5 g/L	Silvestre

Fuente: Fichas técnicas

La eficacia de los biocontroladores se determinó calculando el porcentaje de inhibición de la colonia usando la fórmula descrita por Pandey *et al.*, (1982).

$$PI = \frac{C-T}{C} \times 100$$

En donde:

PI = Porcentaje de Inhibición (%) T = Crecimiento radial en cada tratamiento.

C = Crecimiento radial en el testigo.

El ritmo promedio de crecimiento se determinó dividiendo el crecimiento radial de micelio entre los días transcurridos.

3.5 Prueba “*in vitro*” de fungicidas

La eficacia de cada fungicida se evaluó mediante la Prueba del alimento envenenado. Se preparó en erlenmeyer 100 ml de medio PDA que luego fue esterilizado, posteriormente cuando el medio estuvo a punto de plaquéo, dentro de una cámara aséptica, se adicionó el fungicida a la dosis correspondiente, se homogenizó, se plaquéo en 4 placas petri tamaño estándar y se dejaron hasta su solidificación. Para los testigos se utilizaron 4 placas con medio PDA, sin fungicida. Seguidamente se sembró un disco de micelio activo del hongo aislado de 5 mm diámetro en el centro de la placa y se sellaron con parafilm.

Todas las placas, incluyendo a los testigos, se incubaron a una temperatura de 28-30 °C. Se midió el crecimiento diario del micelio hasta que en las placas testigos (PDA), el micelio del patógeno, cubrió toda la superficie del medio. El ritmo promedio de crecimiento se determinó dividiendo el crecimiento radial de micelio entre los días transcurridos. Los fungicidas probados se presentan en el Cuadro N° 2. Se realizó el análisis de variancia y la

prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) para establecer la significación de las variaciones respecto al crecimiento.

La eficacia de los fungicidas se determinó calculando el porcentaje de inhibición de micelio usando la fórmula descrita por Pandey *et al.* (1982), cuya descripción se la menciona en la prueba “*in vitro*” de biocontroladores.

Cuadro 2: Fungicidas empleados en la Prueba del alimento envenenado para el hongo aislado.

Trat.	Fungicida comercial	Ingrediente activo	Dosis/Ha	Dosis/L.	Empresa
T1	Stroasil	Azoxystrobin	300 g/ha	0.75 g/L	Silvestre
T2	Zetron 720	Clorotalonil	1 L/ha	1.5 ml/L	Silvestre
T3	Difeconasil	Difenoconazole	200-300 ml/ha	0.1-0.15 ml/L	Silvestre
T4	Mertect	Tiabendazol	600 ml/ha	1.5 ml/L	Syngenta
T5	Aliette	Fosetil aluminio	10-1.2 kg/ha	3 g/L	Bayer
T6	Testigo	PDA	-----	39 g	Difco

Fuente: Fichas técnicas

3.6 Fase de Invernadero

3.6.1 Preparación del sustrato y trasplante de las plántulas

Para la preparación del sustrato se empleó compost, arena y tierra de chacra en proporción 1:1:1. Todo se mezcló de una forma homogénea y fue colocado en bolsas de polipropileno, para su esterilización y luego vertirlo en los recipientes de polietileno de 1 Kg de capacidad para el trasplante. Las plántulas de fresa de 3 semanas de edad se trasladaron al invernadero, en Octubre del 2016, desde un campo de la zona de Manchay bajo. Una vez plantados los plantines se les dio riego constante por tres semanas hasta que enraizaran. Se trasplantaron un total de 130 plantines, de los cuales para la prueba de patogenicidad se usaron 10 plantas (5 para inocular y 5 para testigo sin inocular). Para aplicar los tratamientos se emplearon 120 plantas, cada tratamiento constó de 4 repeticiones y cada repetición con 3 plantas (10 x 4 x 3= 120 plantas).

3.6.2 Obtención de Inóculo

El aislamiento puro se sembró en medio APG, se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a una temperatura +- 28-30 °C con alternancia de 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad por 28 días. Luego que el micelio del hongo aislado esporuló, se obtuvo una suspensión de inóculo con una concentración $1,8 \times 10^4$ propágulos por ml, siguiendo la metodología que se empleó para determinar la cantidad de esporas según el medio de cultivo indicado (French y Hebert 1980).

3.6.3 Prueba de Patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó sobre la variedad Camino real, cuando las plantas tuvieron 5 semanas de edad, en condiciones de invernadero. La inoculación consistió en asperjar una suspensión de esporas con una concentración de 1.8×10^4 conidias/ml en cantidad de 8-10 cc/planta, en todo el área foliar de cada una de las plantas. Se asperjaron 5 plantas y las otras 5 plantas testigos, solo se les asperjó agua; luego, cada una de las plantas se cubrió durante 2 días con una bolsa de polipropileno con orificios, a fin de que hubiese la humedad necesaria y se desarrollen los síntomas de la enfermedad.

3.6.4 Reaislamiento del patógeno

De las plantas inoculadas que mostraban síntomas de mancha foliar, se tomaron muestras de hojas con lesiones y peciolo con síntomas de cancro, de los cuales se extrajeron porciones de entre el límite del tejido necrosado y el sano, se desinfectaron, orearon y sembraron en medio APG. Posteriormente, se realizó la purificación de micelio y la colonia desarrollada se colocó a alternancias de 12 horas de luz artificial y oscuridad, para favorecer la esporulación.

3.6.5 Inoculación de las plantas de fresa en invernadero

Plantas de fresa de la variedad Camino Real, de 5 semanas de edad, fueron inoculadas por aspersión foliar, siguiendo la misma metodología usada en la prueba de patogenicidad; se les dio riego según la necesidad a todas las plantas de fresa de cada tratamiento, incluyendo al testigo. La temperatura y humedad relativa, se registró diariamente a las 17:00 PM, con ayuda de un termómetro digital que fue colocado en el área de ensayo.

3.7 Diseño estadístico

El diseño estadístico fue un Diseño completo al azar (DCA), con cuatro repeticiones y cada repetición con 3 submuestras, con un total de 9 tratamientos y su respectivo testigo (10 x 4 x 3= 120 plantas). Se probaron los mismos fungicidas utilizados en la fase de laboratorio (Cuadro N° 1 y 2), la aplicación se realizó en horas de la tarde, durante las horas de menor temperatura del día.

3.8 Tratamientos, dosis y frecuencia de aplicación de biocontroladores y fungicidas

La dosis de los productos que se emplearon fueron las recomendadas por la casa comercial, según el producto (Cuadro N° 3). La aplicación de los productos, se efectuó por aspersión dirigida al área foliar. Los productos formulados tanto en polvo como en líquido fueron disueltos en agua.

Cuadro 3: Tratamientos y dosis de aplicación que se emplearon para el control de la mancha foliar de fresa en invernadero

Trat.	Producto	Ingrediente activo	Dosis/ha	Dosis/L.	Frecuencia aplicación (días)	Empresa
T1	Biosplent	<i>Bacillus subtilis</i>	2 kg/ha	5 g/L	7	Silvestre
T2	T-22	<i>T. harzianum</i> cepa T-22	2 kg/ha	5 ml/L	7	Silvestre
T3	Biodelta	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 kg/ha	2.5 g/L	7	Silvestre
T4	Stronsil	Azoxystrobin	300 g/ha	0.75 g/ L	7	Silvestre
T5	Zetron 720	Clorotalonil	1 L/ha	1.5 ml /L	7	Silvestre
T6	Difeconasil	Difenoconazole	200-300 ml/ ha	0.1-0.15 ml/L	7	Silvestre
T7	Mertect	Tiabendazol	-----	1.5 ml/L	7	Syngenta
T8	Aliette	Fosetil aluminio	10-1.2 kg/ha	3 g/L	7	Bayer
T9	T. inoculado	-----	-----	-----	7	-----
T10	T. sin inocular	-----	-----	-----	7	-----

Fuente: Fichas técnicas

La aplicación de productos biológicos y químicos se realizó pasados los 5 días después de la inoculación. Se realizaron 3 aplicaciones de productos biológicos y químicos, cada 7 días.

3.9 Evaluación de los biocontroladores y fungicidas

Para determinar el efecto de cada uno de los fungicidas y biocontroladores, en el control de mancha foliar, antes de cada aplicación se evaluó el porcentaje de enfermedad usando la escala de evaluación descrita en el Cuadro N° 4. La planta se consideró 100 % y se empezó desde cero de infección, conforme avanzó la enfermedad foliar se fue anotando los porcentajes.

Cuadro 4: Escala de evaluación para determinar la severidad de la Mancha foliar en fresa (*Fragaria ananassa*).

Porcentaje	Características
0%	Toda la planta sana
> 0% - 5%	Aparición manchas pequeñas
> 5% - 25%	Manchas que pueden alcanzar el 25% parte de la planta
> 25% - 50%	Manchas que pueden alcanzar el 50% parte de la planta
> 50% - 75%	Manchas que pueden alcanzar las 75% partes de la planta
75% - 100 %	Manchas que pueden llegar afectar toda la planta

Fuente: Elaboración propia del autor

Se evaluaron 12 plantas por tratamiento (3 plantas por cada repetición). Las plantas fueron evaluadas según la frecuencia de aplicación (7 días), con la finalidad de evaluar la eficiencia de cada tratamiento (Fungicida y Biocontrolador).

Con los datos obtenidos de cada tratamiento, se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), haciendo uso de la formula descrita por Bautista *et al.* (2009).

$$ABCPE = \sum \left\{ \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (t_{i+1} - t_i) \right\}$$

Donde: Y_i = Cantidad de la enfermedad en el día T.

i = Numero de evaluaciones.

t_i = Tiempo del rango de evaluación.

Con los datos del ABCPE, se realizó el análisis de variancia utilizando el Programa estadístico SAS 8.0; posteriormente, se procedió a realizar la prueba de comparación de Tukey a un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$), para establecer las diferencias entre los tratamientos.

3.10 Ensayo comparativo de crecimiento radial de *Corynespora cassiicola* en condiciones de invernadero y laboratorio

El aislamiento de *Corynespora cassiicola* fue sembrado en 8 placas conteniendo PDA. Se sellaron con parafilm, se las cubrió con papel, se colocaron en una bolsa de polipropileno y se ubicó 4 placas en la incubadora a una temperatura de 28 °C y las 4 restantes se las ubicó en el invernadero, con la finalidad de observar el desarrollo de la colonia en ambos ambientes. La temperatura y humedad relativa se registró diariamente a las 17:00 PM, con ayuda de un termómetro digital que fue colocado en el área de ensayo. Se realizó la medición radial de la colonia y los resultados se los proceso en un Análisis de variancia con el objetivo de determinar si hubo diferencias en el crecimiento de la colonia entre los dos ambientes.

3.11 Identificación Molecular

3.11.1 Extracción de ADN del patógeno

La extracción de ADN del aislamiento de hongo se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina, según el protocolo desarrollado por Aamir *et al.* (2015).

La cepa del hongo se cultivó en erlenmeyers de 250 ml durante 5 días, en medio líquido PD (62.5 g papa, 5 g dextrosa) a 30 °C. La masa fúngica se extrajo con la ayuda de una espátula fina, luego se filtró con una jeringa de 10 ml que contenían lana de vidrio para retener la masa. La masa fúngica o micelio, previamente congelado, se pulverizó con nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y pilón, luego se tomó de 60 a 80 mg en tubos Eppendorf de 2 ml al cual se le agregó el tampón de lisis (100 mM Tris HCl [pH 8,0] 50 mM de EDTA, 3 % de SDS), se homogenizó mediante el equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, EE.UU.) a 6 M/S por 60 segundos. El homogenizado se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, luego se le agregó 2 uL de RNasa a una concentración de 10 mg/mL y se incubó a 37 °C durante 15 min, cumplido el tiempo

se añadió 2 uL de fenol, cloroformo y alcohol isoamilico (25:24:1), luego de mezclado se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. La capa acuosa se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añadió un igual volumen de etanol al 100 %; posteriormente, el precipitado se guardó a -20 °C durante 30 minutos, pasado ese tiempo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento de ADN se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. El alcohol se evaporó al aire libre y se obtuvo el sedimento de ADN, este luego se diluyó con agua ultrapura o tampón TAE 1X. La purificación de DNA se realizó mediante el Kit Zymo research “DNA Clean & Concentrator™-5”. Para las reacciones de PCR se utilizaron los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y las condiciones de PCR fueron: La mezcla de reacción consistió en: amortiguador para PCR (1 X), iniciadores ITS1 e ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 mL. La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador (TECHNER-312, Minnesota, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 72 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (Aamir *et al.* 2015).

Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y los productos de PCR amplificados fueron secuenciados en MacroGen Usa Corp. (www.macrogenusa.com). Las secuencias se compararon en la base de datos del Banco de Genes del National Center For Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) mediante el programa BLAST. Al final, se elaboró un filograma con el software Fig Tree 1.4.3

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento e identificación del agente causal

4.1.1 Muestras en cámara húmeda

A los 15 días de colocadas en incubación, sobre los síntomas de mancha foliar se observó el desarrollo de micelio, el cual formo conidióforos solitarios monopodiales, con conidias solitarias y en cadenas, que en conjunto formaba a manera de una capa afelpada que cubría toda el área de la mancha foliar (Figura N° 1).

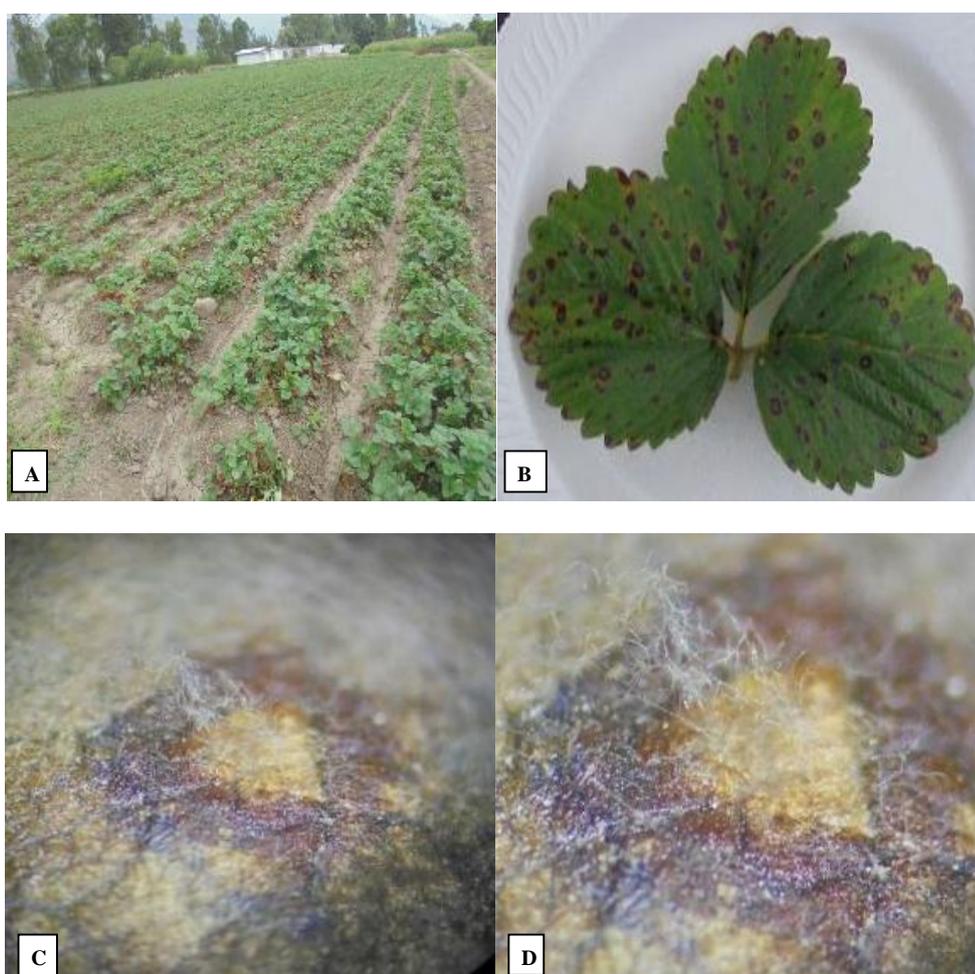


Figura 1: Mancha foliar. A) Campo de fresa afectado por mancha foliar. B) Hoja con síntoma de mancha foliar. C) Síntoma de mancha foliar a los 15 días de incubación en cámara húmeda. D) Estructuras del patógeno desarrolladas sobre el síntoma de mancha foliar.

4.1.2 Aislamiento y purificación del patógeno

A los cuatro días de siembra en medio PDA, la colonia presentó abundante micelio de tipo algodonoso y de color verde claro; a los 13 días de siembra, la colonia desarrolló micelio algodonoso y de color marrón oscuro. (Figura N° 2).

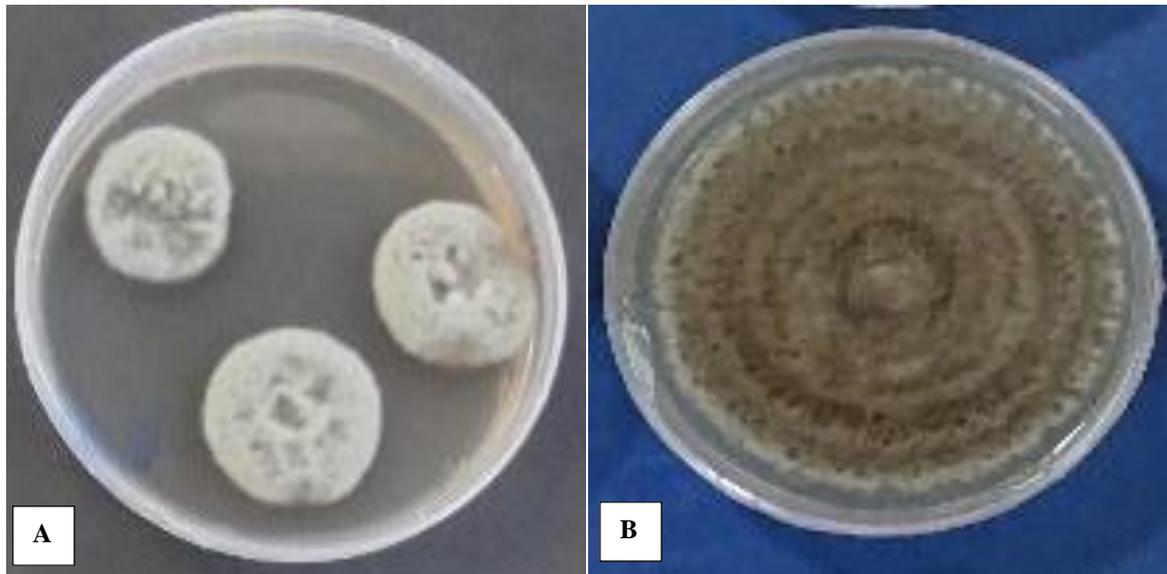


Figura 2: Muestras de hoja sembradas en medio PDA. A) Micelio del hongo aislado a los cuatro días después de la siembra. B) Cultivo puro en medio PDA a los 13 días de siembra.

4.1.3 Identificación del patógeno

Las micro preparaciones observadas a través del microscopio compuesto permitió observar la presencia de micelio, conidióforos y conidias de pigmentación oscura. El conidióforo cilíndrico, simple, corto o largo, la conidia exógena, recta o curva, de forma elipsoidal u obclavada, tipo fragmospora, solitaria con pared gruesa, con ápice redondeado, sin apéndice apical y que nacen del conidióforo a partir de un poro apical terminal en forma individual o en cadenas cortas y de formación acropétala. En base a estas características, el hongo correspondía al género *Corynespora*, según la clave de Barnett y Hunter (1972).

Para determinar las dimensiones de las estructuras, se leyeron 50 conidióforos y 50 conidias. Para el caso de los conidióforos se midió el largo, diámetro y se contó el número de proliferaciones; y para el caso de las conidias, el largo, diámetro, base truncada y se observó el número de pseudoseptas. Los resultados de las mediciones realizadas se observa en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Dimensiones de las estructuras fructificantes del aislamiento de *Corynespora* sp. obtenidos a partir de manchas foliares en hojas de fresa.

Rangos	Conidióforo			Conidia			
	Largo (μ)	Diámetro (μ)	N° Proliferaciones	Largo (μ)	Diámetro (μ)	Base truncada	N° Pseudoseptas
Rango mínimo	111	5	3	41	9	4	4
Rango máximo	363	11	9	116	12	5	8
Promedio	164	6	5	59	10	5	5
RANGOS (Ellis, 1971)	(110-850) (μ)	(4-11) (μ)	(2-9) (μ)	(40-20) (μ)	(9-22) (μ)	(4-8) (μ)	(4-20)

En base a las dimensiones de las estructuras fructificantes, a las características macroscópicas y microscópicas antes descritas y utilizando las claves de identificación de Barnett y Hunter (1972), Ellis (1971), el hongo corresponde al género *Corynespora* sp., con características semejantes a la especie *Corynespora cassiicola* (Figura N° 3).



Figura 3: Estructuras de fructificación observadas a través del microscopio: A) Conidióforo y conidia en formación. B) Conidia con septas transversales.

4.2 Determinación de las características culturales y cantidad de esporas según el medio de cultivo

En la mayoría de los medios de cultivo, determinado a los 23 días después de la siembra (Figura N° 4), se observa la predominancia del color gris a marrón, en algunos con presencia de halos de color blanco y otros verde claro con los bordes del mismo color del micelio. El tipo de crecimiento para todos los medios fue uniforme y algodonoso, en el medio PDA la

colonia presentaba color verde oscuro con halo de color blanco; en APG, verde oscuro con halo de color verde claro hacia los extremos; en A-V8, verde oscuro y en el medio AEM, verde oscuro con halo de color blanco y verde claro. En el medio de cultivo A-V8 se obtuvo el mayor valor de Ritmo promedio de crecimiento en 9 días y en el medio APG se obtuvo la mayor esporulación a los 28 días de sembrado (Cuadro N° 6) (Figura N° 5 y 6), llegando a 3,9 mm/día y fue el que permitió mayor crecimiento micelial, seguido de los medios AEM, PDA y APG (Anexo N° 3 y 4).

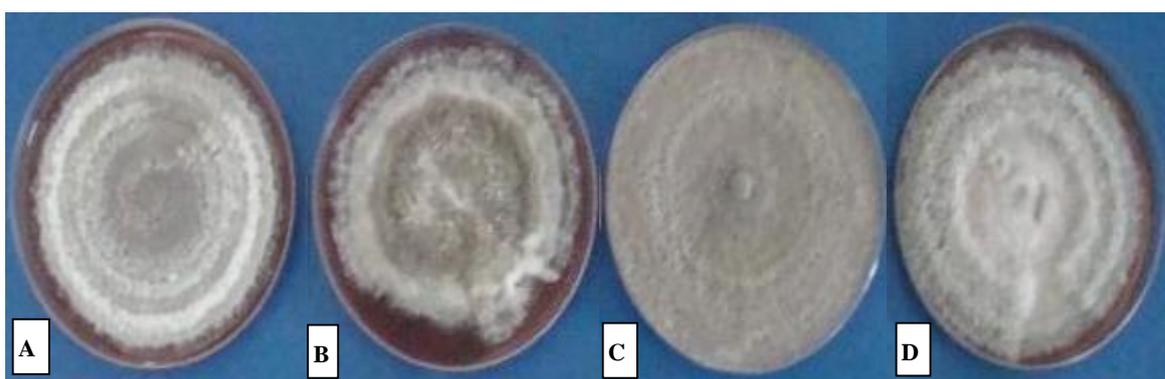


Figura 4: *Corynespora cassiicola* sembrado en diferentes medios de cultivo: (A) PDA, (B) APG, (C) A-V8, (D) AEM, a los 23 días después de la siembra.

Cuadro 6: Crecimiento radial de micelio, Ritmo promedio de crecimiento (mm) y esporulación de *Corynespora cassiicola* en diferentes medios de cultivo.

Medios de Cultivo	Crecimiento radial de micelio (mm)	Ritmo promedio de Crecimiento de micelio (mm/día)	Cantidad de Esporas/ml	Prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)
APG	38,1	2,38	$6,8 \times 10^4$	A
PDA	40,0	2,50	$1,2 \times 10^4$	B
A-V8	35,1	3,90	$1,8 \times 10^3$	C
AEM	38,2	2,55	$1,2 \times 10^3$	C

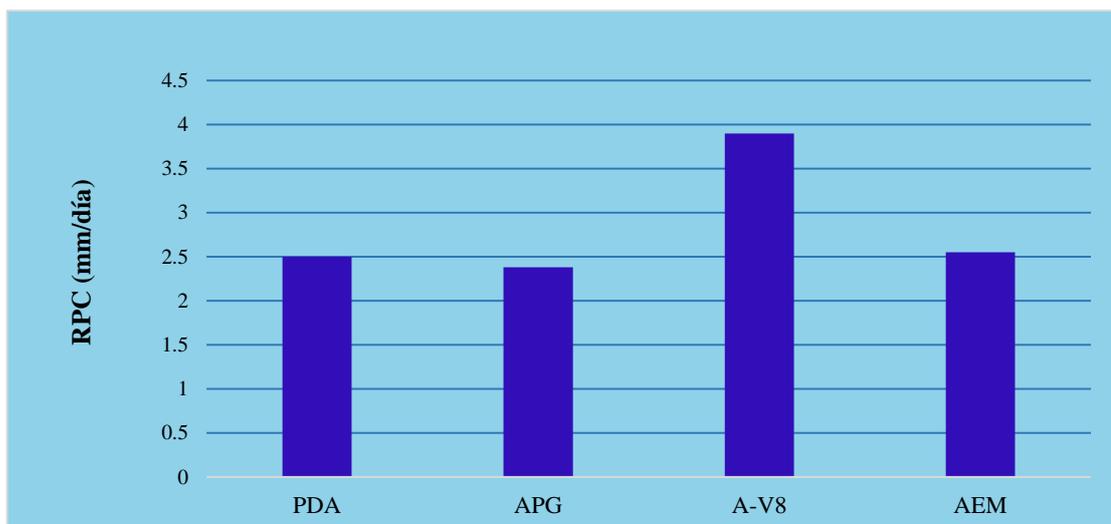


Figura 5: Ritmo promedio de crecimiento de micelio (RPC) (mm/día) de *Corynespora cassiicola* en diferentes medios de cultivo, a los 16 días después de la siembra.

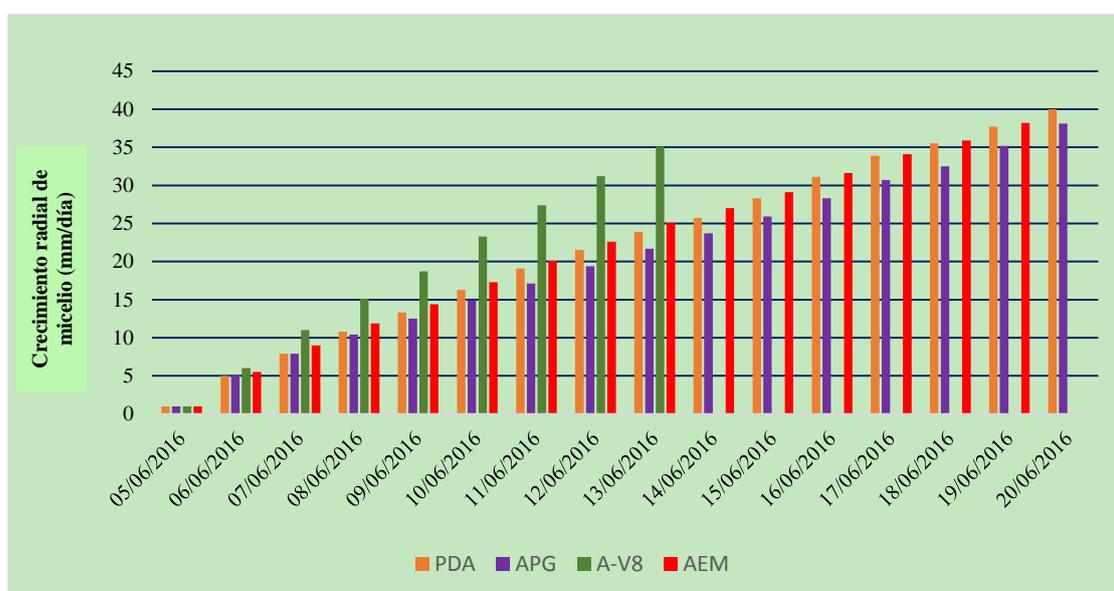


Figura 6: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de *Corynespora cassiicola* en diferentes medios de cultivo, a los 16 días después de la siembra.

El análisis de variancia para el crecimiento diario de *Corynespora cassiicola* en diferentes medios de cultivo, indica que existe alta significancia entre los tratamientos con un coeficiente de variabilidad de 4.78 % (Cuadro N° 7) y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) muestra que el medio A-V8 resultó ser diferente de los demás medios a un nivel del 95 % de confiabilidad (Cuadro N° 8).

Cuadro 7: Análisis de variancia para el crecimiento diario de micelio de *Corynespora cassiicola* en diferentes medios de cultivo.

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Prob
Tratamientos	3	0.00060369	0.00020123	108.53	<.0001 **
Error	12	0.00002225	0.00000185		
Total	15	0.00062594			

C.V.: 4.78 %

$\alpha = 0.05$

** = Altamente significativo

Cuadro 8: Prueba de comparación de medias Tukey (0.05) para el crecimiento diario de micelio de *Corynespora cassiicola* en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Medio de cultivo	Promedio mm/día	Nivel de significación
T2	A-V8	0.0390000	A
T3	AEM	0.0257500	B
T0	PDA	0.0252500	B
T1	APG	0.0237500	B

4.3 Prueba “*in vitro*” de Biocontroladores

En la prueba del cultivo dual de *Corynespora cassiicola* frente a *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* (Cuadro N° 9, Figura N° 7 y 8), se puede apreciar que hubo diferencia en cuanto al crecimiento radial (mm) entre los tratamientos con respecto al testigo; así mismo, se puede observar que el biocontrolador *P. fluorescens* tuvo el mayor ritmo promedio de crecimiento diario con 3,58 mm con respecto a *B. subtilis* que tuvo 3,07 mm. De la misma manera este cuadro nos indica que *B. subtilis* tuvo un mayor porcentaje de inhibición de micelio del patógeno con 24,6 % con respecto a *P. fluorescens* que obtuvo un 12 % de inhibición (Anexo 10). El análisis de variancia para el porcentaje de Inhibición de micelio de *C. cassiicola* frente a *P. fluorescens* y *B. subtilis* indica que existe alta significancia entre los tratamientos con un coeficiente de variabilidad de 7.57 % (Cuadro N° 10) y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) muestra que el Tratamiento 2 (*C. cassiicola*-*B. subtilis*) es diferente de los demás tratamientos a un nivel del 95 % de confiabilidad (Cuadro N° 11).

Cuadro 9: Cultivo dual de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassiicola*.

Cultivo dual	Crecimiento radial de micelio (mm)	Ritmo promedio de crecimiento de micelio (mm)	Porcentaje de Inhibición de micelio (%)
<i>Bacillus subtilis</i> frente a <i>C. cassiicola</i>	33.8	3.07	24.6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>C. cassiicola</i>	39.4	3.58	12
<i>C. cassiicola</i> (Testigo-PDA)	44.8	4.07	0

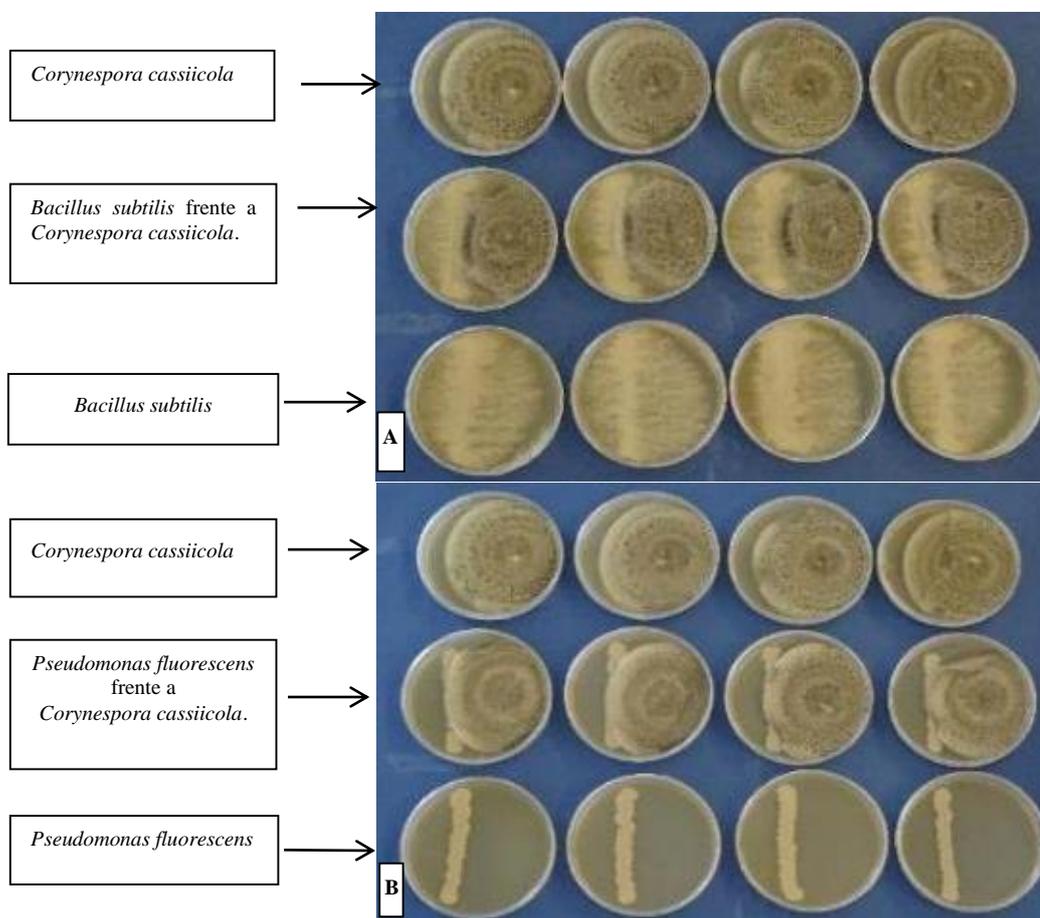


Figura 7: Cultivo dual a los 8 días del enfrentamiento. A) *Bacillus subtilis*. B) *Pseudomonas fluorescens*.

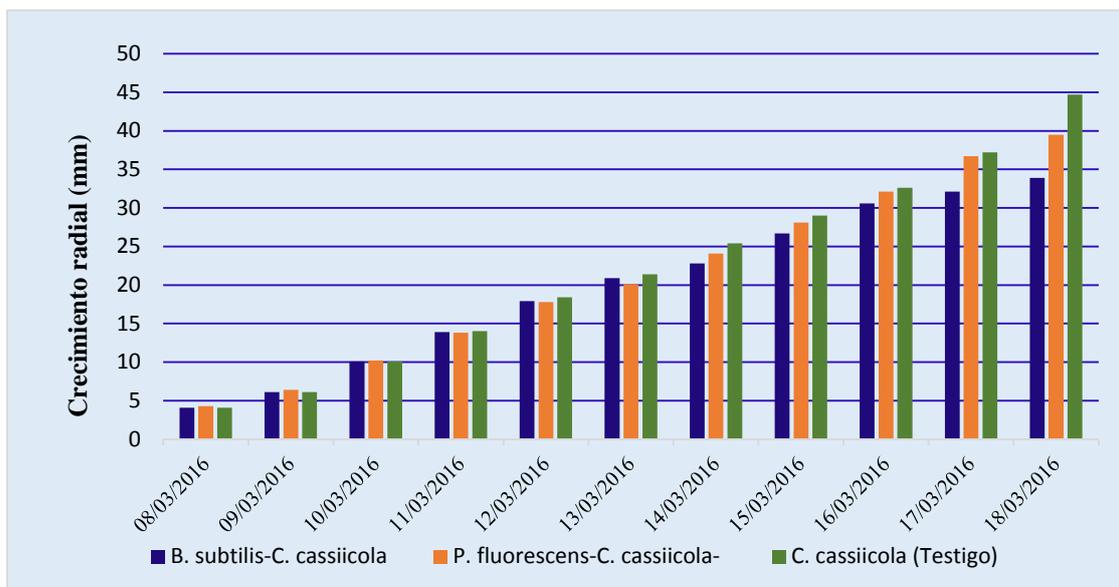


Figura 8: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassiicola*.

Cuadro 10: Análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassiicola*.

Fuente de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado	Prob.
Tratamientos	2	0.12005000	0.06002500	697.06	<.0001 **
Error	9	0.00077500	0.00008611		
Total	11	0.12082500			

C.V.=7.57 %

$\alpha = 0.05$

** = Altamente significativo

Cuadro 11: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el Porcentaje de Inhibición de micelio de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassiicola*.

Trat.	Descripción	Promedio	Nivel de significación
T2	<i>B. subtilis</i> - <i>C. cassiicola</i>	0.245000	A
T1	<i>P. fluorescens</i> - <i>C. cassiicola</i>	0.122500	B
T0	Testigo	0.000000	C

El biocontrolador *Trichoderma harzianum* cepa T-22, presentó un ritmo promedio de crecimiento de 2,39 mm/día con respecto al testigo que obtuvo 2,87 mm/día. Así mismo, se puede observar que T-22 inhibe el crecimiento de *C. cassiicola*, debido a que obtuvo un 41.8 % de inhibición de micelio, con relación al testigo que obtuvo 0.0 % (Anexo 14 y 15, Cuadro N° 12) (Figura N° 9 y 10). El análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *C. cassiicola*, indica que existe alta significancia entre los tratamientos con un coeficiente de variabilidad de 9.32 % (Cuadro N° 13) y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$), muestra que el Tratamiento 1 (*Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *C. cassiicola*) resultó ser diferente de los demás tratamientos, a un nivel del 95 % de confiabilidad (Cuadro N° 14).

Cuadro 12: Cultivo dual de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassiicola*.

Cultivo dual	Crecimiento Radial de micelio (mm)	Ritmo promedio de Crecimiento de micelio (mm/día)	Porcentaje de inhibición de micelio (%)
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>C. cassiicola</i>	23.3	2.39	41.8
<i>C. cassiicola</i> (Testigo)	40.1	2.87	0

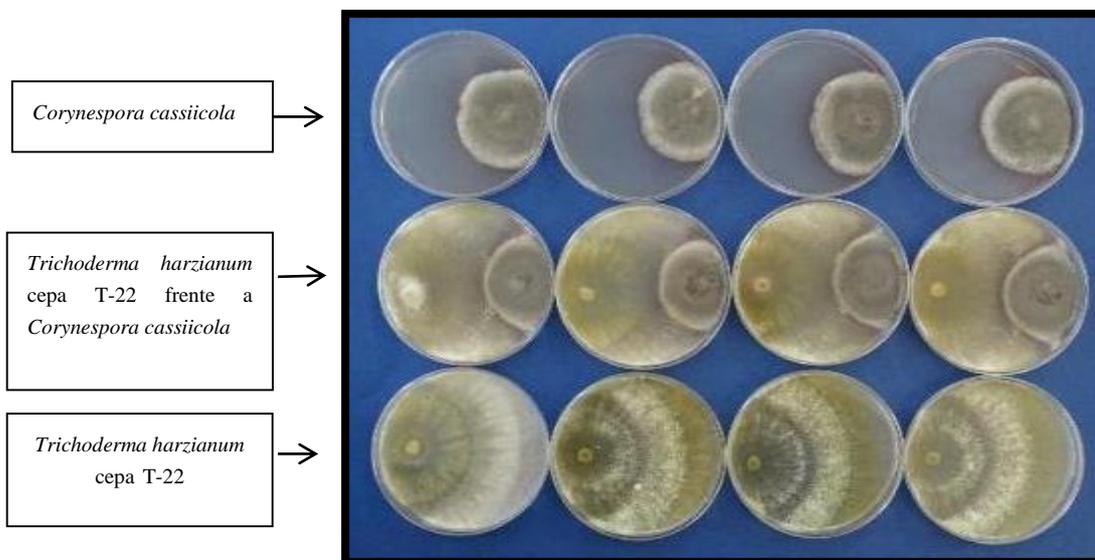


Figura 9: Cultivo dual de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassiicola* a los 5 días de enfrentamiento.

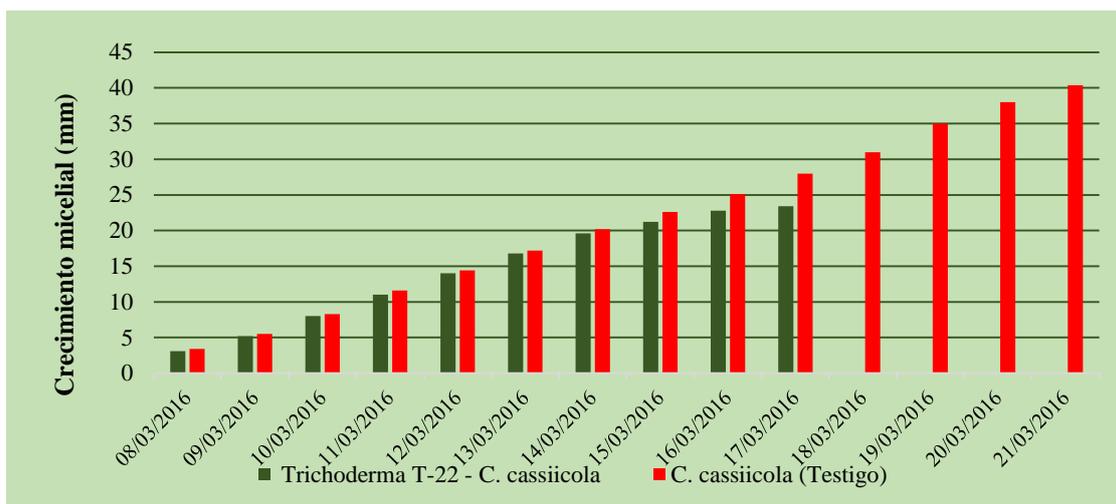


Figura 10: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassiicola*.

Cuadro 13: Análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassiicola*.

Fuente de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado	Prob.
Tratamientos	1	0.34861250	0.34861250	919.42	<.0001**
Error	6	0.00227500	0.00037917		
Total	7	0.35088750			

C.V.: 9.32

$\alpha = 0.05$

** = Altamente significativo

Cuadro 14: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el Porcentaje de Inhibición de micelio de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassiicola*.

Tratamiento	Descripción	Promedio	Nivel de significación
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>Corynespora cassiicola</i> .	0.41750	A
T0	(<i>Corynespora cassiicola</i> -Testigo)	0.00000	B

4.4 Prueba “in vitro” de fungicidas

En el Cuadro N° 15, se puede observar el crecimiento radial (mm) de *Corynespora cassiicola*, frente a los fungicidas evaluados (Figura N° 11 y 12). Los fungicidas Tiabendazol (Mertect-T4) y Fosetil aluminio (Aliette-T5), obtuvieron el mayor porcentaje de inhibición

de micelio de *C. cassiicola* con 96.32 % y 100 % respectivamente. Los fungicidas Azoxystrobin (Stronsil-T1), Clorotalonil (Zetron 720-T2) y Difeconazol (Difeconasil-T3), inhibieron en un 30 y 69 % respectivamente el desarrollo de la colonia (Figura N° 13).

En el análisis de variancia para el porcentaje de inhibición de micelio de *C. cassiicola* en la prueba del alimento envenenado, indica que existe alta significancia entre los tratamientos, con un coeficiente de variabilidad de 4.69 % (Cuadro N° 16) y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) muestra que los fungicidas Fosetil Aluminio y Tiabendazol resultaron ser diferentes de los demás tratamientos, a un nivel de 95 % de confiabilidad (Cuadro N° 17).

Cuadro 15: Porcentaje de Inhibición de micelio de *Corynespora cassiicola* en la prueba del alimento envenenado.

Trat.	Fungicida comercial	Ingrediente activo	Dosis/L.	Crecimiento radial (mm)	Inhibición de micelio (%)
T1	Stronsil	Azoxystrobin	0.75 g	36.22	30.50
T2	Zetron 720	Clorotalonil	1.5 ml	25.16	51.00
T3	Difeconasil	Difeconazol	0.1-0.15 ml	11.44	68.41
T4	Mertect	Tiabendazol	1.5 ml	0.94	96.32
T5	Aliette	Fosetil aluminio	3 g	0	100
T6	PDA (Testigo)	PDA	39 g	36.22	0

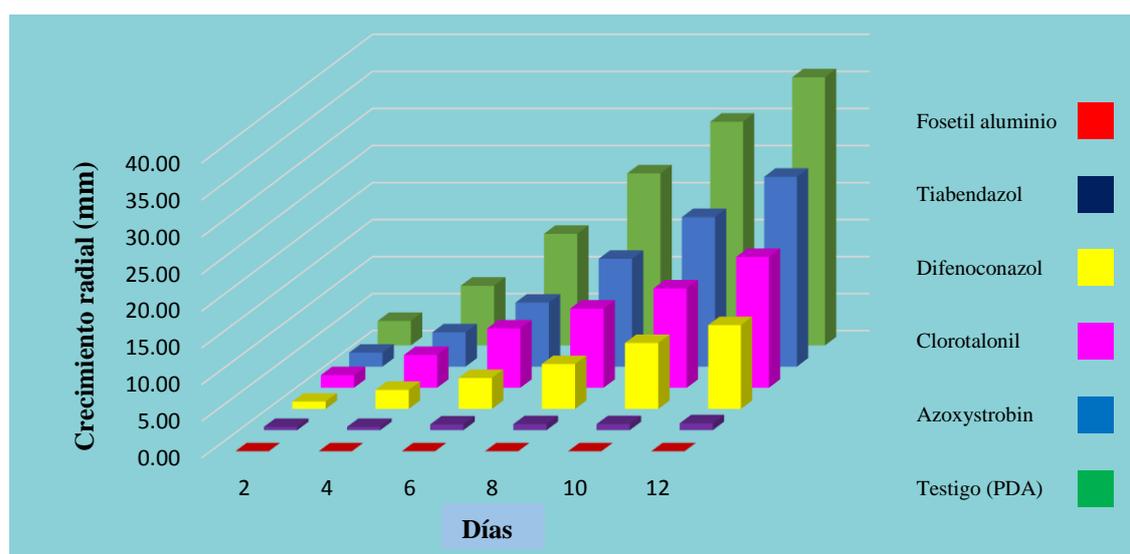


Figura 11: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de *Corynespora cassiicola* frente a fungicidas evaluados.

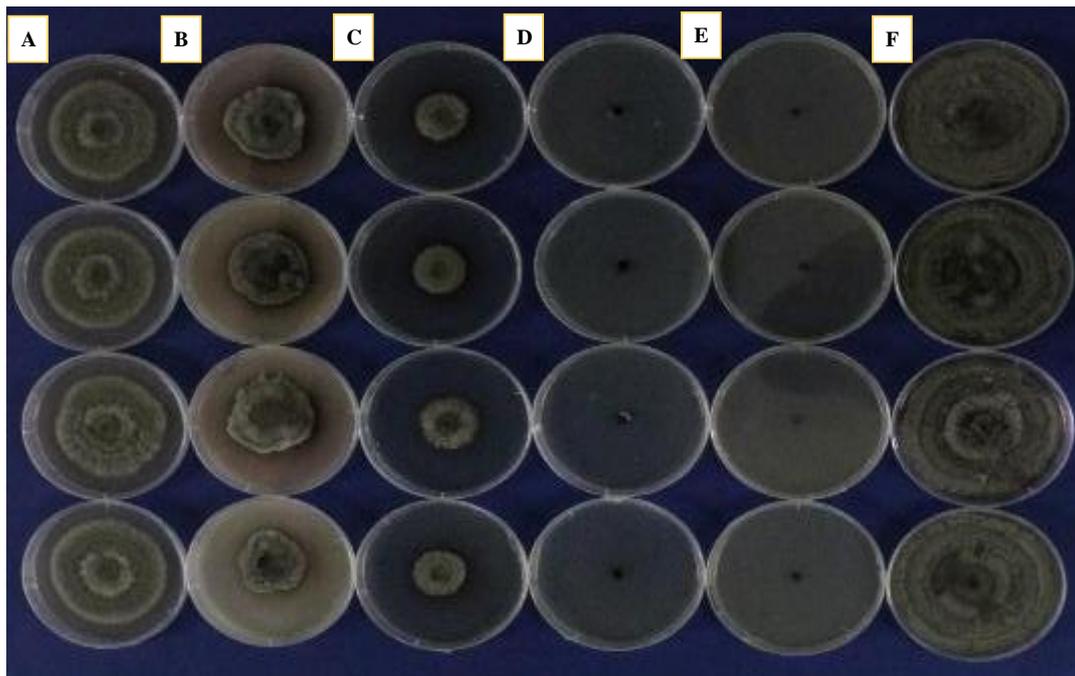


Figura 12: Alimento envenenado para *Corynespora cassiicola* a los 11 después de la siembra. A) Azoxystrobin (Stronsil). B) Clorotalonil (Zetron 720). C) Difenoconazol (Difeconasil). D) Tiabendazol (Mertect). E) Fosetil Aluminio (Aliette). F) Testigo (PDA).

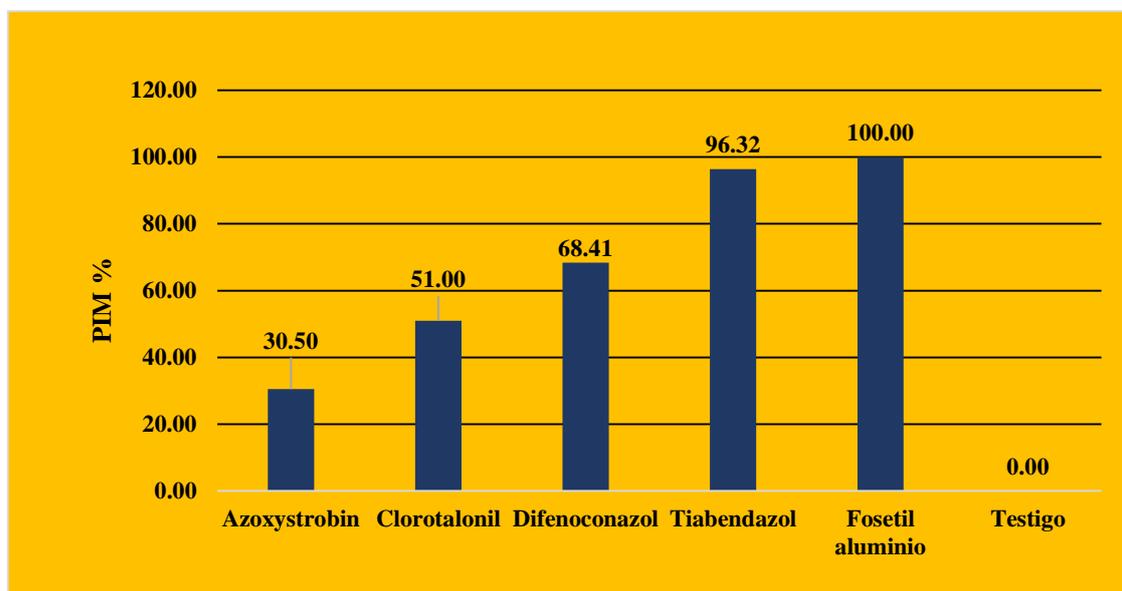


Figura 13: Porcentaje de inhibición de micelio (PIM) de *Corynespora cassiicola* frente a fungicidas evaluados.

Cuadro 16: Análisis de variancia para el Porcentaje de Inhibición de micelio de *Corynespora cassiicola* en la prueba del alimento envenenado.

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Prob.
Tratamientos	5	30429.66337	608.593.267	810.57	< 0001 **
Error	18	135.14753	750.820		
Total	23	30564.81090			

C.V.: 4.69 %

$\alpha = 0.05$

** = Altamente significativo

Cuadro 17: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de inhibición de micelio de *Corynespora cassiicola* en la prueba del alimento envenenado.

Tratamiento	Fungicida comercial	Ingrediente activo	Promedio	Nivel de significación
T5	Aliette	Fosetil aluminio	100.000	A
T4	Mertect	Tiabendazol	97.893	A
T3	Difeconasil	Difeconazol	68.405	B
T2	Zetron 720	Clorotalonil	53.053	C
T1	Stronsil	Azoxystrobin	30.508	D
T6	PDA (Testigo)	Papa, dextrosa, agar	0.000	E

4.5 Fase de Invernadero

4.5.1 Prueba de patogenicidad

Las plantas de fresa después de 3 días de haber sido inoculadas con *Corynespora cassiicola*, comenzaron a mostrar síntomas a nivel de hoja superior e inferior, joven o madura; posteriormente pasados los 4-5 días, esporádicos peciolos presentaron infección. En hojas jóvenes y maduras, se mostraron puntos y manchas circulares de color marrón de 2 hasta 6 mm, las mismas que presentaban en el centro un círculo de color marrón claro, las cuales conforme pasaron los días se fueron agrandando hasta coalescer con otras (Figura N° 14).



Figura 14: Síntomas de mancha foliar en el haz de hojas de fresa.

Además, alrededor de las manchas se presentó un halo grueso de color amarillo, el cual se expandía cuando se iban juntando y posteriormente originaban necrosis en la hoja (Figura N° 15 y 16).

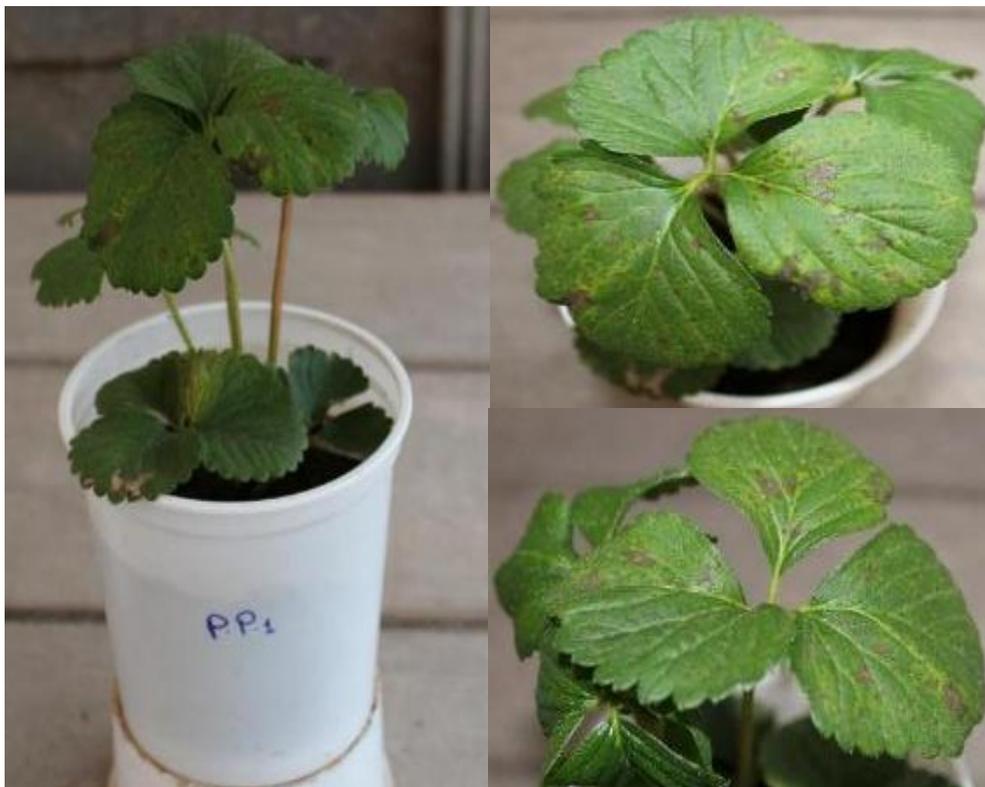


Figura 15: Planta de fresa mostrando las manchas necróticas a los 4 días después de inoculadas con *Corynespora cassicola*.



Figura 16: Planta de fresa mostrando las manchas necróticas y amarillamiento a los 11 días después de inoculadas con *Corynespora cassiicola*.

En el peciolo, la enfermedad se presentó como un pequeño punto de color negro rodeado de un halo rojizo, el cual se iba agrandando hasta convertirse en un cancro y posteriormente como consecuencia causaba la caída de la hoja (Figura N° 17). Las plantas testigos no presentaron síntomas de mancha foliar (Figura N° 18).



Figura 17: Necrosis en el peciolo de hoja de fresa originada por *Corynespora cassiicola*.



Figura 18: Planta de fresa Testigo (sin inocular) sin síntomas de mancha foliar.

4.5.2 Reaislamiento del patógeno

El micelio que se desarrolló de los síntomas de mancha foliar en hoja y el cancro fueron iguales, ambos desarrollaron micelio algodonoso de color gris a marrón oscuro (Figura N° 19). Pasados los 18 días después de la siembra se realizaron los montajes respectivos y las mediciones del largo, diámetro y proliferaciones del conidióforo, así como el largo, diámetro, longitud de la base trunca y número de pseudoseptas de la conidia (Cuadro N° 18).

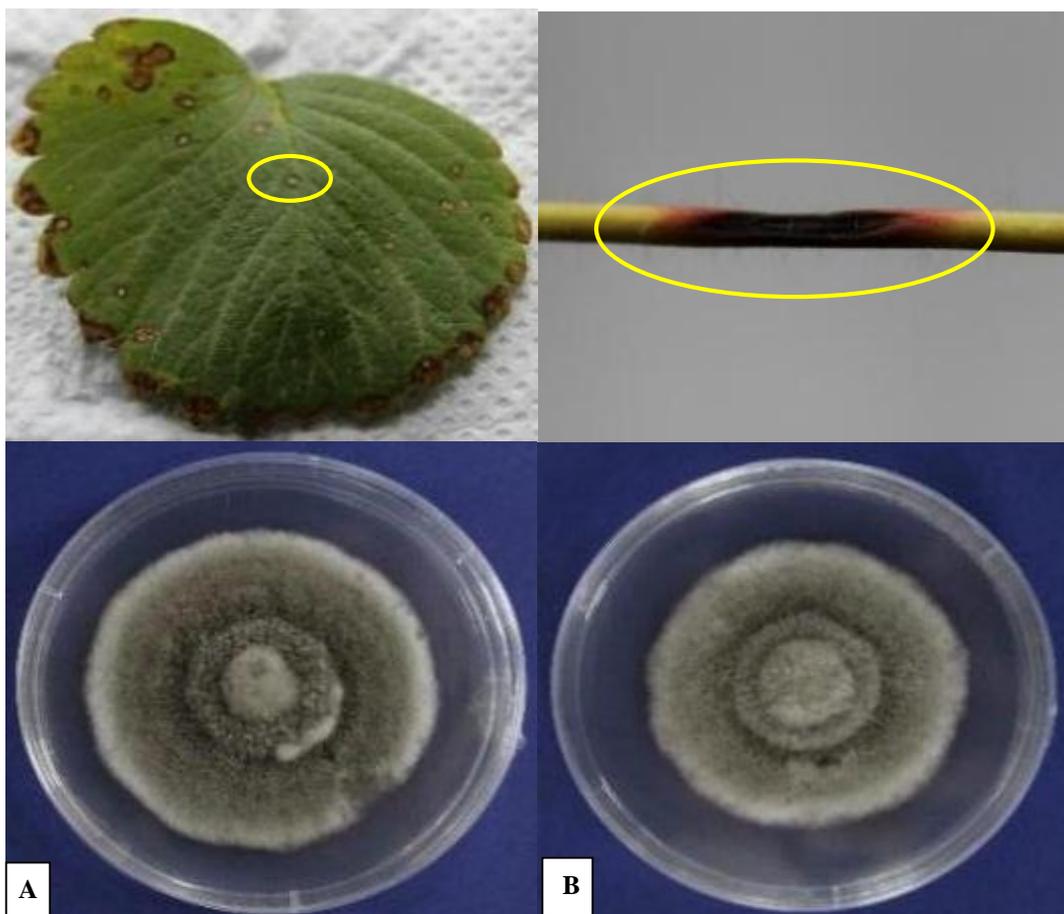


Figura 19: Colonias desarrolladas en medio APG de los síntomas de mancha foliar en hoja (A) y peciolo (B) a los 7 días después de la siembra.

Cuadro 18: Promedios de medidas del conidióforo y conidia del reaislamiento obtenidos a partir de las plantas de fresa en la prueba de patogenicidad.

Rangos	Conidióforo			Conidia			
	Largo (μ)	Diámetro (μ)	N° Proliferaciones	Largo (μ)	Diámetro (μ)	Base truncada	N° Pseudoseptas
Rango mínimo	118.58	4.84	2	43.56	6.66	3.63	3
Rango máximo	219.01	6.05	6	82.28	10.89	4.84	7
Promedio	167.22	5.28	4.16	57.79	9.32	4.65	4.28
RANGOS (Ellis, 1971)	(110-850) (μ)	(4-11) (μ)	(2-9) (μ)	(40-220) (μ)	(9-22) (μ)	(4-8) (μ)	(4-20)

4.5.3 Evaluación de la eficiencia de biocontroladores y fungicidas

En el Cuadro N° 19, se aprecia el menor porcentaje de severidad de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero, el cual corresponde al Tratamiento 4 Azoxystrobin (Stronsil) (Figura N° 20), quien presentó el mínimo valor de ABCPE con respecto a los demás tratamientos (Cuadro N° 20). El análisis de variancia para los valores promedios ABCPE

por tratamiento de plantas de fresa afectadas por mancha foliar, indica que existe alta significancia entre los tratamientos con un coeficiente de variabilidad de 14.34 % (Cuadro N° 21) y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) muestra que el Tratamiento 4, es diferente de los demás con un 95 % de confiabilidad (Cuadro N° 22).

Cuadro 19: Promedio del porcentaje de severidad del área foliar por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.

Tratamientos	Días de evaluación				
	4	11	18	25	32
T1	7.22	12.94	17.44	20.84	25.36
T2	7.28	12.10	15.43	21.09	24.50
T3	6.65	10.36	13.05	16.13	19.94
T4	7.14	6.41	6.05	5.74	7.83
T5	8.13	13.71	19.96	23.55	28.17
T6	7.62	10.76	13.73	17.15	21.62
T7	6.50	9.33	11.17	15.20	19.00
T8	7.83	12.91	17.30	21.12	26.30
T9	6.91	13.46	19.40	25.77	30.67
T10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

- Se consideró sobre una base de 100 % de área foliar afectada por mancha foliar.

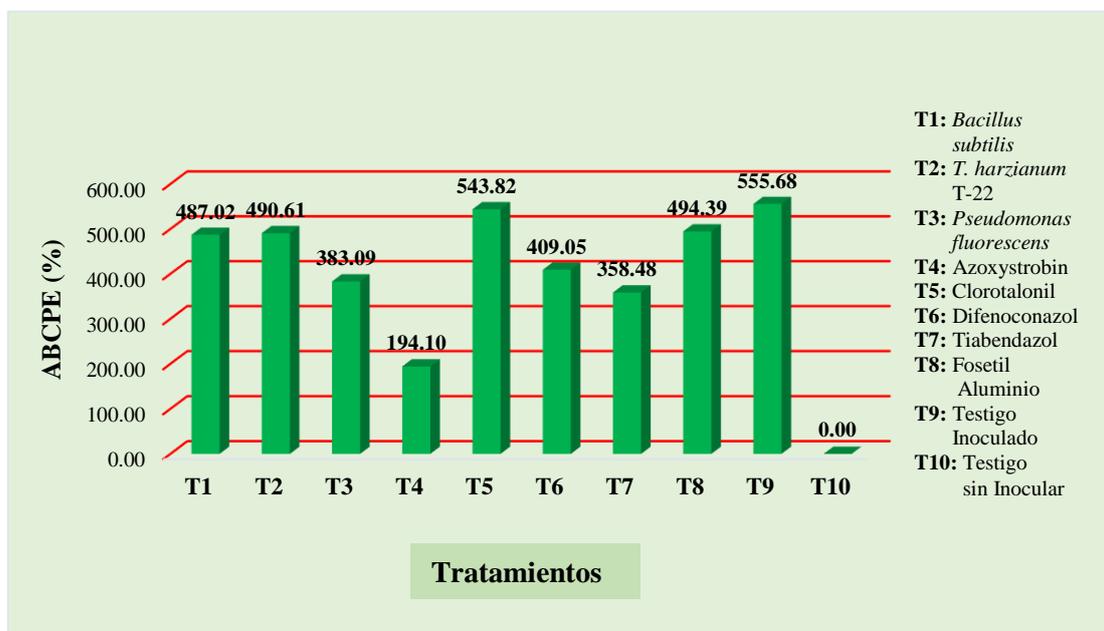


Figura 20: Promedios de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar de fresa en invernadero

Cuadro 20: Promedios de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.

Tratamiento	Ingredientes activos	ABCPE
T1	<i>Bacillus subtilis</i>	487.02
T2	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22	490.61
T3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	383.09
T4	Azoxystrobin	194.10
T5	Clorotalonil	543.82
T6	Difenoconazol	409.05
T7	Tiabendazol	358.48
T8	Fosetil aluminio	494.39
T9	T. inoculado	555.68
T10	T. sin inocular	0.00

Cuadro 21: Análisis de variancia de los valores promedios de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Prob.
Tratamientos	9	1093589.571	121509.952	38.52	<0001 **
Error	30	94627.650	3154.255		
Total	39	1188217.220			

C.V.:14.34 %

α = 0.05

** = Altamente significativo

Cuadro 22: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para los valores de ABCPE por tratamiento en el control de mancha foliar en plantas de fresa en invernadero.

Tratamiento	Ingrediente activo	Fungicida	Promedio	Nivel de significación
T9	-----	T. Inoculado	555.69	A
T5	Clorotalonil	Zetron 720	543.82	A B
T8	Fosetil aluminio	Aliette	494.39	A B C
T2	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22	T-22	490.61	A B C D
T1	<i>Bacillus subtilis</i>	Biosplent	487.02	A B C D
T6	Difenoconazol	Difeconasil	409.05	B C D
T3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biodelta	383.09	C D
T7	Tiabendazol	Mertect	358.49	D
T4	Azoxystrobin	Stronsil	194.1	E
T10	-----	T. sin inocular	0	F

4.5.4 Comparaciones entre tratamientos

Las comparación a través de los tratamientos, se pueden apreciar entre el Tratamiento 4 Azoxystrobin (Stronsil) y el Tratamiento 9 (Testigo inoculado) (Figura N° 21), Tratamiento 8 Fosetil aluminio (Aliette) y el Tratamiento 9 (Testigo inoculado) (Figura N° 22), y el Tratamiento 10 (Testigo sin inocular) y el Tratamiento 9 (Testigo inoculado) (Figura N° 23).

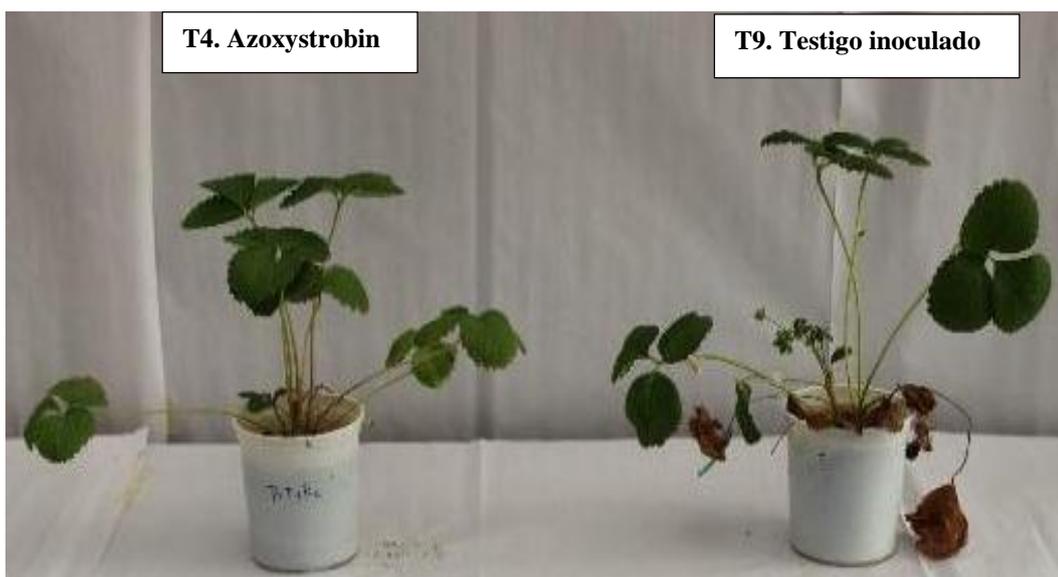


Figura 21: Comparación del Tratamiento 4 (Azoxystrobin) frente al Testigo inoculado.

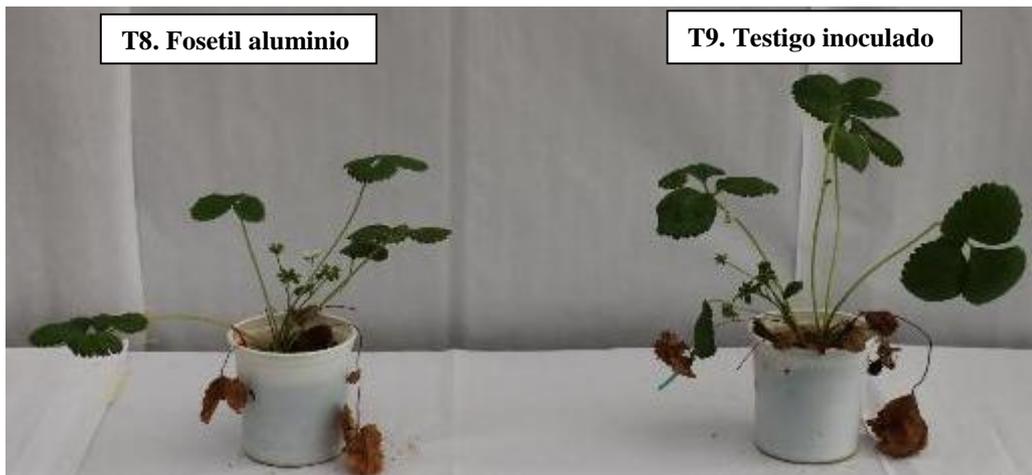


Figura 22: Comparación del Tratamiento 8 (Fosetil Aluminio) frente al Testigo Inoculado.

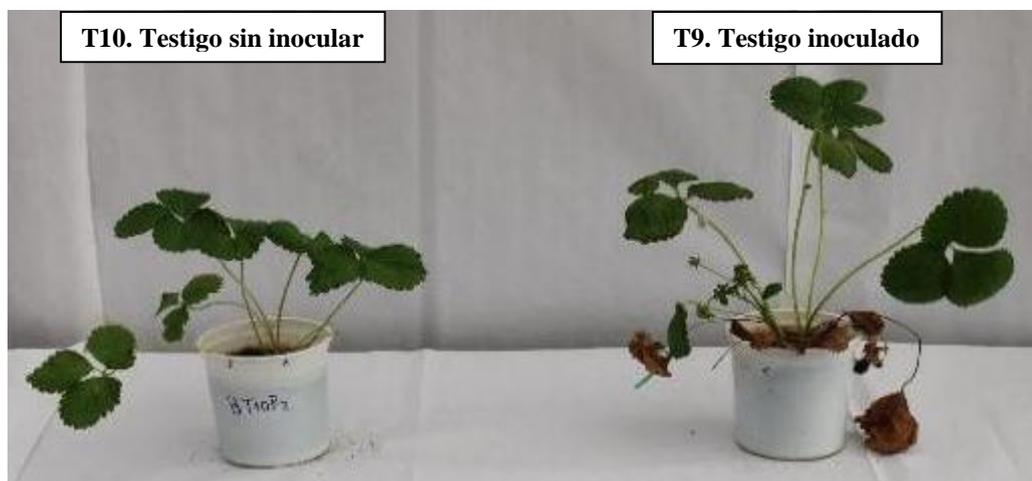


Figura 23: Comparación del Testigo sin inocular frente al Testigo inoculado.

4.6 Ensayo comparativo de crecimiento radial de micelio de *Corynespora cassiicola* en condiciones de invernadero y laboratorio.

Los promedios de crecimiento radial (mm) de micelio de las placas que se colocaron en incubadora e invernadero fueron diferentes (Cuadro N° 23, Figura N° 24); así como, los promedios de temperatura y humedad relativa durante los meses que duro el ensayo (Cuadro N° 24).

El análisis de variancia indicó, que los resultados fueron altamente significativos, con un coeficiente de variabilidad de 4.40 % (Cuadro N° 25); mientras que, la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) muestra que el desarrollo de micelio de

Corynespora cassiicola en invernadero, fue diferente al desarrollo que se produjo en la incubadora, a una temperatura de 28 °C (Cuadro N° 26).

Cuadro 23: Promedios de crecimiento radial de micelio de *Corynespora cassiicola* en PDA 9 días después de la siembra en incubadora e invernadero.

Ambientes	Tratamientos	Prom. Crec. (mm)
Incubadora (28°C)	T1	3.95
Invernadero (22.7 °C-37.7 °C)	T2	2.6

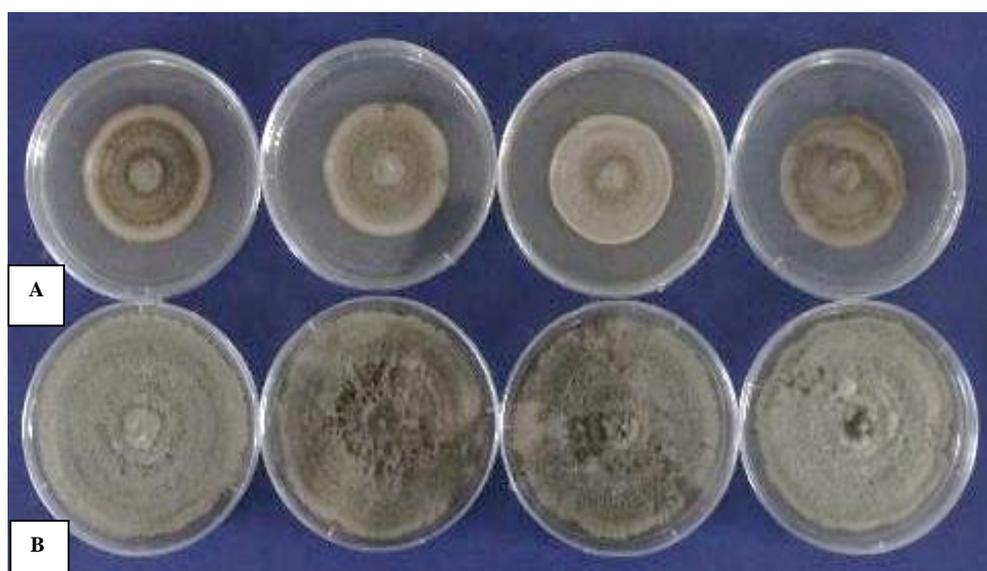


Figura 24: Aislamiento de *Corynespora cassiicola* sembrado en PDA a los 9 días después de la siembra. A) Placas colocadas en Invernadero. B) Placas colocadas en Incubadora 28 °C.

Cuadro 24: Promedios de Temperatura y Humedad relativa en el interior del invernadero correspondiente a los meses de Diciembre (2016) a Enero del (2017).

MESES	Temperatura °C		Humedad Relativa (%)
	Max	Min	
Diciembre	37.7	22.7	77.2
Enero	39.6	24.7	78.6

Cuadro 25: Análisis de variancia para el ensayo comparativo de crecimiento radial de micelio de *Corynespora cassiicola* en PDA colocados en incubadora e Invernadero.

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Prob.
Tratamientos	1	3.64500000	3.64500000	174.75	<.0001 **
Error	6	0.12515000	0.02085833		
Total	7	3.77015000			

C.V.: 4.40 %

α = 0.05

** = Altamente significativo

Cuadro 26: Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$) para el ensayo comparativo de crecimiento radial de micelio de *Corynespora cassiicola* en PDA colocados en incubadora e Invernadero.

Tratamiento	Descripción	Promedio	Nivel de significación
T1	Incubadora	3.9525	A
T2	Invernadero	2.6025	B

4.7 Identificación molecular

4.7.1 Extracción del ADN de *Corynespora cassiicola*

Se obtuvo un ADN de buena calidad (Figura N° 25), con una concentración de 230 ug/uL con un rango aproximado de pureza de 1.82 en el espectrofotómetro Thermo Scientific Nano Drop 1000.



Figura 25: ADN de *Corynespora cassiicola*

El análisis comparativo de la secuencia en el banco de genes del NCBI permitió identificar la cepa en estudio con índices de identidad de 100 % con las especies comparadas cuyos códigos de acceso son: KX786348, KU593529, KM458795, KT002182, GU461298, que fueron reportadas en diferentes partes del mundo (Cuadro N° 27). De la misma manera en la dilución en gel de agarosa al 1 %, el ADN presenta 620 pares de bases (Figura N° 26). Para el análisis filogenético se utilizaron 10 secuencias, obtenidas del GenBank. Se utilizó a la especie *Corynespora citricola* (Cod: de acceso FJ852593), como soporte para anclar el árbol filogenético (Figura N° 27).

Cuadro 27: Análisis comparativo de identidad entre secuencias de *Corynespora cassiicola* reportadas en diferentes partes del mundo.

Código de aislamiento	Identificación morfológica	Lugar de reporte	Identidad (%)	Especie comparada	Código de acceso (NCBI)
Aislamiento en estudio Manchay bajo (AEE-Manchay bajo)	<i>Corynespora cassiicola</i>	Argentina	100	<i>C. cassiicola</i>	KX786348
		Florida (USA)	100	<i>C. cassiicola</i>	KU593529
		India	100	<i>C. cassiicola</i>	KM458795
		China	100	<i>C. cassiicola</i>	KT002182
		México	100	<i>C. cassiicola</i>	GU461298

Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov

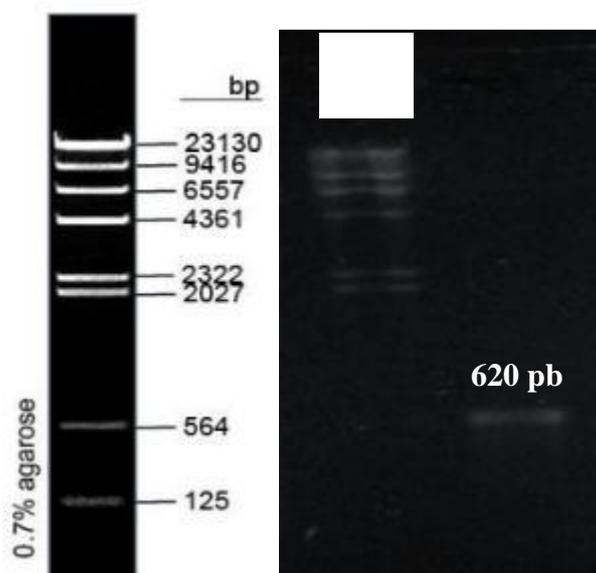


Figura 26: Dilución de ADN de *Corynespora cassiicola* en gel de agarosa al 1 %.

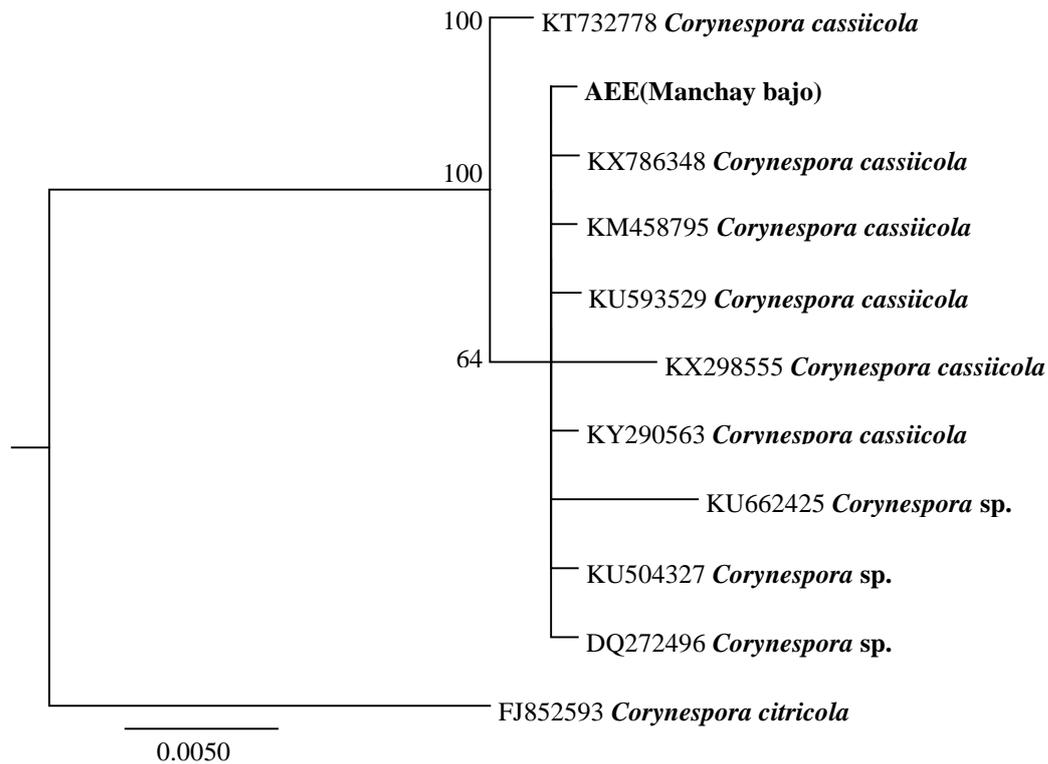


Figura 27: Árbol filogenético de las relaciones entre especies de *Corynespora cassiicola*.

La especie *Corynespora cassiicola* (Cod: de acceso: KT732778) tiene un 100 % de homología en su clado. Las demás especies de *Corynespora cassiicola* con códigos de acceso: DQ272496, KU504327, KU662425, KY290563, KX298555, KU593529, KM458795, KX786348, junto al Aislamiento en estudio (AEE-Manchay bajo) presentan un 64 % de homología en su clado, lo que significa que estas especies están emparentadas por un antepasado común.

V. DISCUSIÓN

Las características morfológicas del hongo aislado a partir de hojas de fresa, como es el color de colonia, así como las características del conidióforo (cilíndrico, simple, corto o largo), la conidia (exógena, recta o curva, de forma elipsoidal u obclavada, tipo fragmosporas, en forma individual o en cadenas cortas y de formación acropétala) coincide con reportes de Barnet y Hunter (1972), Jayasuriya y Thennakoon (2007) realizados para el género *Corynespora* sp. Las características macroscópicas, microscópicas como las dimensiones de los conidióforos y conidias del hongo aislado se asemejan a la especie *Corynespora cassiicola* (Barnet y Hunter 1972, Ellis 1971).

Las plantas de fresa var. Camino real inoculadas en invernadero con el aislamiento de *C. cassiicola*, presentaron síntomas a los 3 días en hojas y peciolo. Esto coincide con una publicación de Cabrera *et al.* (2017), en donde realizaron el proceso de inoculación de un aislamiento de *C. cassiicola* en plantas sanas de soja cultivar M8080, sembradas en macetas en condiciones de invernadero y que a los 4 días presentaron los síntomas de mancha anillada en hojas. Además mencionan que *C. cassiicola* también puede desarrollar lesiones sobre peciolo, tallos y raíces de plantas jóvenes aumentando su peligrosidad, así mismo indican que las lesiones que se producen en las hojas por la enfermedad reducen el área de fotosíntesis de las plantas y pueden causar defoliación.

De acuerdo con Breton *et al.* (2000), Déon *et al.* (2012), Lamotte (2007) la infección de *C. cassiicola* se produce uno a dos días después de la inoculación, debido a la cassicolina, toxina que es secretada por el patógeno. La cassicolina, es una proteína glicosilada de 27 aminoácidos que juega un papel importante en la fase temprana de infección y patogenicidad de *C. cassiicola*.

Los síntomas en las hojas inoculadas, se caracterizaron por presentar manchas de color marrón oscuro, con el centro marrón claro rodeado de un halo amarillo. Esto coincide con un reporte de Coelho *et al.* (2013), en el cual describen que la enfermedad originada por *C.*

cassiicola, causa lesiones en las hojas con halo amarillo, las cuales evolucionan hacia una coloración de color beige o marrón claro en el centro; además, mencionan que las esporas se dispersan principalmente por el viento, agua de riego, por aspersión y lluvia. Pernezny y Simone (1993) sostienen que los síntomas de la enfermedad atribuidos a *C. cassiicola* incluyen la necrosis, a menudo con un halo amarillo circundante debido a la producción de una toxina, la cassicolina (Barthe *et al.* 2007). Tanto las hojas jóvenes y maduras pueden verse afectadas, aunque el patógeno es más comúnmente asociado con hojas más viejas (Pernezny *et al.* 2008). Los síntomas que se han reportado coinciden con lo hallado en la presente investigación.

Los síntomas que se presentaron en las plantas de fresa una vez que fueron inoculadas, no mostraron el halo rojizo, siendo algo diferente a lo que se observó en las hojas recolectadas de campo. Es importante señalar que las hojas de las plantas recolectadas en campo tenían alrededor de 16 meses de edad y las que se utilizaron para la prueba de patogenicidad tuvieron 5 semanas de edad; además, el cultivo en campo se desarrolló bajo un rango de temperatura de 15.9 y 25.1 °C, con una humedad relativa de 87.3 %; mientras que, en invernadero el rango de temperatura fue entre 23.7 y 38.7 °C, con una humedad relativa de 78 %. Esto se relaciona con un reporte realizado por Jacob (1997), en donde expone que los síntomas originados por *C. cassiicola* varían ampliamente con los clones, la localidad y la etapa de las hojas cuando la infección se establece. Es muy probable que la edad y las condiciones ambientales influyeron en las expresiones de los síntomas.

Esto concuerda con Miller y Alfieri (1974), quienes aislaron a *C. cassiicola* de plantas variegadas (cambio de coloración de las zonas verdes de las plantas) de *Ligustrum sinense*, y realizaron la prueba de patogenicidad en plantas variegadas y no variegadas, dando como resultado síntomas indistinguibles de los encontrados en las plantas naturalmente infectadas. En las plantas variegadas se formaron diminutas manchas rojizas y circulares, que se agrandaron a una lesión marrón claro con márgenes púrpura; mientras que, en las plantas no variegadas se produjeron lesiones marrones con halos amarillos.

Las inoculaciones experimentales dieron resultados positivos y se reisoló al hongo de los síntomas de hoja y peciolo, cuyas características finales coincidieron con el patógeno inicialmente aislado, cumpliendo con los Postulados de Koch; por esta razón se considera que dicho patógeno es el agente causal de la mancha foliar.

Así mismo Ferrer (2006), Jayasuriya y Thennakoon (2007), Kurozawa y Pavan (2006), Reis, *et al.* (2014), Silva *et al.* (1998), Tun Suarez *et al.* (2011), mencionan a *C. cassiicola* como un hongo que causa manchas foliares en más de 70 especies de plantas a nivel mundial, su importancia económica como un patógeno de varios cultivos, se ha descrito y es responsable de importantes daños en plantaciones de Caucho (*Hevea brasiliensis*) convirtiéndose en un importante factor limitante para los cultivos en Asia. En el norte de Brasil, es considerado como uno de los peores patógenos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de Eucalipto (*Eucalyptus globulos*) en donde causa el tizón foliar. En Cuba, en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) causa la enfermedad conocida como tizón de fuego. En Sri Lanka, ha sido reportado en el cultivo de *Codiaeum variegatum* (crotón) causando manchas foliares.

El hongo sembrado en los diferentes medios de cultivo (PDA, APG, A-V8 y AEM), desarrolló el mismo tipo de micelio algodonoso y extendido de color verde oscuro, esto coincide con una publicación de Tún Suarez *et al.* (2011), en donde determinaron el color de micelio verde oscuro de tipo liso y algodonoso de *C. cassiicola*, patógeno que causa la mancha foliar del chile dulce (*Capsicum annuum*) en México. El medio A-V8, presentó el mayor ritmo de crecimiento diario, debido a su alto contenido de nutrientes; esto se relaciona con lo que menciona Almeida y Yamashita (1976) quienes estudiaron el crecimiento y la esporulación de *C. cassiicola* en diferentes medios de cultivo; en donde, concluyeron que el crecimiento de *C. cassiicola*, fue excelente en los medios suplementados con A-V8 cuando los cultivos se mantenían bajo luz continua.

La mayor esporulación se presentó en el medio Agar papa glucosa con $6,8 \times 10^4$ conidias, seguido del medio Papa dextrosa agar (PDA) con $1,2 \times 10^4$ lo que indica que la presencia de azúcares simples influyen en la esporulación de *C. cassiicola*. Esto coincide con un reporte de Galucio y Da Silva (2014), en donde indican que la mayor producción de conidios de *C. cassiicola* se obtuvieron en los medios Papa dextrosa agar (PDA) y Papa sacarosa agar (PSA).

En los enfrentamientos de cultivo dual de *C. cassiicola* frente a *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, el mayor porcentaje de inhibición de micelio correspondió al tratamiento con *B. subtilis* (24.6 %); y el menor porcentaje con *P. fluorescens* (12 %), lo que indica que las bacterias en mención no tienen un control “*in vitro*” revelador sobre el patógeno. Esto concuerda con los investigadores Castro *et al.* (2015) quienes en campo

realizaron la evaluación en un sistema de rotación tomate-soja con incorporación de biomasa verde, la aplicación de inóculos individuales y en mezcla de *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y bioles de microorganismos de montaña, sobre el crecimiento de las plantas y variables edáficas, dando como resultado que las inoculaciones con *Bacillus* y *Pseudomonas* no provocaron efectos significativos en las poblaciones de hongos, bacterias y actinomicetes; mientras que, las inoculaciones mixtas de estos microorganismos lograron aumentar la población de actinomicetes.

Trichoderma harzianum cepa T-22, obtuvo control “*in vitro*” sobre *C. cassiicola* con un porcentaje de inhibición de micelio de 41.8 %. Leal, citado por Lorenzo (2001), indicó que la acción biocontroladora de *Trichoderma*, tienen diferentes mecanismos de acción, que regulan el desarrollo de hongos fitopatógenos siendo los principales, la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno. Así mismo Haram *et al.* (1996), menciona que *Trichoderma* posee distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen además de los mencionados la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores.

El fungicida Fosetil Aluminio (Aliette), mostró mayor eficacia en el control “*in vitro*” de *C. cassiicola*, ya que inhibió el crecimiento micelial en un 100 % respectivamente; debido al ambiente ácido que ocasiona al momento de ser mezclado con el medio de cultivo (pH: 2.3). Esto coincide con Manju (2011), quien indica que *C. cassiicola* mostró una baja respuesta de crecimiento y esporulación a un nivel de pH de 4.0 y 4.5 en medio de cultivo papa dextrosa. El fungicida Tiabendazol (Mertect) mostró ser el segundo producto en tener el control “*in vitro*” de *C. cassiicola* con un 96.32 % de inhibición de micelio respectivamente. Esto concuerda con un reporte realizado por Miller y Alfieri (1974) en donde indican que obtuvieron un excelente control de la mancha foliar de *Ligustrum sinense*, causado por *C. cassiicola* con Tiabendazol a una dosis de 0,57 g/l.

El menor porcentaje de severidad de la enfermedad mancha foliar en plantas de fresa en invernadero, corresponde al Tratamiento 4 (Azoxystrobin), el cual presentó el mínimo valor de ABCPE. Esto se relaciona con Carmona *et al.* (2011), quien realizó ensayos de azoxystrobin para controlar enfermedades de fin de ciclo de soja, en las cuales estaba incluida la mancha anillada originada por *C. cassiicola*, en donde la aplicación de

azoxystrobin en mezclas controló las enfermedades presentes y aumentó el rendimiento, el peso de 1000 semillas y en algunos casos el número de granos por metro cuadrado.

El azoxystrobin (o azoxistrobina), es un fungicida utilizado en cereales, viñas, arroz, cítricos, papas y tomates, está incluido dentro de los primeros fungicidas de una nueva clase química disponible en el mercado, las estrobilurinas. El azoxystrobin es un fungicida sistémico, de amplio espectro, que inhibe la germinación de esporas y el crecimiento micelial (Tomlin 2000) cuya actividad está dirigida contra los cuatro principales grupos de hongos patógenos: Ascomycetes (por ejemplo, el polvillo de moho), Basidiomycetes (ejem: tizón), Deuteromycetes (ejem: necrosis del arroz) y Oomycetes (ejem: mildiú de la vid o polvo de azúcar) (Clough y Godfrey 1996).

El mayor valor de ABCPE correspondió al Tratamiento 8 (Fosetil Aluminio), producto que no originó efecto alguno en el control de la mancha foliar de plantas de fresa en invernadero, debido a que *C. cassicola* es un Deuteromyceto; mientras que, Fosetil Aluminio está destinado para controlar la mayoría de Oomycetes excepto a *P. infestans* en papa y tomate (Gisi 2002). De acuerdo a Newman y Jacob (1995), Pinto (1990), mencionan que el Fosetil Aluminio es un fungicida de alta sistemicidad, que se transporta en forma acropétala y basipetala después de la aplicación foliar, con translocación simplástica y apenas alguna translocación apoplástica, cuya acción puede ser indirecta activando los mecanismos de defensa de la planta, o bien, directa a través de su transformación en ácido fosforoso, compuesto que ha demostrado tener efecto sobre diferentes especies de *Phytophthora* y *Pythium*.

Los valores de crecimiento radial de micelio de *C. cassicola* sembradas en medio PDA, mantenidas en invernadero e incubadora fueron estadísticamente diferentes, debido a que durante la fecha que se colocaron las placas en invernadero, no se presentaron las condiciones ambientales adecuadas de temperatura (28-30 °C) y humedad relativa (>80 %) para el desarrollo del patógeno, razón por la cual el micelio presente en el invernadero detuvo su crecimiento, mas no así las placas colocadas en incubadora en donde el micelio llegó a cubrir la totalidad de la superficie del medio de cultivo a una temperatura de 28 °C en 9 días.

El aislamiento en estudio (AEE-Manchay bajo), está biomolecularmente incluido junto con otras especies de *C. cassiicola* en un clado que tiene un 64 % de homologación. Se puede apreciar que las especies de *C. cassiicola* con códigos de acceso: KU662425, KX298555, difieren en su alineación con las demás especies con códigos de acceso: DQ272496, KU504327, KU593529, KM458795, KX786348. Esto debido a que existe variación en la secuencias de aminoácidos de sus especies.

La identificación morfológica del agente causal de la mancha foliar de fresa de la zona de Manchay perteneciente al Distrito de Pachacamac fue identificado como *C. cassiicola* y fue verificado con la identificación biomolecular dando como resultado el 100 % de identidad comparada con 5 especies de *C. cassiicola* reportadas en diferentes partes del mundo. Esto coincide con un reporte realizado por Ma y Zhang (2017) no publicado pero registrado en el NCBI, en donde se mencionó el primer reporte de mancha *Corynespora* de hoja de fresa causada por *C. cassiicola* en Henan, China.

En el presente trabajo se demostró que *C. cassiicola* afecta la parte aérea del cultivo de fresa y se constituye en el primer reporte de este patógeno como agente causal de la mancha foliar de fresa en el Perú.

VI. CONCLUSIONES

- El agente causal de la mancha foliar en Fresa (*Fragaria ananassa*), fue identificado morfológica y biomolecularmente como *Corynespora cassiicola*.
- El medio de cultivo que favoreció el desarrollo de micelio de *Corynespora cassiicola* fue el A-V8 y los que indujeron una mayor esporulación fueron los medios Agar papa glucosa y Papa dextrosa agar.
- El controlador biológico *Trichoderma harzianum* cepa T-22 obtuvo un control “*in vitro*” significativo con un porcentaje de inhibición de micelio de 41.8 % de *Corynespora cassiicola*, no así las bacterias *Bacillus subtilis* con 24.6 % y *Pseudomonas fluorescens* con 12 %.
- Los fungicidas Tiabendazol (Mertect) y Fosetil Aluminio (Aliette), obtuvieron un control “*in vitro*” al 96.32 % y 100% respectivamente, de inhibición de micelio de *Corynespora cassiicola*.
- El Azoxystrobin (Stronsil) fue el tratamiento que tuvo mayor control de la mancha foliar de fresa, en condiciones de invernadero; mientras que, bajo las mismas condiciones el Fosetil Aluminio (Aliette) fue el tratamiento que no tuvo efecto de control de la mancha foliar de fresa.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar otras zonas productoras de fresa, para determinar la presencia del hongo identificado y evitar la diseminación a zonas libres de este patógeno.
- Realizar trabajos para determinar las medidas de prevención y control de esta enfermedad en invernadero y campo.
- Realizar investigaciones de control químico de mancha foliar en campos de cultivo.
- Realizar el control químico de la mancha foliar de fresa en forma preventiva o cuando aparezcan los primeros síntomas de mancha foliar.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aamir, S., Sutar, S., Singh, S. K., Baghela, A. 2015. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine* 5(2):74–81.
2. Abensur, J. 1998. Cultivo de la Fresa. Manual Técnico para Empresas Educativas de producción. Lima, Perú. p. 22-23.
3. Acharya, B., Mishra, S. K., Acharya, A., Das, J. N. and Mohapatra, K. B. 2002. Pathogenic potential and control of *Corynespora cassiicola* causing leaf spot of betelvine. *Orissa Journal Of Horticulture* 30(1):87-91.
4. Agrios, G. 1995. Fitopatología. Trad. Manuel Ortiz. México. p. 40.
5. Ahmad, J. S., Baker, R. 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77:182-189.
6. Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S. y Kato, H. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic *Pseudomonas*. p. 120-123 in: Proceedings of the 4th International Workshop on PGPR. A. Ogoshi, K, Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino, eds. Nakanishi Printing, Sapporo, Japan.
7. Almeida, A. M. y Yamashita, J. 1976. Growth and sporulation of *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei in different culture media. *Fitopatología Brasileira* 1(3): 203-206.
8. Andrés, J. 2015. Plantas Leñosas Ornamentales. Control de Enfermedades Causadas por Hongos y Cromistas (en línea). España. Consultado 25 may. 2016. Disponible en

https://books.google.com.pe/books?id=j3cCgAAQBAJ&pg=PA43&lpg=PA43&dq=difenoconazol+en+el+control+de+enfermedades&source=bl&ots=vumHDgw9XO&sig=3xbiKpqrOkNPKngJSZlgT98YEYs&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiMI_nejJNAhWG6CYKHVGwArcQ6AEITzAI#v=onepage&q=difenoconazol%20en%20el%20control%20de%20enfermedades&f=false

9. Angulo, R. 2009. Fresa *Fragaria ananassa* (en línea). Colombia. Consultado 27 ene. 2016. Disponible en https://www.cropscience.bayer.co/~media/Bayer%20CropScience/Peruvian/Country-Colombia-Internet/Pdf/Cartilla-FRESA_baja.ashx
10. Ayala, L. A., Rodríguez, R., Aguilar, C. N., Lara, F. y Quero, A. R. 2004. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Fitopatología Mexicana* 22(2):239-245.
11. Bacab, P. I., Cristóbal, A. J., Tun, S. J. y Herrera, P. E. 2010. Caracterización morfológica, patogénica y sensibilidad a fungicidas “*in vitro*” de hongos diagnosticados en *Thevetia peruviana*. Resumen. XII Congreso Internacional/XXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Yucatán, México.
12. Bautista, N., Solo, L. y Pérez, R. 2009. Tópicos Selectos Aplicados a la Fitosanidad (en línea). México. Consultado 01 oct. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/266259484_Analisis_del_area_bajo_la_curva_del_progreso_de_las_enfermedades_ABCPE_en_patosistemas_agricolas
13. Barnett, H. L. y Hunter, B. B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3^{era} Ed. USA. 241 p.
14. Baraona, M. y Sancho, E. 1992. *Fruticultura especial: manzana, melocotón fresa y mora*. Fascículo 6. EUNED. San José, Costa Rica. 140 p.
15. Barthe, P., Pujade-Renaud, V., Breton, F., Gargani, D., Thai, R., Roumestand, C., de Lamotte, F. 2007. Structural analysis of cassiicolin, a host selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *Journal Molecular Biology* 367(1):89–101.

16. Bolda, M. y Koike, A. 2013. Actualidades de Marchitez de *Verticillium* en California en 2013 (en línea). California, USA. Consultado 27 ene. 2016. Disponible en <http://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=11047>
17. Bonet, J. 2010. Desarrollo y Caracterización de Herramientas Genómicas en *Fragaria* Diploide para la mejora del cultivo de fresa. Tesis Doctoral. Barcelona, España. UAB. 231 p.
18. Breton, F., Sanier, C., d' Auzac, J. 2000. Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. *Journal of Rubber Research* 3(2):115–128.
19. Browne, G. 2011. Comisión de la fresa de California guía de producción (en línea). California, USA. Consultado 15 sep. 2017. Disponible en [http://www.calstrawberry.com/Portals/0/Reports/Research%20Reports/Production%20Guidelines/Spanish/Podredumbre%20de%20la%20ra%20C3%ADz%20y%20del%20cuello%20por%20fit%20B3ftora%20\(phytophthora\)%20-%202011.pdf](http://www.calstrawberry.com/Portals/0/Reports/Research%20Reports/Production%20Guidelines/Spanish/Podredumbre%20de%20la%20ra%20C3%ADz%20y%20del%20cuello%20por%20fit%20B3ftora%20(phytophthora)%20-%202011.pdf)
20. Cabrera, M., Cúndom, M., Gutiérrez, S., Álvarez, E. 2006. Situación de la mancha anillada (*Corynespora cassiicola*) de la soja en provincias del NE de Argentina (en línea). Argentina. Consultado 01 jun. 2017. Disponible en <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/05-Agrarias/2006-A-022.pdf>
21. Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens (en línea). New York, Usa. Consultado 10 nov. 2017. Disponible en https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=IjncrR7zyG4C&oi=fnd&pg=PR7&dq=Biological+control+of+microbial+plant+pathogens.&ots=YEE_L_KVX65&sig=c-rjt9WAxXfOX9IqD3dse-20of%20microbial%20plant%20pathogens.&f=false.
22. Carmona, M., Gally M., Sautua, F., Abello, A. y López, P. 2011. Uso de mezclas de azoxistrobina y triazoles para controlar enfermedades de fin de ciclo de la soja. *Summa Phytopathológica* 37(2):134-139.

23. Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied Environ Microbiology* 65:929-935.

24. Castro, L., Murillo, M., Uribe, L., Mata, R. 2015. Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (mm) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 39(3):21-36.

25. Chet, I., Benhamou, S. H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma y Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.) 2:153-152.

26. Clough, J. M. y Godfrey, C. R. 1996. Azoxystrobin: A Novel Broad-spectrum Systemic Fungicide, *Pesticide Outlook*. 7:16-20.

27. Coelho, R., Pino, C. Fonseca, A., Muniz, M. 2013. Manual de Heveicultura para a Região Sudeste do Estado do Acre (en línea). Brasil. Consultado 30. may. 2017. Disponible en <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/982145/manual-de-heveicultura-para-a-regiao-sudeste-do-estado-do-acre>

28. Conci, V. C., Torrico, A. K., Cafrune, E., Quevedo, V., Bains, O., Ramallo, J. C., Borquez, A. M., Mollinedo, V. A., Agüero, J. J. y Kirschbaum, D. S. 2009. First Report of Strawberry Mild Yellow Edge Virus in Argentina. VI th Internat. Strawberry Symposium. *Acta Horticulturae* 842.

29. Déon, M., Bourré, Y., Giménez, S., Berger, A., Bieysse, D., de Lamotte, F., Poncet, J., Roussel, V., Bonnot, F., Oliver, G., Franchel, J., Seguin, M., Leroy, T., Roedel-Drevet, P., Pujade-Renaud, V. 2012. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Science* 185–186:227–237.

30. De Souza, M., Fumiko, M., Passos, F. 1995. Patogenicidad de *Rhizoctonia solani* em morangueiro. *Bragantia*. Campiñas. 54(2):319-324.

31. Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
32. Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B. International Mycological Institute Kew. England. 608 p.
33. Farrera, R., Zambrano, A., y Ortiz, F. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. Revista Facultad Agronomía 24:269-281.
34. Ferreira, J. H., Martthee, F. N. y Thomas, A. C. 1990. Biological Control of *Eutypa lata* on Grapevine by An Antagonistic Strain of *Bacillus subtilis*. The American Phytopathological Society 81(3):283-287.
35. Ferrer, A. 2006. Comportamiento y control de la enfermedad tizón de fuego causada por el hongo *Corynespora cassiicola* (Berk. & curt.) Wei, en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) en sistemas de organopónicos en la provincia de Camagüey y su relación con otros patógenos fúngicos presentes en el cultivo. Fitosanidad 10(4):310-315.
36. French, E. R. y Hebert, T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. p. 176.
37. Galúcio, F. M., Da Silva, J. L. 2014. Variabilidade de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. Summa Phytopathologica 40(1):84-87.
38. Gasparotto, L., Ferreira, F. A. y Junqueira, N. T. V. 1988. *Corynespora* leaf spot of *Hevea brasiliensis* in Brazil. Fitopatología Brasileira 13(3):278-280.
39. Giménez, G., Paullier, J., Maeso, D. 2003. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla (en línea). Uruguay. Consultado 30 may. 2017. Disponible en

<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807161309.pdf>

40. Gisi, U. 2002. Chemical control of downy mildews. En: Spencer-Philips, P. N. T., U. Gisi y A. Lebeda (eds). *Advances in downy mildew research*. Kluwer Academic. Holanda. pp. 119-159.
41. Gordon, T. y Krishna, V. 2007. Marchitez causada por *Verticillium* en la Fresa (en línea). USA. Consultado 10 jul. 2016. Disponible en <https://calstrawberry1-web.sharepoint.com/Reports/Production%20Guidelines%20%20Spanish/Marchitez%20causada%20por%20el%20Verticillium%20en%20la%20fresa%20-%202007.pdf>
42. Grant, K. A., Dickinson, J. H., Payne, M. J., Campbell, S., Collins, M. D. y Kroll, R. G. 1993. Use of polymerase chain reaction and 16S rRNA sequences for the rapid detection of *Brochothrix spp.* in food. *Journal of Applied Bacteriology* 74:260-267.
43. Hajlaoui, M. R., Mnari-Hattab, M., Sayeh, M., Zarrouk, I., Jemmali, A. y Koike, S.T. 2015. First report of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of strawberry in Tunisia (en línea). Consultado 29 may. 2017. Disponible en <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.014>
44. Haram, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum*, chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86:980-985.
45. Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. 2004. Interaction between *Trichoderma harzianum* strain T-22 and maize inbred Mo17 and effects of these interactions on disease caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147-153.
46. Hjeljord, L. y Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma y Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE Kubice CP. (Eds) 2:131-151.

47. IIFT (Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical, CU). 2011. Instructivo Técnico para el Cultivo de la fresa (en línea). Cuba. Consultado 10 abr. 2016. Disponible en http://www.fruticulturacubana.co.cu/instructivos/IT5_fresa%20instructivo%20tecnico.pdf
48. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria, PE). 1997. Comisión Nacional de Fruticultura. Promotor del Desarrollo Frutícola Nacional. El Cultivo de la Fresa. Aspectos de la Producción, manejo en Post cosecha y Comercialización. Boletín Técnico N° 12. p. 5.
49. Jacob, C. K. 1997. Diseases of potential threat to rubber in India. *Planter's Chronicle* 92:451-461.
50. Jayasuriya, K. Y. y Thennakoon, B. I. 2007. First report of *Corynespora cassiicola* on *Codiaeum variegatum* (crotón) in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)* 36 (2): 138-141.
51. Kimati, H., Amorin, L., Berghamin, A., Camargo, L., Rezende, J. 1997. Enfermedades de plantas cultivadas (en línea). Brasil. Consultado 28 may 2017. Disponible en files.prof-vanderufersa.webnode.com.br/.../Livro%20-%20Manual%20de%20Fitopat.
52. Kurozawa, C. y Pavan, M. A. 2006. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. *et al.* (Eds.) Manual de fitopatología. São Paulo: Agronomía Ceres. p. 607-626.
53. Lamotte, F., Duviau, M. P., Sanier, C., Thai, R., Poncet, J., Bieysse, D., Breton, F., Pujade-Renaud, V. 2007. Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *Journal Chromatography B* 849:357–362.
54. Liyanage, S., Jayasinghe, C. K., Liyanage, N. I. y Jayaratne, A. H. 1986. *Corynespora* leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*). *Rubber Research Institute of Sri Lanka* 65:47-50

55. Lorenzo, N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. p. 51-52.

56. Lorito, M., Harman, G., Prieto, A. y Hayes, C. 1990. Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. *Phytopathology* 82(10):10- 77.

57. Louie, M., Louie, L. y Simor, A. E. 2000. The role of ADN amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Canadian Medical Association Journal* 163(3):301-309.

58. Ma, Q. y Zhang, M. 2017. First report of *Corynespora* leaf Spot of strawberry Caused by *Corynespora cassiicola* in Henan, China (en línea). China Consultado 30 may. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY112718>.

59. Manju, M. 2011. Epidemiology and Management of *Corynespora* Leaf Fall Disease of Rubber Caused by *Corynespora cassiicola* (berk & curt.) wei. Thesis submitted to the university of agricultural sciences, dharwad in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in plant pathology (en línea). India. Consultado 20 set. 2017. Disponible en <http://krishikosh.egranth.ac.in/bitstream/1/69685/1/th10164.pdf>

60. Mansor, A., Aziz, A., Yasmeen, F., Javed, A., and Saleem, S. 2015. New host record of *Fusarium oxysporum* schlecht, in Pakistan causing wilt of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.), and *in vitro* control. *International Journal of Biology and Biotechnology* 12(3):423-429.

61. Martínez, M. L. 2009. Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen* 36(5):273–277.

62. Miller, J. W. y Alfieri, S. A. 1974. Leaf spot of *Ligustrum sinense* caused by *Corynespora cassiicola* and its control. *Phytopathology* 64:25-256.

63. MINAGRI (Ministerio de Agricultura, PE). 2008. Estudio de la Fresa en el Perú y el mundo (en línea). Perú. Consultado 10 abr. 2016. Disponible en http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/estudio_fresa.pdf
64. Navia O. M., Parker, J. 1991. Estrategias de control químico de manchas foliares fungosas de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Revista Latinoamericana de la Papa 4:103-114.
65. NCBI (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos de América). 1988. Consultado 12 dic. 2016. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
66. Newman, S. T. y F. Jacob. 1995. Principles of uptake and systemic transport of fungicides within the plant. En: H. Lyr (ed). Modern selective fungicides. Properties, applications, mechanisms of action. Gustav Fischer Verlag, Jena. USA. pp. 53-73.
67. Oluma, H. O. y Amuta, E. U. 1999. *Corynespora cassiicola* leaf spot of *Carica papaya* in Nigeria. Mycopathología 145(1): 23-27.
68. Pandey, D. K., Tripathi, N. N., Tripathi, R. D., Dixit, S. N. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the Essential oil of *H. suaveolens*. Zeit, Pflazenkran. Pflazenkran, 89: 344-349
69. Patiño, D., Lineneth, E., Barrera, E., Quejada, O., Rodríguez, H., Arroyave, C. 2014. Manual del Cultivo de Técnico Fresa Buenas Prácticas Agrícolas (en línea). Colombia. Consultado 21 mar. 2016. Disponible en http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/fresa%20BPA_1.pdf
70. Pernezny, K. y Simone G. W. 1993. Target spot of several vegetable crops (en línea). Florida, USA. Consultado 11 nov. 2017. Disponible en <http://plantpath.ifas.ufl.edu/media/plantpathifasufledu/factsheets/pp0039.pdf>
71. Pernezny, K. L., Datnoff, L. E., Smith, L., J., Schlub, R. L. 2008. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. Acta Horticulturae 808:25-28. Consultado 12 oct. 2017. Disponible en https://www.ishs.org/ishs-article/808_1

72. Pérez, N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana, Cuba. 296 p.
73. Perotti, E. B., Menéndez, L. T., Gaia, O. E. y Pidello, A. 2005. Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. Revista Argentina de Microbiología 37:102-105.
74. Pinto, A. 1990. Control integrado de Phytophthora en frutales. Nuevo concepto que implica variar el ambiente del suelo haciéndolo desfavorable al patógeno. IPA La Platina (57):14-19.
75. Reis, B. P., Lanna Filho, R., Alfenas, R. F. y Alfenas, A. C. 2014. First report of *Corynespora cassiicola* causing severe leaf blight on Eucalyptus in Brazil. Consultado 06 jun. 2016. Disponible en <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.007>
76. Rigotti S., Viret O., Gindrat D. 2003. Fungi from symptomless strawberry plants in Switzerland. Phytopathology Mediterranea 42:85–88.
77. Rodríguez, R., Aguilar, C., Ayala, L., Rocha, J., Padilla, V. y Espinosa, T. 2009. Detección de microorganismos mediante técnicas moleculares (en línea). México. Consultado 18 may. 2017. Disponible en <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%201/AQMmicroorganismos.html>
78. Samuels, G., J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. Mycol Research 100(8):923- 935.
79. Serrano. L. y Galindo, E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario (en línea). México. Consultado 28 set. 2017. Disponible en <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>
80. Sesan T. E. 2006. Integrated control of strawberry diseases. Phytopathology Polonica 39: 133–148.

81. Silva, W. P., Deverall, B. J., Lyon, B. R. 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* 47(2):267-277.
82. Tomlin, C. D. S., 2000. *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council (BCPC) UK. Consultado 21 may. 2017. Disponible en <http://trove.nla.gov.au/work/6273016?q&versionId=46525070>.
83. Tun Suárez, J. M., Castillo, M. E., Alejo, J. C. y Latournerie, L. 2011. Etiología de la mancha foliar del chile dulce (*Capsicum annuum* L.) y su control in vitro en Yucatán, México. *Fitosanidad* 15(1):5-9.
84. Ucker, R., Ueno, B., Pedroso de Oliveira, R. 2005. Reação de cultivares de morangueiro ao oídio sob condições de casa de vegetação. *Revista Brasileira de Fruticultura* 27(2):219-221.

IX. ANEXOS

ANEXO 1: Mediciones de conidióforo y conidia para determinar la especie del género: *Corynespora*.

GENERO: <i>Corynespora</i>							
Numero	CONIDIOFORO			CONIDIA			
	Largo (μ)	Diametro (μ)	Proliferaciones	Largo (μ)	Diametro (μ)	Base Truncada	N° de Seudosepta
1	150	2,5	8	19	4,25	2	4
2	108	2,25	9	18	4	1,75	4
3	99	4,5	7	17	3,75	2	4
4	136	2	8	19	4	1,75	4
5	67	2,5	7	21	4	1,75	5
6	46	2,75	7	20	4,25	1,75	4
7	46	2,5	6	19,5	3,75	1,75	4
8	50	2,25	4	19	4	2	4
9	47	2,25	4	22,5	4	2	5
10	46	4	7	17	3,75	2	4
11	81	2,5	5	19	4	1,75	4
12	50	2,75	3	29	5	1,75	5
13	105	2,5	6	28	3,75	2	5
14	49	2,5	4	22	3,75	1,75	5
15	50	2	5	25	3,75	1,75	5
16	46	2,5	4	36,5	4	1,75	6
17	46	2	3	20	3,75	2	4
18	48	2	4	20,5	3,75	1,75	4
19	67	2	3	31	3,75	1,75	4
20	47	4	4	23,5	3,75	2	4
21	46	3,5	5	48	4	2	8
22	46	2,75	4	24	4	2	5
23	96	2	7	29	3,75	1,75	6
24	58	2	5	23	4	1,75	5
25	67	2	4	34	4	2	5
SUMA	1697	64,5	133	604,5	98,75	46,5	117
PROMEDIO	67,88	2,58	5,32	24,18	3,95	1,86	4,68
FACTOR	2,42	2,42	***	2,42	2,42	2,42	***
TOTAL	164,27	6,24	***	58,52	9,56	4,50	***
RANGOS (Elis, 1971)	(110-850)μ	(4-11)μ	(2-9)μ	(40-220)μ	(9-22)μ	(4-8)μ	(4-20)

ANEXO 2: Medios de cultivo para determinar las características culturales del agente causal de la mancha foliar en fresa (*Fragaria ananassa*).

- **Papa dextrosa agar (PDA)**

- Papa Dextrosa Agar (Formulado) de marca Diffco.
- 39 gr. Por litro.

- **Agar papa glucosa (APG)**

Formula en gramos por litro.

- Agar granulado: 15 gr.
- Infusión de papa: 250 gr.
- Glucosa: 20 gr.

- **Agar Jugo-V8 (A-V8)**

Formulación para 1 litro.

- Jugo V8 200 cc.
- Carbonato de calcio: 3 gr.
- Agar granulado: 18 gr.

- **Agar Extracto de Malta (AEM)**

- Formulado de marca Kossodo
- 62 gr. Por litro

ANEXO 3: Crecimiento diario de micelio (mm) de *Corynespora cassiicola* los diferentes medios de cultivo.

CRECIMIENTO DIARIO mm/día DE <i>Corynespora cassiicola</i>				
FECHA	PDA	APG	A-V8	AEM
05/06/2016	1	1,0	1	1
06/06/2016	4,0	4,1	5,0	4,5
07/06/2016	2,9	2,8	5,0	3,5
08/06/2016	2,9	2,5	4,1	2,9
09/06/2016	2,5	2,1	3,6	2,5
10/06/2016	3,0	2,4	4,6	2,9
11/06/2016	2,8	2,2	4,1	2,8
12/06/2016	2,4	2,3	3,8	2,5
13/06/2016	2,4	2,3	3,9	2,5
14/06/2016	1,8	2,0	Placa llena	1,9
15/06/2016	2,6	2,2	Placa llena	2,1
16/06/2016	2,8	2,4	Placa llena	2,5
17/06/2016	2,8	2,4	Placa llena	2,5
18/06/2016	1,6	1,8	Placa llena	1,8
19/06/2016	2,2	2,7	Placa llena	2,3
20/06/2016	2,3	2,9	Placa llena	Placa llena
SUMA	40	38,1	35,1	38,2

ANEXO 4: Crecimiento diario de micelio (mm) de *Corynespora cassiicola* los diferentes medios de cultivo.

CRECIMIENTO RADIAL (mm/día) DE <i>Corynespora cassiicola</i>				
FECHA	PDA	APG	A-V8	AEM
05/06/2016	1	1	1	1
06/06/2016	5	5,1	6	5,5
07/06/2016	7,9	7,9	11	9
08/06/2016	10,8	10,4	15,1	11,9
09/06/2016	13,3	12,5	18,7	14,4
10/06/2016	16,3	14,9	23,3	17,3
11/06/2016	19,1	17,1	27,4	20,1
12/06/2016	21,5	19,4	31,2	22,6
13/06/2016	23,9	21,7	35,1	25,1
14/06/2016	25,7	23,7	0	27
15/06/2016	28,3	25,9	0	29,1
16/06/2016	31,1	28,3	0	31,6
17/06/2016	33,9	30,7	0	34,1
18/06/2016	35,5	32,5	0	35,9
19/06/2016	37,7	35,2	0	38,2
20/06/2016	40	38,1	0	0

ANEXO 5: Ritmo promedio de crecimiento de micelio de *Corynespora cassiicola* en los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Ritmo promedio de crecimiento diario de micelio de <i>Corynespora cassiicola</i> (mm/día)
PDA	2,50
APG	2,38
AV8	3,90
AEM	2,55

ANEXO 6: Conidias en los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Tratamientos	Conidias/ml	Promedio
PDA	T1	12000	
PDA	T1	14000	
PDA	T1	10000	12000
PDA	T1	12000	
AEM	T2	1200	
AEM	T2	1400	
AEM	T2	1000	1200
AEM	T2	1200	
AJV8	T3	1800	
AJV8	T3	1600	
AJV8	T3	2000	1800
AJV8	T3	1800	
APG	T4	68000	
APG	T4	64000	
APG	T4	72000	68500
APG	T4	70000	

ANEXO 7: Medio de cultivo empleado para el crecimiento dual de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassiicola*.

- **Agar papa azúcar peptona (APAP).**
 - Agar (15 gr.)
 - Infusión de papa (papa sin pelar 250 g)
 - Azúcar (20 g)
 - Peptona (10 g)

ANEXO 8: Crecimiento radial de micelio (mm/día) de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassiicola*.

CRECIMIENTO mm/día			
Fecha	<i>C. cassiicola</i> (Testigo)	<i>P. fluorescens-C. cassiicola</i>	<i>B. subtilis-C. cassiicola</i>
08/03/2016	4.1	4.3	4.1
09/03/2016	2.0	2.1	2.0
10/03/2016	4.0	3.8	4.0
11/03/2016	3.9	3.6	3.8
12/03/2016	4.4	4.0	4.0
13/03/2016	3.0	2.3	3.0
14/03/2016	4.0	4.0	1.9
15/03/2016	3.6	4.0	3.9
16/03/2016	3.6	4.0	3.9
17/03/2016	4.6	4.6	1.5
18/03/2016	7.5	2.8	1.8

ANEXO 9: Crecimiento radial diario de micelio (mm/día) de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassicola*.

CRECIMIENTO ACUMULADO mm/día			
FECHA	<i>C. cassicola</i> (Testigo)	<i>Ps. fluorescens-C. cassicola</i>	<i>B. subtilis-C. cassicola</i>
09/03/2016	6.1	6.4	6.1
10/03/2016	10.1	10.1	10.1
11/03/2016	14.0	13.8	13.9
12/03/2016	18.4	17.8	17.9
13/03/2016	21.4	20.0	20.9
14/03/2016	25.4	24.0	22.8
15/03/2016	29.0	28.0	26.6
16/03/2016	32.6	32.0	30.5
17/03/2016	37.3	36.6	32.0
18/03/2016	44.8	39.4	33.8

ANEXO 10: Porcentaje de Inhibición de micelio de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente *Corynespora cassiicola*

Tratamiento	Porcentaje de Inhibición de micelio (%)
<i>B. subtilis</i> - <i>C. cassiicola</i>	24.6
<i>P. fluorescens</i> - <i>C. cassiicola</i>	12.0
Testigo (PDA)	0

ANEXO 11: Ritmo promedio de crecimiento diario de micelio (RPC) de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* frente a *Corynespora cassicola*.

Tratamientos	RPC (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> frente a <i>Corynespora cassicola</i>	3,07
<i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a <i>Corynespora cassicola</i>	3,58
<i>Corynespora cassicola</i> (Testigo)	4,07

ANEXO 12: Crecimiento diario de micelio (mm/día) de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassicola*.

CRECIMIENTO DIARIO mm/día		
FECHA	<i>C. cassicola</i> (Testigo)	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22-<i>C. cassicola</i>
08/03/2016	3.4	3.1
09/03/2016	2.1	2.1
10/03/2016	2.8	2.8
11/03/2016	3.3	3.0
12/03/2016	2.8	3.0
13/03/2016	2.8	2.8
14/03/2016	3.0	2.8
15/03/2016	2.4	1.6
16/03/2016	2.5	1.6
17/03/2016	2.9	0.6
18/03/2016	3.0	0.0
19/03/2016	4.0	
20/03/2016	3.0	
21/03/2016	2.4	

ANEXO 13: Crecimiento acumulado de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassicola*.

CRECIMIENTO ACUMULADO mm/día		
FECHA	<i>C. cassicola</i> (Testigo)	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22-<i>C. cassicola</i>
09/03/2016	5.5	5.2
10/03/2016	8.3	8.0
11/03/2016	11.5	11.0
12/03/2016	14.3	14.0
13/03/2016	17.0	16.8
14/03/2016	20.0	19.5
15/03/2016	22.4	21.1
16/03/2016	24.9	22.7
17/03/2016	27.8	23.3
18/03/2016	30.8	0.0
19/03/2016	34.8	
20/03/2016	37.8	
21/03/2016	40.1	

ANEXO 14: Ritmo promedio de crecimiento (RPC) diario de micelio de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassicola*.

Tratamiento	RPC (mm/día)
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T-22 frente a <i>C. cassicola</i>	2,39
<i>C. cassicola</i> (Testigo)	2,87

ANEXO 15: Porcentaje de Inhibición de micelio de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 frente a *Corynespora cassicola*.

Tratamiento	Porcentaje de micelio
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T- 22 frente a <i>Corynespora cassicola</i>	41.08
<i>Corynespora cassicola</i> (Testigo)	0

ANEXO 16: Promedio de crecimiento micelial (mm/día) de *Corynespora cassiicola* en la prueba del alimento envenenado.

PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE <i>Corynespora cassiicola</i>.							
FECHA	Días	Azoxystrobin	Clorotalonil	Difenoconazol	Tiabendazol	Fosetil aluminio	Testigo (PDA)
30/12/2016	0	0	0	0	0	0	0
01/01/2017	2	1.91	1.72	1.00	0.44	0.00	3.34
03/01/2017	4	2.77	2.75	1.59	0.00	0.00	4.75
05/01/2017	6	4.03	3.63	1.63	0.34	0.00	7.00
07/01/2017	8	5.91	2.69	1.91	0.03	0.00	8.16
09/01/2017	10	5.63	2.72	2.88	0.00	0.00	6.97
11/01/2017	12	5.44	4.25	2.44	0.13	0.00	6.00
Total		25.68	17.75	11.44	0.94	0.00	36.22

ANEXO 17: Promedio de crecimiento micelial acumulado (mm/día) de *Corynespora cassicola* en la prueba del alimento envenenado.

PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL ACUMULADO (mm/día) DE <i>Corynespora cassicola</i>.							
FECHA	Días	Azoxystrobin	Clorotalonil	Difenoconazol	Tiabendazol	Fosetil aluminio	Testigo (PDA)
01/01/2017	2	1.91	1.72	1.00	0.44	0.00	3.34
03/01/2017	4	4.68	4.47	2.59	0.44	0.00	8.09
05/01/2017	6	8.71	8.09	4.22	0.78	0.00	15.09
07/01/2017	8	14.61	10.78	6.13	0.81	0.00	23.25
09/01/2017	10	20.24	13.50	9.00	0.81	0.00	30.22
11/01/2017	12	25.68	17.75	11.44	0.94	0.00	36.22

ANEXO 18: Porcentaje de Inhibición de micelio de los fungicidas probados.

TRATAMIENTO	PRODUCTO	INGREDIENTE ACTIVO	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE MICELIO (%)
T1	Stronsil	Azoxystrobim	30.50
T2	Zetron 720	Clorotalonil	51.00
T3	Difeconazil	Difenoconazol	68.41
T4	Mertect	Tiabendazol	96.32
T5	Aliette	Fosetil aluminio	100.00
T6	Potato Dextrose Agar (PDA)	PDA (Testigo)	0.00

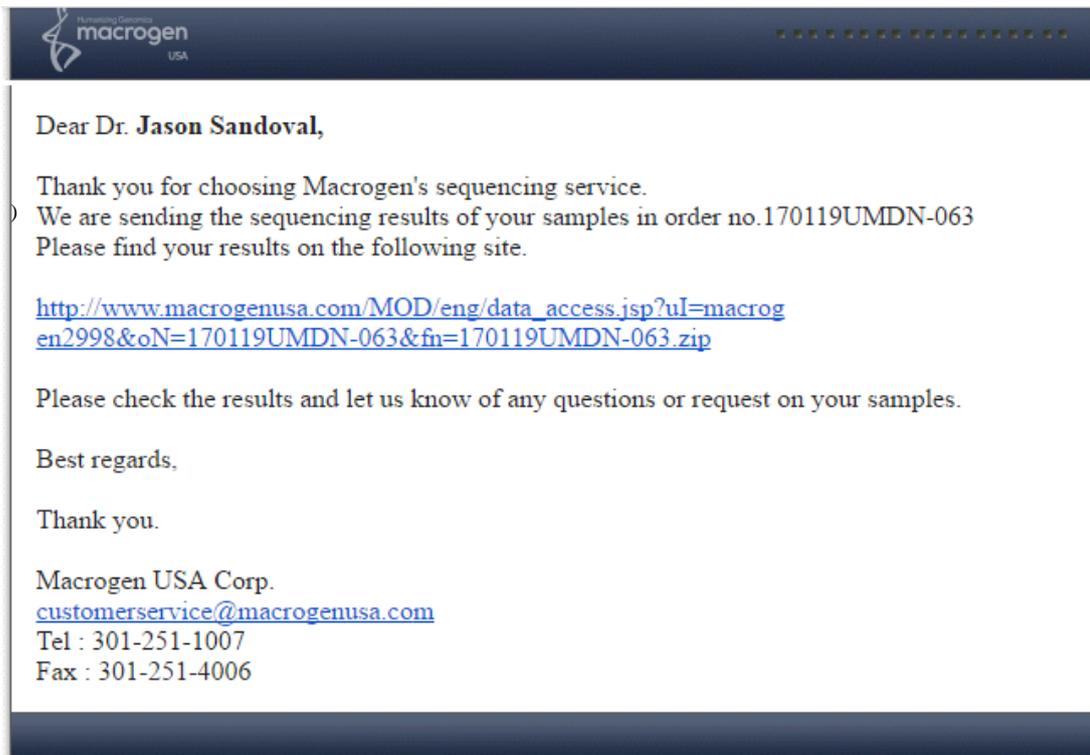
ANEXO 19: Datos de severidad de las evaluaciones realizadas en el control de la mancha foliar de fresa en invernadero.

TRAT.	EV1	EV2	EV3	EV4	EV5	ABCPE	PROM ABCPE
T1	6.84	10.68	14.35	17.50	21.80	411.63	
T1	7.47	15.11	19.87	24.14	28.05	553.08	
T1	7.04	10.03	14.55	17.47	23.77	416.24	487.02
T1	7.55	15.92	21.00	24.26	27.82	567.14	
T2	6.49	12.03	15.26	18.90	25.10	446.89	
T2	8.17	13.25	18.25	21.75	24.17	502.28	
T2	7.91	14.20	18.76	22.16	27.10	524.20	490.61
T2	6.56	12.91	17.45	21.55	25.62	489.08	
T3	5.83	9.45	11.10	14.05	18.05	337.43	
T3	5.91	9.25	11.33	14.40	18.96	343.73	
T3	8.12	12.60	16.90	20.15	23.50	474.46	383.09
T3	6.75	10.15	12.85	15.90	19.24	376.75	
T4	5.89	5.43	5.25	4.75	5.92	161.13	
T4	8.11	7.10	6.73	6.33	9.19	217.90	
T4	7.85	6.90	6.32	6.10	8.50	208.17	194.10
T4	6.72	6.22	5.91	5.76	7.72	189.21	
T5	8.12	11.25	15.85	18.15	23.08	442.19	
T5	7.51	14.46	22.37	26.90	30.20	593.10	
T5	7.06	14.95	18.90	23.22	29.50	541.56	543.82
T5	9.83	14.18	22.72	25.91	29.92	598.41	
T6	9.09	13.10	17.64	19.80	23.20	484.97	
T6	5.91	8.50	11.49	15.20	19.75	347.96	
T6	6.10	8.75	11.15	14.80	19.63	345.15	409.05
T6	9.39	12.70	14.62	18.80	23.90	458.13	
T7	7.72	11.05	12.30	15.63	19.90	385.00	
T7	7.95	11.00	12.10	20.05	24.90	432.93	
T7	4.90	7.55	10.24	13.10	17.40	304.08	358.48
T7	5.41	8.80	10.05	13.75	15.42	311.93	
T8	7.08	11.63	15.29	18.86	23.50	441.64	
T8	8.52	13.76	18.12	21.78	29.30	525.04	
T8	6.75	11.55	15.55	19.95	25.31	455.06	494.39
T8	8.95	14.70	20.22	23.90	27.10	555.82	
T9	5.95	13.33	19.80	26.05	33.40	563.89	
T9	7.30	15.56	21.18	27.60	31.12	599.45	
T9	6.94	12.21	17.59	23.90	28.11	512.43	555.68
T9	7.45	12.72	19.03	25.51	30.05	546.97	
T10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
T10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
T10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T10	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	

ANEXO 20: Protocolo de Extracción de ADN según Aamir *et al.* 2015.

- La cepa del hongo se cultivó en erlenmeyers de 250 ml durante 5 días, en medio líquido PD (62.5 g papa, 5 g dextrosa) a 30 °C.
- La masa fúngica se extrajo con la ayuda de una espátula fina, luego se filtró con una jeringa de 10 ml que contenían lana de vidrio para retener la masa.
- La masa fúngica o micelio, previamente congelado, se pulverizó con nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y pilón, luego se tomó de 60 a 80 mg en tubos Eppendorf de 2 ml al cual se le agregó el tampón de lisis (100 mM Tris HCl [pH 8,0] 50 mM de EDTA, 3 % de SDS), se homogenizó mediante el equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, EE.UU.) a 6 M/S por 60 segundos.
- El homogenizado se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, luego se le agregó 2 uL de RNasa a una concentración de 10 mg/mL y se incubó a 37 °C durante 15 min, cumplido el tiempo se añadió 2 uL de fenol, cloroformo y alcohol isoamilico (25:24:1).
- Luego de mezclado se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. La capa acuosa se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añadió un igual volumen de etanol al 100%; posteriormente, el precipitado se guardó a -20 °C durante 30 minutos, pasado ese tiempo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos.
- El sedimento de ADN se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. El alcohol se evaporó al aire libre y se obtuvo el sedimento de ADN, este luego se diluyó con agua ultrapura o tampón TAE 1X.

ANEXO 21: Documento de respaldo de Macrogen Usa, que indica que el proceso de secuenciación se ha realizado.



ANEXO 22: Factura que verifica el lugar en el cual se ha realizado la secuenciación de producto de PCR



Macrogen Corp.
 1330 Piccard Drive Ste 103
 Rockville, MD 20850
 TIN: 20-1950326
 DUNS: 60-339-8046
 billing@macrogenusa.com
 T. (301)251-1007
 F. (301)251-4006

Universidad Peruana Cayetano Heredia
 Av. Honorio Delgado 430 - SMP
 Lima
 -
 Peru

Invoice

Invoice number : U12093816

PO number :

Order Period	12-09-2016 ~ 12-09-2016	Invoice Date	12-16-2016	Due Date	01-16-2017
ATTN	-				
Ordered by	Jason Sandoval				
Institute	Universidad Peruana Cayetano Heredia				

Project description

Unit : US\$

Order No.	User name	Service description	Q'ty	Unit	Unit price	Amount
161209UMDN-050	Jason Sandoval	PCR Product Purification-exoSAP	2	Sample	\$ 2.00	\$ 4.00
	Jason Sandoval	PCR Product Sequencing	4	Reaction	\$ 5.00	\$ 20.00
	Jason Sandoval	Shipping	1	EA	\$ 53.86	\$ 53.86
Notes :					Balance Due	\$ 77.86

Please remit payment at your earliest convenience. There are three options for payment.

1. Pay by credit card

You can simply email us at billing@macrogenusa.com or fax us at 301-251-4006 with the credit card information

2. Sending checks

You can send a check payable to Macrogen Corp. Please be sure to include the invoice number to ensure prompt processing of your payment.

Address: Macrogen Corp. 1330 Piccard Drive Ste 103 Rockville, MD 20850 USA

3. Wire transfer

Please be sure to send us the receipt after the payment is processed.

Bank Name: CITIBANK, NA

Account Name: Macrogen Corp.

Account No: 9107045760

Routing / ABA No: 052002166

Wire transfer ABA : 254070116

Swift No: CITIUS33

Bank Address: 1400 Research Blvd.

Rockville, MD 20850

Bank Tel: 1-301-762-8000

Thank you for using our service - we appreciate it very much.

Sincerely,

MACROGEN CORP.

ANEXO 23: Mediciones de crecimiento radial de micelio de *Corynespora cassiicola* colocadas en incubadora e Invernadero.

Fecha	<i>Corynespora cassiicola</i> INCUBADORA															
	R1				R2				R3				R4			
	N	S	E	O	N	S	E	O	N	S	E	O	N	S	E	O
23/01/2017	12	12	12	12	12	13	12	12	12	12	12	12	11	11	11	12
25/01/2017	7	8	7	7.5	9	9	8.5	9	9	9	9	9	9	8	8.5	8.5
27/01/2017	7	7	7	6.5	8	8	8	7.5	7.5	7.5	7.5	7	8	7	7.5	8
29/01/2017	7	7	7	7	8.5	9	8	8	8	9	7.5	8.5	9	8	9	9
Suma	33	34	33	33	38	38	36	36	37	38	36	37	37	34	36	37
Días	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Promedio	3.7	3.7	3.6	3.7	4.2	4	4	4	4.1	4.2	4	4.1	4	3.8	3.9	4.1
	3.67				4.08				4.07				3.99			

Fecha	<i>Corynespora cassiicola</i> INVERNADERO															
	R1				R2				R3				R4			
	N	S	E	O	N	S	E	O	N	S	E	O	N	S	E	O
23/01/2017	9	9.5	9	9	9	9	9	8.5	7.5	7	7	8	9	9	10	8
25/01/2017	8	7.5	8	8	8	8	8	8	8.5	8.5	8.5	8.5	8	8	8	6.5
27/01/2017	5	4.5	4.5	4.5	5.5	5	5	5	5	4.5	4.5	5	5	5	4.5	4.5
29/01/2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2.5	2.5	2.5
Suma	24	24	24	24	25	24	24	24	23	22	22	24	23	25	25	22
Días	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Promedio	2.7	2.6	2.6	2.6	2.7	3	2.7	2.6	2.6	2.4	2.4	2.6	3	2.7	2.8	2.4
	2.63				2.67				2.51				2.60			

ANEXO 24: Mediciones de conidióforo y conidia de reaislamiento de mancha foliar de plantas que se realizaron la prueba de patogenicidad.

Número	Conidioforo			Conidia			
	Largo (μ)	Díametro (μ)	Proliferaciones	Largo (μ)	Díametro (μ)	Base truncada	N° Pseudoseptas
1	80	2	6	21.5	4	2	5
2	90.5	2	4	31	4.25	2	4
3	85	2	6	22	4	2	3
4	65	2	3	30	4.5	2	4
5	81	2	3	28	4.5	2	5
6	61	2.25	3	19	3	2	4
7	49	2.5	3	22	4	2	5
8	55	2.25	3	18	3.75	1.75	5
9	52	2	4	18.5	2.75	1.5	4
10	50	2	2	21	3.5	2	4
11	68	2.5	5	22.5	4	2	4
12	60	2	4	20	4	2	5
13	55	2	4	25	4.5	2	4
14	82	2.25	5	26	4	2	6
15	60	2.5	4	33	3.5	2	5
16	75	2	3	23	3.5	2	3
17	82	2	5	23	3.5	2	3
18	80	2.5	6	26.5	4	2	3
19	72	2	4	23	4	1.75	4
20	77	2.5	3	19	4	2	3
21	85	2.5	5	21	3.5	1.75	6
22	61	2	4	21	4	2	5
23	50	2.25	6	34	3.5	1.5	3
24	67	2	5	27	4	1.75	7
25	85	2.5	4	22	4	2	3
SUMA	1727.5	54.5	104	597	96.25	48	107
PROMEDIO	69.1	2.18	4.16	23.88	3.85	1.92	4.28
FACTOR	2.42	2.42	***	2.42	2.42	2.42	***
TOTAL	167.22	5.28	***	57.79	9.32	4.65	***
RANGOS (Elis, 1971)	(110-850) (μ)	(4-11) (μ)	(2-9) (μ)	(40-220) (μ)	(9-22) (μ)	(4-8) (μ)	(4-20)